

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**A HIGIENIZAÇÃO NA PREVENÇÃO E NO CONTROLE DO BIOFILME:
UMA REVISÃO**

ESTELA MARASCHIN TELLES

**Porto Alegre
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**A HIGIENIZAÇÃO NA PREVENÇÃO E NO CONTROLE DO BIOFILME:
UMA REVISÃO**

AUTOR: ESTELA MARASCHIN TELLES

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini

**Porto Alegre
2011**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, César Augusto Marchionatti Avancini, pelo apoio, idéias e incentivo em todos os momentos deste trabalho.

À Nutricionista Marcia Gabriela D'Elia Bellos pelo apoio e compreensão.

Ao meu esposo Rodrigo Motta Calovi pela paciência e apoio.

RESUMO

TELLES, E. M. A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão.

[Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização – Faculdade de Veterinária da UFRGS]

Na produção de alimentos a qualidade da matéria-prima manipulação e as condições hígidas do ambiente de manipulação são fatores indispensáveis para garantir um produto final seguro e sem riscos à saúde do consumidor. O objetivo deste trabalho foi o de realizar revisão de literatura sobre as conseqüências que a presença do biofilme provoca na segurança do alimento, bem como buscar indicações de processos e produtos para sua prevenção ou controle. A revisão informou que a presença de biofilmes em superfícies de indústrias alimentícias pode resultar em um impacto negativo na qualidade dos produtos finais contaminando os alimentos, promovendo riscos tanto de transmissão de doenças quanto da deteriorização precoce (menor “tempo de prateleira”). Além disso, os microrganismos, quando em biofilmes consolidados, apresentam uma maior resistência aos sanitizantes. Os processos usados tanto na prevenção da formação quanto no controle de biofilme já instalado são os indicados na execução da higienização, quais sejam, os de limpeza e o de desinfecção. Os produtos de limpeza usados são os detergentes alcalinos, detergentes ácidos, tensoativos e agentes quelantes ou sequestrantes. Os produtos de desinfecção são os compostos químicos ácido peracético, compostos clorados, iodóforo e compostos quaternários de amônia. Concluiu-se que a prevenção da formação de biofilmes exige um rígido programa de higiene ambiental e que biofilmes já consolidados são de difícil controle, demandando um grande gasto de energia física e química.

Palavras-chave: Unidade de Alimentação e Nutrição. Biofilme. Microrganismos. Higienização Industrial. Sanitizantes. Limpeza.

ABSTRACT

In the food production, the quality of raw material and its manipulation are indispensable issues to guarantee a safe, riskless to the consumer's health final product. The food industries' occurrence of biofilm on surfaces may result in a negative impact on the quality of the final product. Furthermore, when detected in biofilms of food industry, micro-organisms present a stronger resistance to sanitization. This work aims to evaluate the consequences to the foods which are manipulated in present-biofilm environments, and to verify the operational processes such as washing, divergence, rinsing, and disinfection, as well as the chemical substances that assure the quality of the production process.

Keywords: Food and Nutrition Unit. Biofilm. Micro-organisms. Industrial Hygienization. Sanitizing Agents. Cleaning.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 DESENVOLVIMENTO.....	9
2.1 Segurança do Alimento	9
2.2 Estrutura e Composição do Biofilme	12
2.2.1 Eventos Pré-Adesão	16
2.2.2 Adesão Reversível	16
2.2.3 Adesão Irreversível.....	16
2.2.4 Maturação	17
2.2.5 Destacamento de Células.....	17
2.2.5.1 A Fase Aquosa.....	17
2.3 O Desenvolvimento do Biofilme.....	18
2.3.1 Potencial Hidrogeônico (pH)	18
2.3.2 Efeitos de Velocidade e de Turbulência do Fluido	18
2.3.3 Influência de Partículas Inorgânicas na Formação Biofilmes	19
2.3.4 Temperatura.....	19
2.3.5 Concentração de Nutrientes	20
2.3.6 Tipo de Superfície.....	20
2.4 MICRORGANISMOS E A FORMAÇÃO DO BIOFILME	21
2.4.1 Pili.....	22
2.4.2 Flagelos.....	22
2.4.3 Sistema <i>Quorum Sensing</i>	23
2.5 RESISTÊNCIA DO BIOFILME	24
2.6 MÉTODOS PARA CONTROLE OU ELIMINAÇÃO DO BIOFILME	27
2.6.1 Etapa Preliminar.....	28
2.6.2 Pré-Lavagem.....	29
2.6.3 Limpeza com Detergente	29
2.6.3.1 Detergentes alcalinos.....	30

2.6.3.2 Detergentes Ácidos.....	30
2.6.3.3 Detergentes Tenso ativos.....	31
2.6.3.3.1 Detergentes tensoativos aniônicos	31
2.6.3.3.2 Detergentes tensoativos catiônicos	31
2.6.3.3.3 Detergentes tensoativos não-iônicos	31
2.6.3.4 Anfóteros.....	32
2.6.3.5 Agentes Sequestrantes e Quilates	32
2.6.4 Enxágue	33
2.6.5 Sanitização.....	33
2.6.5.1 Ácido Peracético.....	34
2.6.5.2 Compostos Clorados.....	35
2.6.5.3 Iodóforos.....	35
2.6.5.4 Compostos Quaternários de Amônio – QACs.....	36
2.6.6 Avaliação da Eficácia dos Sanitizantes	36
3 CONCLUSÃO	38
Referências.....	39

1 INTRODUÇÃO

São considerados alimentos seguros os que apresentam riscos de ocorrência de doenças reduzidos ao máximo, durante a sua produção, para um risco aceitável. (FORSYTHE, 2002).

Em serviços de alimentação e nutrição, a garantia de alimentos com qualidade é prioritária, uma vez que a cada dia cresce entre a população o hábito de realizar refeições fora de casa. Acompanhando essa tendência, os restaurantes do tipo *self-service* apresentam vantagens para o consumidor, tais como variedade de opções, rapidez de atendimento e custos mais acessíveis; porém, alguns fatores preocupam os profissionais da área de alimentação, como alimentos expostos em temperaturas inadequadas, equipamentos e utensílios com higienização deficiente, que são fatores responsáveis por surtos de doenças de origem alimentar (LIMA; OLIVEIRA, 2005).

As unidades de alimentação e nutrição, de acordo com dados epidemiológicos, são uma das maiores fontes de surtos e de doenças alimentares. Para atender à legislação brasileira em vigor e não colocar em risco a saúde do consumidor deve-se controlar a contaminação, multiplicação e a sobrevivência microbiana nos diversos ambientes assim como em utensílios, equipamentos e manipuladores (HAZELWOOD, 1994).

Durante o processo e a manipulação de alimentos, esses estão sujeitos a contaminações de natureza química, física e microbiológica, sendo esta última a que provoca os maiores problemas para as indústrias de alimentos. Segundo dados da *Food and Drug Administration* (FDA), agência que regulamenta os setores de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América do Norte, aproximadamente dois terços das etiologias confirmadas de toxinfecções alimentares estão diretamente ligadas a contaminações microbiológicas ocorridas em indústrias, principalmente de origem bacteriana (FDA, 1997).

Os alimentos são contaminados mediante contato com utensílios, superfícies e equipamentos lavados inadequadamente. Para garantir a segurança dos alimentos é importante a conservação e a higiene dos mesmos, bem como a origem da matéria-prima e fundamental o grau de conhecimento e treinamento dos manipuladores (GERMANO; GERMANO, 2003).

As superfícies usadas para o processamento dos alimentos devem ser de aço inoxidável, polietileno, polipropileno, vidro, dentre outros que não permitem a adesão bacteriana e formação de biofilmes. Os equipamentos e utensílios que entrarem em contato com alimentos não devem apresentar odor ou sabor, tendo superfícies lisas e isentas de rugosidades e frestas que comprometam sua higienização (ANDRADE, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o manipulador de alimentos pode ser uma via de contaminação dos alimentos quando não existe o cumprimento em relação às normas higiênicas, favorecendo a contaminação por microrganismos patogênicos.

Mesmo com a implantação de sistemas de qualidade e com a aplicação de efetivos agentes desinfetantes, os microrganismos não são completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e o acúmulo de microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes, os quais podem conter microrganismos patogênicos (KUMAR; ANAND, 1998; MITTELMAN, 1998; WONG, 1998; BOS *et al.*, 2000).

É possível ocorrer adesão bacteriana e formação de biofilmes em praticamente todo tipo de superfície que entra em contato com os alimentos no seu processamento, desde as mais rugosas até as consideradas lisas. Essa habilidade da bactéria em aderir a superfícies de contato ou a utensílios compromete a higiene desses materiais.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de realizar revisão de literatura com a finalidade de avaliar as consequências para os alimentos manipulados em ambientes com a presença de biofilme, assim como verificar indicações técnicas sobre procedimentos, processos, protocolos e produtos para seu controle ou eliminação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Segurança do Alimento

A segurança alimentar é um conjunto de medidas e instrumentos que assegura o acesso das pessoas aos alimentos em quantidade e qualidade e que atendam às exigências nutricionais, com objetivo não só de garantir uma vida digna e saudável, mas também os demais direitos de cidadania (BRASIL, 2001).

A incidência de doenças alimentares é alta em todo o mundo, e onde há dados disponíveis torna-se evidente que a maioria dos incidentes ocorre em serviços de alimentação e nutrição ou nas residências. As doenças veiculadas por alimentos têm sua origem na matéria-prima ou mesmo depois do alimento pronto para o consumo, o que significa que a presença de qualquer elemento, vivo ou não, estranho à sua natureza, pode provocar danos à saúde (BRASIL, 2001).

Garantir a segurança alimentar em países como o nosso é promover uma verdadeira revolução, que envolve mudanças profundas na estrutura de dominação política. Em muitas regiões do Brasil, as condições de pobreza são mantidas porque inclusive facilitam a perpetuação no poder de elites conservadoras que há séculos mandam neste país, dificultando o acesso aos alimentos (BRASIL, 2001).

Com o propósito de proteger o consumidor contra a ingestão de alimentos nocivos, os países vêm buscando ações em saúde pública, na área de vigilância sanitária, com foco na legislação, procurando torná-la abrangente e eficaz, mas também flexível o bastante para permitir a sua implantação por meio de normas técnicas que acompanhem a evolução científica e tecnológica, no setor de produção e fabricação de alimentos (LAMARDO *et al.*, 2000).

Em geral, os microrganismos utilizam os alimentos como fonte de energia para seu crescimento e podem, dessa forma, promover alterações em suas características (sabor, odor, aparência). Dependendo da alteração causada, o alimento pode ser rejeitado pelo consumidor devido às mudanças ocorridas, somando-se ainda a possibilidade de causar intoxicações (KECHICHIAN, 2007).

Em razão da complexidade dos fatores que formam o biofilme, a questão deve ser analisada desde a produção dos alimentos, passando pela industrialização até a distribuição final ao consumidor, tendo a atenção voltada para toda a cadeia alimentar (SOLIS, 1999).

Oferecer segurança requer um conjunto de ações complexas, pois envolve os setores que vão desde a produção, o beneficiamento da indústria, a comercialização, até os consumidores e os poderes públicos, esses últimos na forma de exigências, diretrizes, normas, limites e padrões, exercendo tarefas de inspeção, controle, fiscalização e vigilância (PRATA, 2000).

O universo microbiano abrange diversas formas de vida, como protozoários, bactérias, vírus e etc. Os microrganismos são capazes de se adaptar a condições de estresse, tais como acidez, frio, etc. (FORSYTHE, 2002).

Microrganismos necessitam de água, nutrientes e condições apropriadas de temperatura e pH para se multiplicarem. A combinação desses elementos constituiu-se em fator determinante da vida de prateleira dos alimentos, podendo ser alterada em alguma etapa de produção, pela exposição à contaminação por substâncias tóxicas ou por microrganismos infecciosos ou patogênicos (LEITE JR., 2000).

Muitas bactérias, em seu habitat, vivem em comunidades de distintos graus de complexidade, associadas a vários tipos de superfícies bióticas e/ou abióticas, compondo o biofilme, que pode ser formado por populações a partir de uma única ou de múltiplas espécies (CAIXETA, 2008).

Os biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos a superfícies diversas, que segundo Shi e Zhu (2009), são a forma prevalente de crescimento dos microrganismos na natureza. Também podem ser definidos como células microbianas agrupadas sobre superfície, dentro de substâncias poliméricas extracelulares, como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácidos teicóicos e ácidos nucléicos.

São considerados biofilmes maduros aqueles com ecossistemas organizados, nos quais há canais de água que permitem a passagem de nutrientes metabólicos e resíduos, e podem proteger os microrganismos ali presentes (SHI; ZHU, 2009).

O início da formação do biofilme ocorre quando bactérias livres ou planctônicas reconhecem uma superfície e aderem a ela firmemente, crescem e sobrevivem a ambientes hostis como dentes, epitélios, plásticos, aço inoxidável, entre outros (JOSEPH; OTTA; KARUNASAGAR, 2001).

A formação de biofilme passa por quatro fases, sendo que na primeira, moléculas orgânicas de alimentos, como proteínas do leite e da carne, são depositadas sobre as superfícies dos equipamentos, formando um biofilme condicionante. Na segunda fase, células microbianas são atraídas e se ligam nessas superfícies. Na terceira fase, as células microbianas permanecem sobre as superfícies, uma vez que resistiram aos processos de limpeza e desinfecção, sendo possível sua multiplicação. Na quarta fase, biofilmes maduros se desenvolvem através da adesão e multiplicação de novas células, mesmo de diferentes microrganismos, e da expressão de genes específicos (TONDO, 2011).

O desenvolvimento dessas quatro fases é muito variável, uma vez que depende de propriedades particulares de microrganismos e das superfícies (TONDO, 2011).

Contudo, biofilmes nas fases 1 e 2 provavelmente poderão ser facilmente removidos pela limpeza manual, esfregação branda ou turbilhonamento não vigoroso. Os biofilmes nas fases 3 e 4, por sua vez, necessitarão de limpezas vigorosas com desinfecções bem rigorosas (TONDO, 2011).

O biofilme é composto por aproximadamente 97% de água, variando conforme as características do ambiente onde se encontra. A matriz é composta por um complexo de polímeros, nutrientes, produtos de lise celular e partículas de materiais do meio onde vive (SUTHERLAND, 1997).

As condições dos ambientes industriais onde se processam os alimentos, tais como o fluxo de água, concentração ampla de alimentos e a presença de materiais crus, favorecem a aderência bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes (GIBSON *et al.*, 1999).

A adesão e formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis, sob diversos aspectos na indústria de alimentos, segundo Caixeta (2008), uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação por patógenos que podem comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde do consumidor.

As suas atividades podem ser classificadas em duas grandes categorias: as benéficas, conduzindo a transformações de valor positivo, e as prejudiciais, responsáveis por processos que devem ser evitados devido a suas consequências negativas (CAPELLETTI, 2006).

Sendo assim, nos é imprescindível conhecer os mecanismos envolvidos na formação de biofilmes, para controlá-los ou erradicá-los, sendo que, para esse fim a utilização de biocidas é frequentemente considerada (CAPELLETTI, 2006).

A utilização de eficientes e adequados sanificantes em equipamentos pode evitar a formação de biofilmes e/ou reduzir os índices de contaminação microbiana de um alimento com qualidade. Entretanto, como a eliminação de biofilmes em superfícies é um processo difícil, a forma de higienização deve ser analisada como um todo, otimizando os resultados e minimizando os custos (CAIXETA, 2008).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a formação de biofilmes na indústria de alimentos, suas características, assim como sua possível remoção para a obtenção de um produto com qualidade e segurança.

2.2 Estrutura e Composição do Biofilme

A definição de biofilmes tem sido algo como uma comunidade sésil de organismos, caracterizada por células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, interface ou entre si, embutidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por esses microrganismos e que apresentam um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os microrganismos formam o biofilme da mesma maneira em qualquer ecossistema em que habitam (ambiental, industrial e médico) (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os microrganismos precursores da formação de biofilmes são os denominados planctônicos, que quando encontrados em suspensão, se tornam mais sensíveis a agressões ambientais que em sua forma sésil. Apesar disso, os microrganismos planctônicos foram, durante muitos anos, referência para a seleção de agentes antimicrobianos (CAPELLETTI, 2006).

O conceito de biofilme avançou e pesquisas vêm sendo realizadas em muitas áreas relacionadas com a ecologia microbiana. A microbiologia moderna se preocupa em estudar os mecanismos fisiológicos e de controle entre as formas microbianas planctônicas (livres) e sésseis (biofilme) (CAPELLETTI, 2006).

Biofilme microbiano é definido como uma associação de células bacterianas e de fungos, fixadas às superfícies, bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz

extracelular de substâncias poliméricas (LUCCHESI, 2006), juntamente com os nutrientes capturados para a formação da matriz (HAUN, 2004).

A formação do biofilme inicia-se com a absorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas na superfície, formando um filme condicionante. Em instalações de indústrias alimentícias, proteínas de produtos derivados do leite ou de carnes são elementos importantes para formar a camada condicionante, os quais contêm receptores específicos permitindo a aderência de microrganismos (KUMAR; ANAND, 1998; WATNICK; KOLTER, 2000).

As propriedades físico-químicas da superfície exercem uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos (YOKOO, 2004).

A constituição dos biofilmes é tipicamente por água, microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas (PEREIRA, 2001).

A matriz extracelular, ou EPS, é formada pelas próprias células e por componentes do ambiente, como proteínas, detritos e matéria inorgânica, sendo, portanto, de composição heterogênea e complexa. Embora prevaleçam os polissacarídeos, a EPS pode também ser constituída por proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios (CAPELLETI, 2006; LUCCHESI, 2006).

A matriz extracelular possui composição variada entre diferentes espécies bacterianas, ou até mesmo dentro da mesma espécie, sob diferentes condições ambientais.

Apesar da heterogeneidade, o exopolissacarídeo é considerado componente essencial da matriz, assim como algumas proteínas de superfície que, por sua vez, têm sido relacionadas principalmente à adesão inicial das células de microrganismos à superfície (LASA; PENADÉS, 2006 *apud* CAIXETA, 2008).

Exopolissacarídeos são considerados componentes importantes que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano, agregado pela formação tridimensional com aspecto de gel, alta hidratação e canais localizados na matriz do biofilme, em que os microrganismos são imobilizados. Agem como adesivo e barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam arrastadas pelo fluxo de substâncias e auxiliam a célula a resistir a condições de estresse múltiplo, como a diminuição e a exaustão de

nutrientes e água, a presença de biocidas e outros agentes antimicrobianos e condições ambientais (CAIXETA, 2008).

A matriz do biofilme pode conter polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácido teicóico, ácido nucléico e outras substâncias poliméricas hidratadas com 85% a 95% de água (SUTHERLAND, 1997; PRAKASH; VEEREGOWDA; KRISHNAPPA, 2003).

Os polissacarídeos extracelulares podem interagir com uma grande variedade de outras moléculas, incluindo lecitinas e lipídios, bem como com outros polissacarídeos (SUTHERLAND, 1997).

A quantidade de polissacarídeos extracelulares sintetizados pelas células em biofilme depende da disponibilidade de substratos de carbono (tanto no interior quanto no exterior da célula) e do equilíbrio entre a fonte de carbono e outros nutrientes. A presença excessiva de carbono e uma limitação de outros nutrientes, como o nitrogênio, comprometerão a síntese dos polissacarídeos extracelulares (SUTHERLAND, 1997).

As substâncias poliméricas extracelulares são produzidas em resposta à aderência e estímulos ambientais, tais como: pressão osmótica, pH, temperatura e falta de nutrientes. Essas substâncias proporcionam proteção aos organismos do biofilme, fornecendo concentração de nutrientes, prevenindo o acesso de biocidas, sequestrantes de metais e toxinas e prevenindo a dessecação (PROSSER *et al.*, 1987; SUTHERLAND, 1997).

Na estrutura do biofilme, destacam-se as seguintes características, segundo Boari (2008):

- a) São estruturas viscoelásticas e hidratadas, em que o grau de elasticidade se relaciona à interação de exopolissacarídeos e/ou proteínas com a superfície a ser utilizada. Seu formato, sua espessura, seu alongamento, sua densidade e sua rigidez dependem das características físico-químicas do ambiente e da presença ou ausência de fluxo – biofilmes formados em fluxo, geralmente, tendem a ser mais alongados e rígidos, como resposta ao atrito mecânico;
- b) A matriz, que se constitui por EPS, confere a proteção ao biofilme, como já foi descrito anteriormente;
- c) Possuem uma quantidade variável de microcolônias independentemente móveis e ancoradas à superfície;

d) São compostas por micro canais internos cuja função é de distribuição de nutrientes e água, transportados por difusão passiva ou com o auxílio de água, que ocorre através de capilares especiais que possuem a função de escoamento de metabólitos, sendo alguns potencialmente patogênicos ao homem, atuando ainda nas enzimas, como a alginatoliase e as proteases, necessárias ao destacamento de células do biofilme e na distribuição de moléculas sinalizadoras do *quorum sensing*.

Acredita-se, ainda, que os microcanais de água participem no transporte de oxigênio no interior do biofilme; portanto, a limitação da difusão e o consumo de oxigênio por microrganismos resultam no baixo conteúdo de oxigênio no interior do biofilme, demonstrando, com isso, que microrganismos aeróbios e anaeróbios podem viver juntos no biofilme (BOARI, 2008; CAIXETA, 2008; SUTHERLAND, 1997).

Os biofilmes são formados, segundo Christensen e Characklis (1990 *apud* CAPELLETTI, 2006), a partir de uma sequência de eventos, de acordo com as etapas de adesão e de adaptação dos microrganismos.

Na primeira etapa de formação de um biofilme, a adesão dos microrganismos primários é controlada por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionador, o qual se forma a partir de resíduos do próprio ambiente. Apêndices celulares externos, como flagelos, fímbrias e pílí também desempenham papel fundamental na adesão celular inicial, além de formarem pontes entre a superfície e as células (CAPELLETTI, 2006).

A união entre apêndices da bactéria e o substrato envolve forças fracas, tais como: interação dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, hidrofóbica e ligação covalente e iônica. Essa união geralmente ocorre com poucas horas de contato. Vários estudos indicam que a adesão irreversível começa a partir de 20 minutos a no máximo 4 horas a 4-20°C (HOOD; ZOTTOLA, 1995; SMOOT; PIERSON, 1998).

É difícil a remoção de células aderidas irreversivelmente e requer aplicação de uma intensa força mecânica ou a interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfetantes e/ou por calor (SINDE; CARBALLO, 2000).

Um processo que ocorre em cinco estágios descreve a formação de biofilme:

2.2.1 Eventos Pré-Adesão

Os microrganismos, na sua forma de vida planctônica, recebem algum estímulo que os levam a aderir a alguma superfície. Alguns fatores podem influenciar esse processo, como o pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores do *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura. Geralmente, a superfície sólida é condicionada, ou seja, pode ser modificada por adsorção de vários nutrientes dos alimentos e ter suas propriedades alteradas (FORSYTHE, 2002).

2.2.2 Adesão Reversível

Ocorre a interação célula-superfície e sua colonização inicial. O processo de adesão bem sucedido depende de alguns fatores, como o aparato celular do microrganismo e as características da superfície da bactéria e do substrato. Ainda não são percebidas alterações fenotípicas, assim como na transição de genes, embora os genes para a produção de exopolissacarídeos sejam ativados após 15 minutos de contato entre célula e superfície.

2.2.3 Adesão Irreversível

Ocorre aproximadamente duas horas após a adesão inicial e se caracteriza pela presença de microcolônias, que correspondem a um amontoado de células aderidas entre si e a uma superfície. Neste instante, a motilidade cessa e genes envolvidos na comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e na produção de exopolissacarídeos (EPS) estão totalmente ativos. A principal força de ligação célula-superfície é conferida pela matriz tridimensional e insolúvel de EPS (BOARI, 2008).

2.2.4 Maturação

Garante uma maior estabilidade, e é correspondente à maturação da estrutura que já vem sendo formada. Ocorre de três a seis dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias. A maturidade acontece por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela pronunciada produção e deposição de EPS, aumentando com isso a espessura do biofilme e a estabilidade da colônia contra flutuações do ambiente. O aumento da população de um biofilme acontece tanto pela divisão celular quanto pela redistribuição de células entre as microcolônias e pela adesão de novas células planctônicas (FORSYTHE, 2002).

2.2.5 Destacamento de Células

Acontece entre 9 e 12 dias depois dos processos iniciais. As células se apresentam móveis e assemelham-se às células planctônicas, podendo contaminar o alimento ou formar um novo biofilme na linha de produção (FORSYTHE, 2002).

Uma das fases que compreende a adesão e formação de biofilme em três fases: a fase aquosa, a célula e a interação célula-substrato.

2.2.5.1 A Fase Aquosa

Alguns parâmetros têm importante influência nos processos de adesão, constituição e maturação da comunidade microbiana com relação ao meio aquoso, como: viscosidade, temperatura, pH, presença de nutrientes, presença de moléculas orgânicas e inorgânicas, força iônica e potencial osmótico (BOARI, 2008).

Essas condições ambientais são notadas pelos microrganismos como sinais, de estimulação ou não, a sua adesão. E ainda, os constituintes da fase, quando depositados sobre o substrato, podem formar o filme condicionante (BOARI, 2008).

Enquanto fase aquosa, o leite pode beneficiar o processo de adesão e de formação de biofilmes, devido à sua rica constituição em carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, bem como devido à sua alta atividade de água e pH tendendo ao neutro (LUCCHESI, 2006).

2.3 O Desenvolvimento do Biofilme

2.3.1 Potencial Hidrogeônico (PH)

A grande parte dos biofilmes forma-se em valores de pH próximos à neutralidade. Desvios de pH para valores inferiores ou superiores a 7 irão certamente influenciar o desenvolvimento e atividade da comunidade microbiana, pois o pH tem um efeito preponderante no metabolismo dos microrganismos (PEREIRA, 2001).

Estudos de biofilmes em sistemas de distribuição de água potável, por exemplo, devem levar em consideração a turbulência do fluido, que pode conduzir a uma diminuição dos valores de pH, devido ao CO_2 se misturar com a água e formar HCO_3 . A redução dos valores de pH também pode ocorrer devido à liberação para o meio de substâncias ácidas sintetizadas pelos microrganismos que se desenvolvem nas paredes (CHAVES, 2004).

2.3.2 Efeitos de Velocidade e de Turbulência do Fluido

Os efeitos de velocidade, mais especificamente os efeitos de turbulência no seio do fluido, têm um papel significativo no desenvolvimento e estabilidade dos biofilmes (MACHADO, 2005). A turbulência e velocidade do escoamento de água que entra em contato

com as superfícies sólidas interferem nos processos de adesão, transporte de nutrientes e de desprendimento dos microrganismos (PEREIRA, 2001).

A variação da velocidade pode também influenciar no modo de colonização das superfícies. Nas baixas velocidades formam-se colônias isoladas aderidas às superfícies. À elevada velocidade, ocorre uma adesão de grandes grupos de células e só muito poucas de forma isolada (CHAVES, 2004).

2.3.3 Influência de Partículas Inorgânicas na Formação Biofilmes

A concentração de partículas sólidas suspensas em corrente líquida é mais um fator que possui influência na formação do biofilme.

Determinadas partículas sólidas podem contribuir para a limpeza dos sistemas industriais em função do seu caráter erosivo. Porém, algumas partículas provenientes da corrente líquida também podem ser incorporadas no próprio biofilme e alterar a sua estrutura, sendo, conseqüentemente, responsáveis por algumas implicações na sua estabilidade. (PEREIRA, 2001).

2.3.4 Temperatura

A temperatura é fator determinante no desenvolvimento microbiano, e como tal, pode afetar a formação e a atividade de qualquer biofilme, bem como o tipo de microrganismo que o compõe.

Para valores elevados de temperatura, ocorre a desnaturação das proteínas que compõem os microrganismos, o que é manifestado por uma diminuição abrupta da taxa de crescimento. O valor da temperatura em que esses efeitos destrutivos são preponderantes designa-se por limite máximo de temperatura.

A temperatura para a qual se registra um valor máximo da taxa de crescimento designa-se por temperatura ótima (STANIER *et al.*, 1995 *apud* CHAVES, 2004).

2.3.5 Concentração de Nutrientes

Os microrganismos requererem quantidades mínimas de nutrientes para que ocorra o seu crescimento. Quanto maior for a quantidade de nutrientes disponíveis, maior será o crescimento microbiano e maior será a diversidade de organismos que podem ser mantidos (BUCKMAN, 1997 *apud* CHAVES, 2004).

O ferro é um dos nutrientes necessários para o desenvolvimento celular bacteriano, apresentando-se mesmo como um nutriente limitante para o crescimento. As tubulações de ferro que ainda compõem uma boa parte das redes de distribuição e abastecimento de água potável, por exemplo, oferecem substrato de ferro que é uma fonte nutritiva para as bactérias e funcionam como ambientes ótimos para o desenvolvimento de certos microrganismos (CHAVES, 2004).

2.3.6 Tipo de Superfície

A superfície inerte em que se formam os biofilmes desempenha um papel importante na forma e desenvolvimento do biofilme. O estado de conservação da superfície pode, muitas vezes, ser um fator importante na formação do biofilme. Os depósitos porosos e irregulares que se encontram frequentemente às superfícies são zonas preferenciais para o crescimento bacteriano (CHAVES, 2004).

O tipo de material da superfície pode também influenciar no desenvolvimento de biofilme. Superfícies de natureza ferrosa são um habitat propício para o desenvolvimento microbiano, sabendo-se que o ferro é um nutriente necessário para o desenvolvimento de certas espécies bacterianas, como já foi mencionado anteriormente (CHAVES, 2004).

Em estudos realizados foi possível concluir que a rugosidade e porosidade do suporte condicionam a adesão celular. A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de microrganismos, pois proporciona locais de abrigo que são menos afetados pelas forças do fluido. O efeito da rugosidade da superfície é considerado quando ocorre a adesão da primeira camada de microrganismos, tendo menor influência quando uma superfície de adesão já tem biofilme formado (MACHADO, 2005).

2.4 MICRORGANISMOS E A FORMAÇÃO DO BIOFILME

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, pode-se ressaltar: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus sp.* e *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* (CAIXETA, 2008; CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006).

Entre todos os microrganismos, são as bactérias que mais comumente produzem biofilme em condições favoráveis, mesmo que algumas apresentem naturalmente uma maior aptidão que outras. Seus tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio são as principais características que as tornam excelentes organismos, capazes de colonizar qualquer superfície, até mesmo em condições extremas (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990 *apud* CAPELLETTI, 2006).

A capacidade de um microrganismo isolado em aderir ou não a uma superfície e, logo após, formar e manter um biofilme se relaciona estreitamente a seu fenótipo e genótipo. Quando presentes alguns aparatos celulares, como pili, flagelos e fímbrias, algumas proteínas da superfície, assim como sistemas *quorum sensing*, nota-se um incontestável diferencial à bactéria, em nível de aderência e formação do biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002 *apud* BOARI, 2008).

Além desses aspectos, são consideradas também de extrema importância as propriedades físico-químicas da superfície microbiana, com destaque na sua hidrofobicidade e

carga elétrica, sendo que todo ciclo vai depender da interação inicial entre a bactéria e o substrato (BOARI, 2008).

2.4.1 Pili

O Pili é um componente competitivo muito importante no processo de adesão inicial e colonização da superfície, essencialmente para microrganismos gram-negativos (BOARI, 2008).

O Pili tipo IV é constituído por moléculas de pilina, helicoidalmente organizadas, com 145 a 160 aminoácidos, e localiza-se em uma das extremidades da célula. O tipo de motilidade que ele confere permite ao microrganismo se mover em superfícies do tipo semissólidas, como ágar, e sólidas, como o aço inoxidável. Seu movimento permite a uma microcolônia a expansão radial média de aproximadamente 1 milímetro por hora (BOARI, 2008).

O Pili tipo IV pode se ligar a uma grande variedade de superfícies, sejam elas abióticas (aço inoxidável), bem como bióticas (superfície de outros microrganismos), onde se tem adesão célula-célula. É válido ressaltar que a colonização de superfícies e o deslocamento de microcolônias, onde o Pili tipo IV está presente, é um movimento social, ou seja, envolve o contato célula-célula, orientando-se este por nutrientes e sinalizadores, o que chamamos por quimiotaxia (MATTICK, 2006 *apud* BOARI, 2008).

2.4.2 Flagelos

Os flagelos são de destacada relevância na adesão e colonização de superfícies por microrganismos gram-negativos. Estas organelas, utilizadas para locomoção do microrganismo, são constituídas por unidades de flagelina e emergem por uma extensão da membrana externa, sendo a sua força motora garantida pela diferença de potencial osmótico

de sódio transmembrana e pela degradação de grupos fosfato (GAVÍN *et al.*, 2002 *apud* BOARI, 2008).

Alguns microrganismos apresentam um flagelo polar em meios aquosos. Sem dúvida alguma, esse elemento é de muita importância para o processo de adesão inicial. Porém, após a adesão inicial, inicia-se uma diferenciada expressão gênica, sendo o flagelo polar substituído por um flagelo lateral, o qual confere à célula capacidade maior de se locomover em superfícies sólidas e semissólidas (BOARI, 2008).

2.4.3 Sistema *Quorum Sensing*

O *quorum sensing* (QS) é um sistema de comunicação célula-célula entre bactérias que depende da densidade populacional. As bactérias, nesse sistema, sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, os autoindutores (AIs) bacterianos, que são excretados no ambiente. Quando se atinge uma quantidade crítica desses compostos, as bactérias detectam a presença de um número suficiente ou quorum de bactérias e respondem por meio da ativação ou repressão de certos genes (VIANA, 2006).

As etapas do ciclo de um biofilme requerem um sistema adequado de comunicação célula-célula. A sua fundamental importância consiste na distribuição, na ordenação e na sincronização das atividades dos genomas procariontes, obtidas para a manutenção da relativa homeostase da comunidade microbiana (JOHNSON, 2007 *apud* BOARI, 2008).

Desse modo, o sistema favorece o acesso a nutrientes ou a nichos ambientais mais favoráveis, permite que as bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos, além de aperfeiçoar a capacidade das bactérias de se diferenciarem em formas mais bem adaptadas a sobreviverem em ambientes hostis (VIANA, 2006).

Nos microrganismos gram-negativos, as moléculas sinalizadoras são derivadas da N-acil homoserina lactona (AHL) e sua regulação se dá por meio das proteínas homólogas LuxI e LuxR. A primeira proteína atua como uma enzima (AHL sintetase) e a segunda, quando se liga à AHL, forma o complexo AHL-LuxR, o qual é responsável pela ativação e expressão de inúmeros genes.

Em bactérias gram-positivas, diferentemente de gram-negativas, a comunicação célula-célula ocorre por meio da secreção de pequenos peptídeos (BOARI, 2008).

No caso de gram-negativos, há um amplo espectro de homoserinas lactonas. Os microrganismos produzem constantemente essas moléculas sinalizadoras.

Em baixas densidades populacionais há, proporcionalmente, baixas concentrações desses autoindutores e, por essa razão, talvez não haja seu impacto sobre a expressão genética (KONG *et al.*, 2006 *apud* BOARI, 2008).

Entretanto, quando a densidade populacional de microrganismos se eleva, o mesmo acontece com a concentração de AIs no meio, havendo, assim, influência sobre a regulação gênica (KONG *et al.*, 2006 *apud* BOARI, 2008).

Este processo coordenativo influencia na própria sobrevivência do microrganismo em condições desfavoráveis do biofilme, principalmente no estágio maduro, no qual há limitação na disponibilidade de oxigênio, nutrientes, componentes orgânicos e inorgânicos como o ferro, sendo considerável até mesmo a restrição quanto ao espaço físico (VIANA, 2006).

A importância do QS na organização e na distribuição de atividades entre os indivíduos de um biofilme relaciona-se ao fato de que estes não depositam o EPS de forma a promover o desenvolvimento do biofilme, quando comparado a microrganismos selvagens, tornando-se a estrutura bastante irregular e frágil (BOARI, 2008).

2.5 RESISTÊNCIA DO BIOFILME

A formação do biofilme é uma estratégia de sobrevivência de microrganismos em um ambiente com condições adversas (TRACHOO, 2003), o que provoca uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil.

Devem-se aplicar algumas regras técnicas nos processos industriais de caráter mais preventivo, e deve ser incorporado no sentido de retardar ou mesmo evitar a acumulação de biofilme nos circuitos industriais, como: redução de substâncias orgânicas na corrente líquida; limpeza mecânica frequente; projeto adequado dos equipamentos; implementação de técnicas efetivas de monitorização de biofilmes; inspeção visual constante da acumulação de biofilme e de sinais de corrosão; e implementação de técnicas de tratamento colateral (MACHADO, 2005).

Para prevenir a adesão bacteriana, retardar a formação dos biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação, muitas estratégias ou combinação de estratégias podem ser utilizadas. Num sistema industrial, qualquer processo de controle deve incluir, primeiramente, o controle efetivo dos microrganismos presentes nos circuitos de água, retardando ao máximo a sua deposição nas superfícies (MACHADO, 2005; PEREIRA, 2001).

A higienização é utilizada com o objetivo de preservar a qualidade microbiológica dos alimentos, através do controle e da prevenção da formação de biofilmes, auxiliando na obtenção de um produto que, além de possuir qualidades nutricionais e sensoriais, tenha boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo, assim, risco à saúde do consumidor (CAIXETA, 2008; FORSYTHE, 2002).

Células crescidas em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, uma das quais é o aumento da resistência aos biocidas e agentes antimicrobianos (LECHEVALIER; CAWTHON; LEE, 1988; HOLAH *et al.*, 1990; MOSTELLER; BISHOP, 1993; WALKER; ROGERS; KEEVIL, 1994; EGINTON *et al.*, 1998; TRACHOO, 2003).

Dentre as possíveis explicações para a resistência elevada de biofilmes bacterianos, incluem-se: a difusão limitada de agentes antimicrobianos por meio da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, adaptação genética e outras estruturas da membrana. Ou seja, a resistência ocorre em função de inúmeros fatores inter-relacionados, incluindo atividade metabólica diferencial, barreiras de difusão e ultraestrutura da parede celular (CAIXETA, 2008).

Os microrganismos, quando em forma de biofilme, apresentam resistência aos biocidas. Tal resistência é, em parte, atribuída à matriz polimérica, pois essa parece funcionar como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos, dos quais os biocidas são exemplos (PEREIRA, 2001).

Apesar de todas as precauções que devem ser tomadas, ocorrem momentos onde o desenvolvimento de biofilmes é inevitável. Isso faz emergir a necessidade de implementar outros métodos de controle de biofilmes com o intuito de impedir o estabelecimento dos mesmos, atuando em qualquer uma das fases do seu desenvolvimento (PEREIRA, 2001).

“Estes métodos envolvem técnicas de remoção física de biofilmes, podendo ser aplicados *on-line* ou *off-line*” conforme Bott (1995 *apud* PEREIRA, 2001). A limpeza “*on-line*” não necessita a interrupção dos processos industriais e pode processar-se de forma contínua ou intermitente, requerendo equipamento adicional.

A limpeza “*off-line*” exige a paragem das operações do sistema, sendo por vezes necessário o desmanche dos equipamentos para se aceder ao seu interior, para que a limpeza seja efetiva.

Embora sejam considerados métodos mais eficientes, a implementação de métodos físicos na remoção de biofilmes é dificultada, sendo às vezes impossível, em função das dificuldades de ordem técnica e econômica, que se prendem na estrutura e desenho dos equipamentos e na necessidade de equipamento suplementar (PEREIRA, 2001).

Entretanto, os métodos físicos têm um impacto ambiental reduzido, apesar de a sua implementação causar acrescidos gastos energéticos, que agravarão os custos (MACHADO, 2005).

Nestes métodos aplicam-se substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, propriedades tensoativas e propriedades dispersantes, cujo mecanismo de ação é pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes e pelo enfraquecimento das suas interações (MACHADO, 2005).

Todas as substâncias que possuem uma ou mais zonas ativas capazes de estabelecer interações adversas com componentes celulares em sítios-alvo específicos das células microbianas são considerados agentes antimicrobianos. Comumente, é a concentração da substância química antimicrobiana que determina o modo da ação: se a concentração é baixa para as características do sistema onde é aplicado, então o efeito é de caráter bioestático; se a concentração é elevada o bastante, o agente atuará numa estrutura vital das células e a sua ação classifica-se como biocida (PEREIRA, 2001).

De todos os agentes químicos referidos, os biocidas são as medidas mais usadas em sistemas industriais, ainda que métodos alternativos a sua utilização sejam continuamente alvos de investigação (CAIXETA, 2008; PEREIRA, 2001).

Outros estudos referem também que a menor sensibilidade dos biofilmes aos biocidas ocorre em função de esses poderem reagir com constituintes inorgânicos dos biofilmes a uma velocidade superior à velocidade de difusão do biocida no interior dos biofilmes. Isso acarretaria, por consequência, em uma redução considerável da quantidade de biocida disponível efetivamente para os microrganismos (PEREIRA, 2001).

2.6 MÉTODOS PARA CONTROLE OU ELIMINAÇÃO DO BIOFILME

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define desinfetantes como formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas e apresentam efeito letal sobre microrganismos não esporulados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

Os desinfetantes mais utilizados na desinfecção de superfícies e equipamentos de indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem os princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

As Boas Práticas de Fabricação abordam os princípios, procedimentos e os meios fundamentais favoráveis para a produção de alimentos com qualidade aceitável.

Já as Boas Práticas Higiênicas descrevem as medidas básicas de higiene que os estabelecimentos devem manter. As Boas Práticas foram desenvolvidas por governos, pelo comitê de higiene de alimentos do Codex Alimentarius (FAO/WHO) e por indústrias de alimentos, muitas vezes em colaboração com outros grupos de inspeção e controle (FORSYTHE, 2002).

Para evitar problemas com a saúde e melhorar a qualidade da produção, programas de higiene e sanitização devem ser implantados nas empresas de alimentos, trabalhando assim com condições ideais para obter um ótimo resultado (GALHARDI, 1995).

A higienização é utilizada com o objetivo de preservar a qualidade microbiológica dos alimentos através do controle e da prevenção da formação de biofilmes, auxiliando na obtenção de um produto que, além de possuir qualidades nutricionais e sensoriais, tenha boa

condição higiênico-sanitária, não oferecendo, assim, risco à saúde do consumidor (CAIXETA, 2008; FORSYTHE, 2002).

Higienização: Praticar higiene e limpeza nas indústrias de alimento é uma obrigação, tendo seu início na escolha do local de instalação da fábrica, na elaboração do projeto, instalação de equipamentos, condições da água e eliminação dos resíduos. A higiene tem que ser exercida em todos os setores e com todos os manipuladores (EVANGELISTA, 2000). Higienização é a ação combinatória da limpeza e sanitização.

Limpeza: Segundo Kuaye (1995), podemos definir limpeza como sendo a remoção das contaminações visíveis da superfície, e tem como objetivo livrar as superfícies de substâncias que servem de abrigo e ajudam no desenvolvimento de microrganismos. Uma boa limpeza é responsável por até 99,9% da eliminação de partículas indesejáveis, sendo o 0,1% restante representado pelos microrganismos eliminados somente com sanitizante (GALHARDI, 1995).

A higienização divide-se em duas etapas distintas: limpeza e sanitização. Na limpeza, o objetivo é a remoção de resíduos orgânicos e minerais (proteínas, gorduras e outras sujidades). Na sanitização, procura-se eliminar microrganismos patogênicos a níveis que não comprometam a qualidade higiênico-sanitária do alimento (BRASIL, 2001).

Segundo Rêgo e Faro (2003), existem as seguintes subdivisões nas etapas de limpeza e sanitização:

2.6.1 Etapa Preliminar

É a etapa que visa remover resíduos menos aderentes. Pode-se fazer o uso de escovas ou raspadores rígidos, mas que não danifiquem a superfície (RÊGO; FARO, 2003).

Jatos de água na temperatura de 40° são ideais, pois se muito quente, a água desnatura proteínas, enquanto que a fria provoca a solidificação das gorduras (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.2 Pré-Lavagem

Visa a remoção de resíduos apenas com água. Este processo remove 90% dos resíduos solúveis em água (GERMANO; GERMANO, 2003).

A dureza da água é consequência da alta dissolução na água de bicarbonatos de cálcio e de magnésio. Evangelista divide a dureza da água em dureza temporal, devido à presença de bicarbonatos de cálcio e de magnésio, em que os depósitos formados são facilmente removidos, e a dureza permanente, formada por sulfatos, cloretos e nitratos de cálcio e magnésio, que formam uma crosta difícil de remover e que podem ocasionar a corrosão do equipamento.

2.6.3 Limpeza com Detergente

Caracteriza-se pela utilização de detergentes em contato direto com a sujidade e tem o objetivo de separá-las das superfícies a serem higienizadas, dispersando-as no solvente, bem como prevenir nova deposição sobre as superfícies (GERMANO; GERMANO, 2003).

Esta é a operação mais importante, e depende de se conhecer bem as características do detergente e respeitar as condições de seu emprego (RÊGO; FARO, 2003).

2.6.3.1 Detergentes alcalinos

Os detergentes alcalinos deslocam os resíduos por emulsificação, saponificação e peptização; removem os resíduos protéicos e gordurosos das superfícies, além de terem propriedades germicidas (GERMANO; GERMANO, 2003).

Entre as variações de alcalinos, destaca-se o hidróxido de sódio (soda cáustica), o mais forte entre os agentes alcalinos, de baixo custo, mas muito corrosivo. Tem propriedade saponificante, poder bactericida e é ótimo dissolvente (RÊGO; FARO, 2003).

O metassilicato de sódio é menos corrosivo e não é caustico. Tem boa ação de dispersão e emulsificação, mas geralmente tem alto custo (RÊGO; FARO, 2003).

O ortossilicato de sódio e o sesquissilicato de sódio têm poder saponificante e são efetivos na remoção de proteínas, porem são caros e corrosivos ao alumínio (RÊGO; FARO, 2003).

O carbonato de sódio e o fosfato de trissídico são pouco corrosivos. O primeiro é utilizado pelo seu efeito tampão, que estabiliza o pH, e o segundo é bom saponificante, emulsificante e dispersante, além de amolecer a água (RÊGO; FARO, 2003).

2.6.3.2 Detergentes Ácidos

É efetuada sua utilização quando existe a formação de incrustações minerais como as de água dura, depósito calcário, entre outros.

As soluções ácidas são compostas de ácidos orgânicos e inorgânicos, que podem ser usados individualmente ou em combinações.

Dentre os inorgânicos, destacam-se: clorídricos, cítricos, tartáricos, levulínicos e hidroxiacéticos (RÊGO; FARO, 2003).

2.6.3.3 Detergentes Tenso ativos

São aqueles que modificam a tensão superficial em interfaces líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido. São conhecidos como detergentes sintéticos, umectantes, umedecedores, emulsificantes, entre outros (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.3.3.1 *Detergentes tensoativos aniônicos*

Dissociam-se em solução, sendo íon negativo a forma ativa. Também são usados ésteres de ácido sulfúrico. A parte hidrofóbica é constituída pelos grupos alquil, aril e alquilaril que facilitam a incorporação da gordura, enquanto a parte hidrofílica é constituída de sulfonato e sulfanato. (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.3.3.2 *Detergentes tensoativos catiônicos*

Ao se dissociarem em solução, apresentam íon positivo ativo. São mais eficientes como germicidas do que detergentes. Os compostos de amônio quaternário são seus principais representantes e possuem um par de elétrons não emparelhados, permitindo um ataque eletrofílico (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.3.3.3 *Detergentes tensoativos não-iônicos*

Não se dissociam em solução e podem ser usados juntamente com aniônicos e catiônicos. São usados como detergentes líquidos (RÊGO; FARO, 2003).

Alguns destes compostos formam pouca espuma em solução aquosa, podendo ser usados para melhorar a molhagem dos detergentes ácidos. São compatíveis com tensoativos aniônicos e catiônicos, participando, assim, de diversas formulações (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.3.4 Anfóteros

Substâncias com características de liberação de carga elétrica positiva ou negativa, dependendo do meio em que se encontram (GERMANO; GERMANO, 2003).

São formadas em gel por aminoácidos ligados a um radical alquila, dentre eles o acil dialquil etileno diamina e derivados e ácido N-aquil aminos (RÊGO; FARO, 2003).

2.6.3.5 Agentes Sequestrantes e Quelantes

São os maiores representantes dos sequestrantes. São usados na forma de detergentes, pois evitam a precipitação de sais que podem interferir na operação de limpeza. São exemplos o polifosfato tetrassódico, o hexametáfosfato de sódio e o tetrafosfato de sódio (GERMANO; GERMANO, 2003).

Com relação aos quelantes, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), com sais de sódio e potássio, é o mais importante, sendo capaz de remover Ca, Mg, Fe de soluções com efeito similar aos polifosfatos (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.4 Enxágue

Após a utilização de detergentes, o próximo passo é enxaguar para promover a remoção completa de resíduos suspensos e traços dos componentes de limpeza.

Para remover detergentes alcalinos, recomendar-se a aplicação de algumas gotas de fenolftaleína para avaliar a eficácia do enxágue, devendo a água permanecer incolor, indicando pH inferior a 8.3 (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.6.5 Sanitização

É etapa mais importante no processo de higienização. Seu objetivo é a eliminação de microrganismos patogênicos e a redução de deteriorantes a níveis seguros, nas superfícies de utensílios e instalações. A sanitização pode ser efetuada por meios físicos e químicos, sendo a última opção a mais utilizada (GERMANO; GERMANO, 2003).

Entende-se por sanitizante um agente normalmente químico que mata formas vegetais, mas não necessariamente as formas esporuladas de microrganismos patogênicos (PELCZAR; REID; CHAN, 1980).

A sanitização química é um meio muito empregado, e diversos são os sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, como: compostos à base de cloro, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e quaternário de amônio, e devem ser aprovados através de testes laboratoriais, nas condições recomendadas pelos fabricantes (FIGUEIREDO, 2000).

De acordo com Hayes (1993), um bom sanitizante deve preencher alguns quesitos, como: não ser corrosivo aos materiais encontrados nas indústrias; não ser tóxico e irritante para os manipuladores; ser de fácil enxágue; ser econômico; ter uma ação rápida e ser suficientemente estável para o armazenamento.

O meio físico tipicamente utilizado pela indústria de alimentos é a sanitização térmica, que tem por sua vez um custo elevado, porém é empregada onde a sanitização química não pode ser feita, e normalmente é empregada na forma de vapor ou água quente. A temperatura

da água ou vapor determina o tempo de exposição: quanto mais quente, menor tempo de sanitização, agindo na degradação de algumas proteínas dos microrganismos (GORMEZANO, 2007).

2.6.5.1 Ácido Peracético

De acordo com Germano e Germano (2003), o ácido peracético é o princípio ativo de diversos sanitizantes comerciais. Esses produtos são constituídos de uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante.

Santurio e Alves (1993) explicam a ação antifúngica da mistura: ácido peracético na concentração de 20%, peróxido de hidrogênio a 7% e ácido acético a 19%, que compõem o produto Proxitane. O produto foi diluído de modo a obter soluções finais de 100, 200, e 300ppm em diferentes tempos de exposição, em 10 espécies diferentes do microrganismo.

Encontraram na maioria dos fungos estudados mais de 99% de inibição, com um minuto de exposição a 100ppm. O ácido peracético é um forte oxidante com atuação na parede celular e no interior da célula microbiana, que danifica o sistema enzimático causando a destruição do microrganismo.

Como todo esterilizante, o ácido peracético possui algumas vantagens: a ação em baixas temperaturas, não sendo corrosivo ao aço inox e alumínio em concentrações recomendadas de uso e não requer enxágue da superfície, sendo inodoro na forma diluída. As desvantagens: baixa estabilidade durante a estocagem, irritante à pele, necessitando muitos cuidados com o manuseio do produto, é incompatível com ácidos, álcalis concentrados, borrachas naturais e sintéticas, ferro, cobre e alumínio (SANTURIO; ALVES, 1993).

2.6.5.2 Compostos Clorados

O cloro é largamente utilizado, seja na forma de gás cloro, hipoclorito de cálcio ou sódio, ou produtos liberadores de cloro como dicloroisocianurato de sódio ou potássio, que apresentam vantagens de custo e eficiência (PORTO, 2001).

Com a destruição da cápsula bacteriana de proteção e oxidação do protoplasma celular, exercem a sua ação sanitizante, também formando cloraminas tóxicas que alteram a permeabilidade celular e impedem a regeneração enzimática.

É um dos sanitizantes mais baratos encontrados no mercado, eficaz em diferentes diluições e de fácil preparo e aplicação, porém altamente corrosivo: danifica juntas de peças de borrachas e reage com matéria orgânica, podendo irritar a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores (EVANGELISTA, 2000).

2.6.5.3 Iodóforos

Sua ação é através de seu alto poder de penetração na parede celular, levando à ruptura de proteínas. Usualmente utilizados em concentrações de 30 a 50ppm por um tempo menor ou igual a 10 minutos. São menos irritantes à pele e menos corrosivos aos metais que o cloro, ativos em baixa concentração, estáveis e de fácil preparo. Diminuem a eficiência com a elevação do pH e podem alterar o sabor ou odor dos alimentos, bem como manchar os materiais plásticos, possuem um custo superior ao do cloro e não podem ser utilizados em temperaturas acima de 45°C (EVANGELISTA, 2000).

Um estudo realizado por Monteiro *et al.* (2001), constatou que o iodo, em solução a 1%, é eficiente no combate de bactérias do Grupo Coliforme, como a *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus*; uma contribuição significativa na redução de surtos causados por alimentos erroneamente manipulados.

2.6.5.4 Compostos Quaternários de Amônio – QACs

Em contato com membrana celular dos microrganismos, alteram sua permeabilidade estimulando a glicólise, provocando assim o esgotamento celular.

Possuem a vantagem de serem de fácil preparo e aplicação, neutralizam odores e têm um amplo espectro de ação, com exceção das bactérias gram-negativas. O custo desse composto é elevado, pouco eficiente em meio ácido e em contato com proteínas. Um estudo realizado por Oliveira e Silva (2000), constatou que o composto contendo quaternários de amônia (400ppm do princípio ativo) foi mais eficiente que o composto clorado (50,2ppm) na redução da contaminação por *Salmonella enteritidis* e mesófilos totais.

Como não existem sanitizantes que possuam todas essas características, bem como que atendam a todas as necessidades em um único produto, faz-se necessário uma avaliação rigorosa das propriedades dos mesmos, suas vantagens e desvantagens de utilização antes da escolha final.

A atividade germicida dos sanitizantes utilizados nas indústrias de alimentos depende de algumas condições, como: limpeza prévia do local; monitoração das variáveis físico-química dos sanitizantes; tempo de contato com a superfície; tipo de superfície; espécie e concentração dos microrganismos a destruir (HAYES, 1993).

2.6.6 Avaliação da Eficácia dos Sanitizantes

Conforme informado por Andrade (2008), a avaliação da eficácia dos sanitizantes é um pouco complexa, principalmente pelos fatores que poderão afetá-la. Assim, o tipo de superfície, a concentração dos resíduos, o tipo de microbiota na superfície, o período de contato do sanitizante com a superfície e sua concentração são alguns dos fatores que poderão afetar a eficiência dos sanitizantes.

Uma das formas de se comprovar a eficiência dos sanitizantes é por meio de teste laboratorial da diluição de uso, de capacidade, coeficiente fenólico, teste de esporicida e de suspensão.

Quanto ao teste de diluição, tem o objetivo de determinar a maior diluição do sanitizante que ainda apresenta eficiência bactericida e avaliar as concentrações de sanitizante recomendadas pelo fabricante.

O teste de suspensão avalia a eficiência de sanitizantes na redução de uma população microbiana em suspensão, sob condições práticas de uso, e é recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* para avaliar sanitizantes empregados em superfícies não porosas, previamente limpas, que entram em contato com alimentos.

O teste de coeficiente fenólico serve para avaliar a eficiência dos sanitizantes, em que é feita com a comparação da eficiência de sanitizantes contra uma solução-padrão fenol, ambas atuando sobre células vegetais e bactérias. É um método oficial preconizado pela AOAC (ANDRADE, 2008).

O teste de capacidade é recomendado para avaliar a possibilidade de reutilização de sanitizantes de detergentes após consecutivos contatos com microrganismos e matéria orgânica. Consiste em adicionar determinada quantidade de inóculo à solução sanitizante e ser testado. Depois de contado um minuto, transferir para meio de subcultivo com inativador do agente químico. Depois de trinta segundos, adiciona-se outra quantidade de inóculo da mesma solução sanitizante, inativando-se após o tempo de contato desejado.

O processo se repete atingindo 10 adições consecutivas. Será aprovada no teste a diluição que apresentar crescimento microbiano em no máximo quatro tubos de subcultivo.

O teste esporicida é aplicável a substâncias químicas líquidas e gasosas, por meio do qual se constata a ausência ou presença da atividade esporicida. Para ser classificado como esporicida, o agente químico na concentração, no tempo de contato, deve eliminar os esporos em 118 dos 120 cilindros testados, sendo metade deles com *Bacillus Subtilis* e a outra metade com *Clostridium Sporogeneses*.

Estes dados mostram que a não-utilização de procedimentos higiênicos-sanitários corretos podem levar à contaminação do alimento, aumentando os riscos de uma toxinfecção alimentar. Dessa forma, este trabalho evidencia a importância de se conhecer os cuidados que se deve ter na hora de higienizar equipamentos e utensílios em uma unidade de alimentação e nutrição.

3 CONCLUSÃO

É possível concluir-se que, para se obter um produto com qualidade e segurança, é essencial a erradicação dos biofilmes. Para isso, devem ser considerados os métodos a serem aplicados na remoção de biofilme, já que estão diretamente ligados às contaminações alimentares, comprometendo a saúde do consumidor, bem como acarretando prejuízos para a indústria.

Novos produtos estão surgindo a cada dia no mercado para serem utilizados nas indústrias alimentícias, os quais possuem vantagens, como alta eficiência biocida contra a maioria dos microrganismos; concentrações mais baixas do que os desinfetantes à base de ácido peracético convencionais, eliminando a necessidade de múltiplos desinfetantes e a necessidade de enxágue.

Os responsáveis técnicos têm o dever de saber determinar o uso e a aplicação correta dos sanitizantes, assim como levar em consideração os protocolos de limpeza e sanitização para a remoção correta dos biofilmes, e da mesma forma o monitoramento constante das boas práticas e do ambiente de processamento de alimentos.

Com esses cuidados, serão evitados problemas associados à formação de biofilmes.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J. de. **Higiene na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 2008.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOS, R.; van der MEI, H.C.; GOLD, J.; BUSSCHER, H.J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiol.Rev.**, v.189, p.311-315, 2000.

BRASIL. Instituto da Cidadania, Projeto Fome Zero e Fundação Djalma Guimarães. **Projeto fome zero: uma proposta de segurança alimentar para o Brasil**. 3. ed. São Paulo, 2001.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHAVES, L. da C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2004.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

EGINTON, P.J.; HOLAH, J.; ALLISON, D.G.; HANDLEY, P.S.; GILBERT, P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. **Letters Appl. Microbiol.**, v.27,p.101-105, 1998.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

FDA. Food and Drug Administration. **Food code**: 1997 recommendations of the United States Public Health Service. Washington: United States Department of Health and Human Services, 1997.

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

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002.

GALHARDI, M. G. **Higiene e sanitização para as empresas de alimentos**: manual. São Paulo: SBCTA, 1995.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

GIBSON, H. *et al.* Effectiveness of cleaning techniques used in the removal of bacterial biofilms. **J. Appl. Microbiol**, v. 87, p. 41-48, 1999.

GORMEZANO, L. **Desenvolvimento e implantação de sistema para avaliar a cinética de remoção de resíduos presentes no interior de tubular**. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola de Engenharia Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2007.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

HAYES, P. R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

HAZELWOOD, H. D. **Manual de higiene para manipuladores de alimentos**. São Paulo: Varela, 1994.

HOLAH, J.T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance based surface disinfectant test for food hygiene. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 11, p.255-260, 1990.

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

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.

KECHICHIAN, Viviane. **Adição de ingredientes antimicrobianos em filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KUAYE, A. Y. **Higiene e sanificação na indústria de alimentos**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas - Biblioteca do ITAL, 1995.

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

LAMARDO, L. C. A. *et al.* Legislação em higiene alimentar e suas aplicações. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, p. 68-69, 2000.

LECHEVALIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 649-654, 1988.

LEITE JR., A. F. de S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica da carne de sol, comercializada à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 69, p. 87-92, 2000.

LIMA, J. X.; OLIVEIRA, L. F. O crescimento do restaurante self-service: Aspectos positivos e negativos para o consumidor. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 45-53, 2005.

LUCCHESI, Eliane Gama. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MACHADO, S. M. de O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentadas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de setembro de 1988.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2760-2764, 1998.

MONTEIRO, C. N. *et al.* Controle higiênico-sanitário de manipuladores de alimento de cozinhas industriais do Estado do Ceará. **Higiene Alimentar**, v. 15, p. 90, 2001.

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

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonella em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 655-661, 2000.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia do ar**. São Paulo: Mc Graw-Hill Brasil, 1980. v. 2.

PEREIRA, O. B. de O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 221 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

PORTO, E. **Listeria monocytogenes**: ocorrência em hortaliças resistência aos sanitizantes e sobrevivência em alface minimamente processada e acondicionada em atmosfera modificada. 2001. 187 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current Science**, v. 85, p. 1299-1307, 2003.

PRATA, L. F. Higiene de alimentos e as necessidades contemporâneas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 13-16, 2000.

PROSSER, B. L. T. *et al.* Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 1502-1506, 1987.

RÊGO, J. C. do; FARO, Z. P. de. **Manual de limpeza e desinfecção para unidades produtoras de refeições**. São Paulo: Varela, 2003.

SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. **Avaliação “in vitro” da atividade antifúngica do desinfetante Proxitane**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Micologia, 1993.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of salmonella spp. and listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439-447, 2000.

SMOOT, L. M.; PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of listeria monocytogenes scott a to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1293-1298, 1998.

SOLIS, C. S. Gestão e certificação da qualidade de sistemas alimentares integrados. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 91-98, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 1911-1917, 1997.

TONDO, E. C. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2011.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicotróficas isoladas de leite**. 2006. 159 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

WALKER, J. T.; ROGERS, J.; KEEVIL, C. W. An investigation of the efficacy of a bromine containing biocide on aquatic consortium of planktonic and biofilm microorganisms including legionella pneumophilia. **Biofouling**, v. 8, p. 47-54, 1994.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WONG, A.C.L. Biofilms in food processing environments. **J. Dairy. Sci.**, v.81,p.2765-2770, 1998.

YOKOO, S. *et al.* Aderência e formação do biofilme por Staphylococcus aureus ao polietilenotereftalato (PET) usado como embalagem para acondicionamento de medicamento e cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêutica**, v. 25, p. 37-39, 2004.