

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DA ADESÃO
MICROBIANA EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

ELIANE TINOCO RIBAMAR DA COSTA

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DA ADESÃO
MICROBIANA EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

ELIANE TINOCO RIBAMAR DA COSTA

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROF^a. DR^a. ROSA HELENA LUCHESE

Tese submetida como
requisito parcial para
obtenção do grau de
Magister Scientiae, em
Microbiologia Veterinária

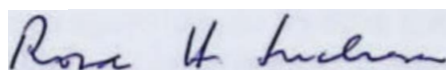
Seropédica, RJ
Setembro de 1999

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DA ADESÃO MICROBIANA EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

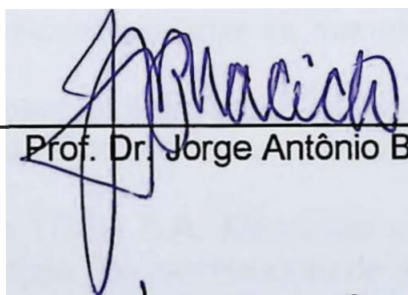
ELIANE TINOCO RIBAMAR DA COSTA

Aprovada em 30 de Setembro de 1999.

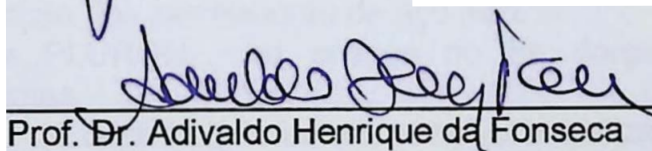
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Rosa Helena Luchese



Prof. Dr. Jorge Antônio B. de Macêdo



Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca

AGRADECIMENTOS

Em função desta tese tive a oportunidade de conhecer muitas pessoas com as quais, além de me oferecer ajuda, tive o prazer de compartilhar de sua sabedoria e, em alguns casos também de sua amizade. A essas pessoas ofereço minha gratidão, pois este trabalho é também fruto das nossas trocas e por isso, também é obra de todos nós.

Entretanto, gostaria de agradecer em especial às seguintes pessoas:

À Prof^a. Rosa Helena Luchese – UFFRJ, pela oportunidade, orientação, incentivo e compreensão dispensadas durante todo esse tempo.

Ao prof. José Francisco Pereira Martins, pela amizade e exemplo de profissional.

Aos funcionários do Laboratório do Departamento de Tecnologia de Alimentos: Lúcia Cabral, Lídia, Edina e Erlene pela paciência e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho. E muito especialmente ao Sr. Mariano que muito pacientemente auxiliou nas análises químicas.

À minha companheira e amiga de laboratório Maria Ivone Martins Jacintho, que sem sua ajuda pouco se teria feito.

Em especial, ao bibliotecário desta Universidade, Melquisedec Nestor pela disposição e carinho que muito contribuiu para esta dissertação.

A todos os amigos do Curso de Mestrado, em especial à Fernanda e Josiane pelo apoio e amizade.

Ao meu companheiro que se manteve atento e compreensivo, mesmo nos piores momentos.

Aos meus pais, a quem muito devo e me sinto no dever de realizar seus sonhos mais sublimes, e cujo amor e incentivo contribuíram na realização deste trabalho.

À empresa TREU S.A. Máquinas e Equipamentos, na pessoa do Sr. Curt Treu, pela confecção dos carregadores de aço inox.

À empresa PLURON, na pessoa do Sr. Jorge Laranjeira, pelas amostras dos sanitizantes.

À CAPES, cuja contribuição tornou possível a realização deste trabalho.

À professora Ângela Lana pelo seu apoio quanto à análise estatística.

BIOGRAFIA

Eliane Tinoco Ribamar da Costa, filha de José Ribamar da Costa e Elisa Tinoco Ribamar da Costa, nasceu em 28 de maio de 1956, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Estudou no Escola Jornalista Orlando Dantas, onde iniciou seus estudos de primeiro grau e os completou no Colégio Estadual Prefeito Mendes de Moraes, RJ. Iniciou e finalizou os estudos de segundo grau no Colégio Sagrada Família, em Blumenau, S.C. Em 1981 ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, graduando-se em 1985. Vem trabalhando desde então com clínica de pequenos animais. Em 1997 iniciou seus estudos de Mestrado em Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Biofilmes.....	16
2.1.1. Formação.....	17
2.1.2. Transporte e adsorção.....	18
2.1.3. Adesão de microrganismos e colonização.....	18
2.2. Potencial de biotransferência x biofilme.....	23
2.3. Métodos de avaliação de adesão microbiana.....	24
2.4. Microrganismos predominantes na indústria de laticínios.....	25
2.4.1. Microrganismos psicrotróficos e suas implicações.....	26
2.4.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.4.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	30
2.4.1.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	31
2.5. Procedimentos gerais de higienização.....	33
2.5.1. Limpeza no lugar/Cleaning in place (CIP).....	37
2.5.2. Fases da higienização.....	37
2.5.2.1. Pré-lavagem.....	37
2.5.2.2. Lavagem com detergentes.....	38
2.5.2.3. Enxágüe.....	38
2.5.2.4. Sanificação.....	39
2.5.2.4.1. Sanificantes químicos disponíveis às indústrias.....	41
2.5.2.4.1.1. Compostos clorados.....	41
2.5.2.4.1.2. Ácido peracético e ácidos percarbóxílicos relacionados.....	43
2.5.2.4.1.3. Compostos quaternários (CQA).....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1. Manutenção dos microrganismos da cultura estoque.....	47
3.2. Preparação da suspensão de células dos microrganismos.....	48
3.3. Padronização do inóculo – Desenvolvimento da curva padrão.....	48
3.4. Preparação das superfícies dos carreadores.....	49
3.5. Preparo das soluções de sanificantes.....	49

3.6. Delineamento experimental.....	50
3.6.1. Adesão bacteriana.....	50
3.6.2. Determinação da eficácia dos sanificantes.....	51
3.7. Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Avaliação da adesão bacteriana.....	54
4.2. Teste de eficiência dos sanificantes sobre as superfícies contaminadas.....	57
5. CONCLUSÕES.....	66
6. SUGESTÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. APÊNDICES.....	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

Quadro 1 - Resíduos do processamento de alimentos e sua remoção.....	21
Quadro 2 - Características dos principais tipos de superfícies usadas nas indústrias de alimentos.....	36
Figura 1 - Carreadores de aço inoxidável, medindo 10 x 20 mm	51
Figura 2 - Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempos em contato com leite 2 % a 25°C	59
Figura 3 - Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempos em contato com leite 2 % a 25°C	59
Figura 4 - Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempos em contato com leite 2 % a 25°C	60
Figura 5 - Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempos em contato com leite 2 % a 25°C	60
Figura 6 - Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempos em contato com leite 2 % a 25°C	61
Figura 7 - Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempos em contato com leite 2 % a 25°C	61

Tabela 1 -	Análise conjunta de variância das médias de UFC/cm ² obtidas com os diferentes sanificantes em diferentes tempos.....	56
Tabela 2 -	Teste de Duncan para as médias de Log (UFC/cm ²) de <i>P. fluorescens</i> em superfícies de aço inox com matéria aderida, tratadas com diferentes sanificantes em comparação à superfície não tratada (controle).....	63
Tabela 3 -	Teste de Duncan para as médias de Log (UFC/cm ²) de <i>P. fluorescens</i> em superfícies de aço inox sem matéria aderida, tratadas com diferentes sanificantes em comparação à superfície não tratada (controle).....	64

RESUMO

Muitas bactérias são capazes de aderir a superfícies de diferentes materiais formando biofilmes. Os biofilmes são, via de regra, indesejáveis não somente do ponto de vista higiênico sanitário, como também podem acarretar diminuição na transferência de calor e diminuir a vazão das tubulações, dentre outros problemas. Nutrientes são normalmente necessários à adesão bacteriana, sendo importantes o intervalo de tempo entre o contato do leite com os equipamentos e a limpeza. Os objetivos propostos nesta pesquisa foram: a) determinar a capacidade de adesão por *Pseudomonas fluorescens* em superfície de aço inoxidável, em presença de leite integral diluído a 2 %; b) verificar o efeito de matéria orgânica previamente impregnada sobre estas superfícies na aderência e colonização por *P. fluorescens* em diferentes intervalos de tempo (8, 24, 48, 72 e 96 horas) e c) determinar a eficácia de três diferentes sanitizantes na redução desta contaminação. Os resultados indicaram que 8 horas de contato da superfície com o meio contaminado foram suficientes para a adesão bacteriana, não tendo sido verificada diferença significativa de contaminação nos diferentes intervalos de tempo ($P > 0,05$). Todos os sanitizantes mostraram maior eficiência na redução da contaminação com *P. fluorescens* em carreadores sem matéria orgânica aderida. O hipoclorito, na concentração de 300 mg/L de cloro residual total, foi o sanificante mais eficaz em carreadores com e sem matéria orgânica aderida, reduzindo o nível de contaminação para menos de 10 UFC/cm² neste último. Nos testes com carreadores sem matéria orgânica aderida, o ácido peracético à 45 mg/L apresentou eficiência equivalente ao hipoclorito, tendo se mostrado menos eficaz em presença de matéria orgânica aderida. O tratamento com quaternário de amônio não se mostrou adequado à sanificação de superfícies de aço inox contaminada com *P. fluorescens*.

ABSTRACT

Bacterial adhesion to surfaces lead to biofilm formation. Most biofilms are undesirable not only due to hygienic and sanitary problems that may cause, but also because might reduce heat transfer on equipment and flow on pipelines. Nutrients are normally necessary to bacterial adhesion, and the time interval between processing and cleaning is important. The objectives of the research were: a) determine the ability of *Pseudomonas fluorescens* to adhere on stainless steel surface in presence of milk diluted to 2% solids.; b) verify the effect of pre-soiling the surfaces with diluted milk on *P. fluorescens* adherence and colonisation at different time intervals (8, 14, 48, 72 and 96 hours) and c) evaluate the effectiveness of different sanitizers to reduce the attached load. Bacterial adhesion were detect within the first 8 hours contact of the surface with the contaminated media, and no significant difference on contamination levels were observed within different time intervals ($P>0,05$). All sanitizers reduce *P. fluorescens* contamination more efficiently in unsoiled surfaces. Hypochlorite treatments at the level of 300 mg/L total chlorine were the most efficient on tests with soiled and unsoiled carriers, reducing the contamination level to less than 10 UFC/cm² in this last one. The performance of peracetic acid at 45 mg/L levels on unsoiled carriers was comparable to chlorine, but diminish when the carriers were pre-soiled. Quaternary ammonium treatment showed not be suitable for sanitation of stainless steel surfaces contaminated with *P. fluorescens*.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos podem ser encontrados em toda a natureza, sendo assim impossível limitar a localização de uma maneira geral. Ao invés disso, é preciso direcionar-se ao controle mais específico de certos grupos de microrganismos, ora gerenciando de que maneiras eles podem beneficiar o homem, ora removendo-os do ambiente quando são prejudiciais, prevenindo-se assim do surgimento de doenças ou da deterioração de alimentos (GUTHRIE, 1983).

A higienização adequada do pessoal, equipamentos e instalações é necessária durante todas as etapas de obtenção dos alimentos como forma de prevenção da contaminação. O alimento deve ficar protegido da contaminação por microrganismos patogênicos, que podem causar enfermidades ao

consumidor, assim como de deteriorantes causadores de alterações que comprometem a qualidade dos alimentos.

Tanto os microrganismos patogênicos quanto os deteriorantes podem ser originados do próprio alimento, da água utilizada no processamento, da poeira, das sujidades, das práticas de manipulação, de insetos e roedores. Tais contaminantes incluem uma variada gama de microrganismos, porém cada tipo de alimento tende a conter determinadas espécies em particular. Apesar da avançada tecnologia na indústria de laticínios, a vida de prateleira do leite pasteurizado ainda é muito curta. A contaminação por microrganismos psicrótrófos pós-pasteurização (CPP) é um fator significativo na sua limitação, além de possíveis falhas durante os procedimentos na higienização.

Resultante dessas falhas, os resíduos de material aderidos aos equipamentos e superfícies tornam-se potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficientemente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, está formado o que se denomina biofilme (COSTERTON et al., 1985; ZOTTOLA, 1994).

O fato de que nutrientes são usualmente necessários para a aderência dos microrganismos às superfícies, correlaciona bem com a noção de que resíduos de leite nos equipamentos podem abrigar microrganismos (INTERNATIONAL, DAIRY AND FEDERATION, 1979). Outros fatores de importância significativa à indústria de laticínios e concernentes à formação de

biofilmes incluem: i) intervalos de tempo entre o contato do leite com os equipamentos e a higienização; ii) eficiência do programa de higienização; iii) qualidade da água e tipo de detergente.

Estes fatores podem não influenciar os biofilmes diretamente, mas afetam a formação de incrustações minerais, denominadas pedras de leite, as quais contribuem para a formação dos biofilmes. Estas incrustações se formam particularmente em superfícies de troca de calor, em temperaturas elevadas, como ocorre com pasteurizadores e concentradores. Proteínas se combinam com sais de cálcio e magnésio e, além de provocar processos corrosivos, são excelentes meios de cultura para o desenvolvimento microbiano. A presença das pedras de leite pode ser evidenciada pelo uso do iodo, que as colore de amarelo (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Além disso, sabe-se que a rugosidade das superfícies facilita a acumulação de microrganismos (DUDDRIDGE e PRITCHARD, 1983). A microbiota do leite assim como a presença de leite nas tubulações são fatores importantes no que concerne à aderência das células.

Os objetivos propostos neste experimento foram: (a) avaliar a possibilidade de acumular biofilmes em presença de leite integral diluído a 2 % por diferentes tempos de contato a 25° C, através da metodologia de sonicação; (b) Verificar o efeito da presença de matéria orgânica impregnada a superfícies de aço inox na aderência e colonização por *Pseudomonas fluorescens* e (c) Avaliar a eficácia da concentração de uso de diferentes sanificantes (hipoclorito de sódio, quaternário de amônio e ácido peracético) na redução da contaminação com *P. fluorescens* sobre esta superfície.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biofilmes

Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície (CARPENTIER E CERF, 1993; SURMAN et al., 1996).

Esta matriz de polímeros extracelulares (EPS) de natureza polissacarídea ou protéica, também conhecida como glicocálix, expõe-se exteriormente à membrana externa das células Gram negativas e ao peptídeoglicano das Gram positivas (COSTERTON et al., 1985), é sintetizada por polimerases, constituindo-se em uma estrutura complexa bem hidratada (COSTERTON apud SURMAN et al., 1996).

Muitas bactérias desenvolvem esta matriz extracelular, que as auxilia aderir firmemente às superfícies e confere proteção ao calor (FRANK e KOFFI,

1990), como também, resistência aos detergentes e agentes antibacterianos (RONNER e WONG, 1993).

Além dessa peculiaridade, bactérias Gram negativas possuem um componente que integra a membrana externa e que é responsável por reações imunológicas. Segundo WILKINSON (apud MASOUD et al., 1995) e WICKEN (1985), o lipopolissacarídeo (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* possui uma arquitetura molecular similar aos membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo composta de uma região de polissacarídeos hidrofílicos ligados ao lipídeo A hidrofóbico via um oligossacarídeo central.

Mesmo em estado de aquiescência as células recebem nutrientes suficientes para mantê-las viáveis. As fibras de polissacarídeos são responsáveis pelo transporte ao interior do biofilme de partículas em suspensão de moléculas minerais e orgânicas (CARPENTIER e CERF, 1993).

2.1.1. Formação

Múltiplos fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície, e dependem não só da fisiologia do microrganismo, mas também da natureza do substrato (SURMAN et al., 1996)

Segundo WICKEN (1985) as células bacterianas, como a maioria das eucariotas, são reconhecidas como possuidoras de carga negativa e de potencial de hidrogênio (pH) em torno de 3. A origem das cargas negativas se deve à química de suas superfícies; nas Gram positivas aos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e aos polipeptídeos e polissacarídeos do glicocálix; nas

Gram negativas, aos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto aos polímeros do glicocálix.

Algumas possuem relativa superfície hidrofóbica e outras, hidrofílicas (MARSHALL, 1985). Como consequência, a hidrofobicidade provê um meio de atração às superfícies sólidas.

2.1. 2. Transporte e adsorção

O transporte de moléculas através das superfícies é feito por difusão, ou em alguns casos por turbulência (CARPENTIER e CERF, 1993).

A interrelação da superfície com a matéria orgânica adsorvida produz alterações na propriedades físico-químicas da superfície, sendo portanto, o primeiro passo para a adesão e posterior formação do biofilme (CARPENTIER e CERF, 1993; SURMAN et al., 1996).

2.1. 3. Adesão de microrganismos e colonização

Durante o processo de adesão, algumas forças estão envolvidas nesta interação entre células vivas e superfícies inertes, quais sejam: forças de Van de Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (OLIVEIRA apud SURMAN et al., 1996).

MARSHALL (1985) descreve uma primeira fase de adesão considerada reversível, na qual as bactérias estão fracamente aderidas à superfície por atração eletrostática e forças de Van der Waals e onde podem ser facilmente removidas; e uma segunda fase, que pode ser considerada

irreversível por depender do tempo de adesão física da célula à superfície por material extracelular, e que carece do emprego de força para sua remoção. De acordo com DUDDRIDGE e PRITCHARD (1983) a formação de biofilmes ocorre em 5 etapas: i) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; ii) transporte de células e nutrientes ao sítio de aderência; iii) adesão reversível das células por atração eletrostática; iv) crescimento bacteriano, colonização e adesão irreversível e v) liberação de células localizadas na periferia.

Uma vez aderidos, os microrganismos que produzem EPS, multiplicam-se no interior desta matriz formada. Esta colonização resulta na formação de um biofilme (CARPENTIER e CERF, 1993).

A maioria dos biofilmes na natureza não são homogêneos, consistindo num variado grupo de organismos com fisiologias e propriedades diferentes de suas contrapartidas planctônicas, em resposta ao pH, oxigênio e nutrientes, crescendo associadas a tubulações, material submerso ou particulado (COSTERTON et al., 1987). No processamento de alimentos, estes depósitos podem ser açúcares, gorduras, carboidratos (p. ex. amido), proteínas ou sais minerais, ocorrendo como depósitos puros ou mistos. Estes depósitos podem queimar e caramelizar, ou secar nas superfícies dos equipamentos, o que aumenta a dificuldade para removê-los. Exemplos de depósitos (resíduos) de alimentos e a dificuldade em removê-los podem ser encontrados no Quadro 1

Estas populações mistas que incluem anaeróbicos e aeróbicos podem conviver num mesmo ecossistema e a interdependência metabólica pode aumentar a resistência ao estresse físico e químico ao qual são expostos (SURMAN et al., 1996). LERICHE e CARPENTIER (1995) avaliaram a resposta ao tratamento com produto clorado em biofilmes formados por *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas fluorescens*, isolados e em associação. Os autores concluíram que *P. fluorescens* mostrou melhor adesão que *S. typhimurium*, mas que a presença da primeira resultou num aumento da resistência ao sanificante pela *S. typhimurium*.

A presença de estruturas morfolologicamente variadas incluindo bastões e cocos em cadeia fixos a tubulações através de apêndices extracelulares (fímbrias) foram observados por LeCHEVALLIER et al.(1987). Além da predominância de *Arthrobacter sp* (20% dos isolado) cobrindo a superfície de encanamentos, outros gêneros associados com sistemas de distribuição de água foram detectados, dentre os quais: *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Achromobacter*. O desenvolvimento de biofilmes por três membros da família *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae* cepa fixadora de nitrogênio, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*, resultou em uma contagem de 10^6 bactérias por cm^2 nas superfícies de tubos e de vidro do reator, após 24 horas (JONES e BRADSHAW, 1996).

QUADRO 1 . Resíduos do processamento de alimentos e sua remoção.

Componente na superfície	Solubilidade	Facilidade de remoção	Mudança com aquecimento
Carbohidrato	Solúvel em água	Fácil	Caramelização – mais difícil limpeza
Gorduras	Insolúvel em água – solúvel em álcali	Difícil	Polimerização – mais difícil limpeza
Proteínas	Insolúveis em água – solúveis em álcali, ligeiramente solúveis em ácido	Muito difícil	Desnaturação – muito mais difícil limpeza
Sais minerais			
• Monovalente	Solubilidade em água e ácidos.	Difícil	Difícil
• Bivalente	Insolúveis em água e solúveis em ácidos	Difícil	Difícil

Adaptado de: Design and uses of CIP systems in the dairy industry, Document nº 117 (International Dairy Federation (1979) e Andrade e Macêdo (1996).

Dentre os fatores que afetam a produção de EPS e por conseguinte a formação de biofilme, encontra-se a dessecação, que favorece à sua síntese (CARPENTIER e CERF, 1993). ROBERSON e FIRESTONE (1992) descreveram que a quantidade de exopolissacarídeos do grupo de tratamento na condição de dessecação começou a aumentar imediatamente sua produção quando o potencial de água diminuiu e que foi capaz de reter uma quantidade de água equivalente a sete (7) vezes a sua massa. No entanto, o teor de proteínas declinou, implicando que a síntese de proteínas assim como

possivelmente de outros componentes da parede celular são desviados para produção de exopolissacarídeos em resposta à dessecação.

Outro fator de grande importância que afeta o desenvolvimento de biofilmes é o nível de nutrientes ao qual são expostos os microrganismos dentro de um sistema. Segundo KIM e FRANK (1995) os resultados obtidos com baixas concentrações de glicose (1g/L) no meio, indicam que o desenvolvimento de biofilme de *Listeria monocytogenes* não foi consistentemente afetado diante das baixas condições do nutriente, apesar da formação lenta observada com baixos níveis de aminoácidos. GILBERT apud PYLE et al. (1994) verificou que *Pseudomonas aeruginosa* requereu três vezes mais fosfato quando o glicerol foi substituído por citrato de sódio como fonte única de carbono.

As características das superfícies e sua influência na fixação de biofilmes têm sido objeto de estudo. Dentre as mais utilizadas nas indústrias de alimento encontramos o aço-inox, teflon e borracha Buna-N. RONNER e WONG (1993) observaram que a resistência aos sanificantes foi fortemente influenciada pelo tipo de superfície e que mesmo sendo o efeito bacteriostático da borracha Buna-N menos pronunciado sobre a *S. typhimurium* quando comparado à *L. monocytogenes*, formaram-se biofilmes em Buna-N de ambos os gêneros mais resistentes que os sobre aço inox.

A capacidade da *L. monocytogenes* de produzir biofilmes sobre superfícies hidrofóbica (teflon) e hidrofílica (aço-inox) em presença de meio de cultura mais complexos foi reduzida quando foi utilizado um meio quimicamente

definido (mínimo de nutriente) e baixa temperatura (BLACKMAN e FRANK, 1996).

A carência de bactérias aderidas ao diâmetro interno das gaxetas de borracha Buna-N, segundo AUSTIN e BERGERON (1995) pode ter origem no envolvimento desta superfície com partículas sólidas do leite. WIRTANEN et al. (1996) realizando experimentos para avaliar a potencial biotransferência microbiana de superfícies no processamento de alimentos, observaram na análise de imagens de teflon e aço-inox que a formação de biofilme por cepas de *Bacillus* foi mais intensa nesse último, e que isto ocorreu muito provavelmente devido ao acabamento da superfície de aço-inox ser rugosa em relação ao teflon. Foram testadas cepas de *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*. As duas primeiras aderiram mais firmemente a superfícies sem resíduos de matéria orgânica, enquanto *B. thuringiensis* aderiu melhor em superfícies contendo resíduos de matéria orgânica, no caso, leite integral.

2. 2. Potencial de biotransferência x biofilme

Potencial de biotransferência pode ser usado para descrever microambientes que não se enquadram na definição clássica de biofilme, mas apresentam risco potencial de contaminação dos alimentos que possam entrar em contato com os mesmos. Um biofilme, por sua vez, é estabelecido quando a massa celular for suficientemente grande para agregar debris, nutrientes e outros microrganismos (ZOTTOLA, 1994). Para que seja considerado biofilme, é necessário um número mínimo de 1×10^7 células aderidas por cm^2

(ANDRADE et al., 1998; PARIZZI, 1998). Entretanto RONNER e WONG (1993) e WIRTANEN et al. (1996) consideraram como biofilme um número de células aderidas 1×10^5 e 1×10^3 por cm^2 , respectivamente.

Outro fator a considerar seria a possibilidade das células continuarem a se multiplicar após a aderência formando microcolônias, que ficariam aprisionadas na matriz polissacarídica. Assim, uma concentração de 1×10^3 células por cm^2 , onde apenas células isoladas são observadas, não se enquadra na definição tradicional de biofilme (HOOD e ZOTTOLA, 1997_b). Entretanto, mesmo que isoladamente, os microrganismos aderidos poderão vir a contribuir para a contaminação dos alimentos. Nestes casos o termo “potencial de biotransferência” proveria uma melhor definição e deveria ser usada quando níveis baixos de células aderidas estão presentes (apud HOOD e ZOTTOLA, 1997_b).

2.3. Métodos de avaliação de adesão microbiana

Na avaliação do processo de adesão bacteriana, em indústrias de laticínios, têm sido empregada algumas técnicas diretas em microscopia, particularmente fluorescente, eletrônica e varredura, ou indiretas como a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC); ou mesmo a determinação através de radioatividade de vestígios bacterianos com uso de um isótopo carreador, utilizada por Suárez em 1991 (CRIADO et al., 1994).

Recentemente a monitoração do desenvolvimento microbiano em biofilmes sobre superfícies evolui para técnicas não destrutivas – uso de emissão

fluorescente e bioluminescente – que permitem a mensuração quantitativa, sem necessariamente destruí-los e também a determinação do nível de biomassa (CENTER, 1999).

2.4. Microrganismos predominantes na indústria de laticínios

A associação de populações microbianas fixadas a superfícies de contato com alimentos sólidos e líquidos pode comprometer imensamente a qualidade desses produtos (LEWIS e GILMOUR, 1987).

Na indústria de alimentos a contaminação é uma ameaça ora devido às superfícies em contato com microrganismos em biofilmes, ora devido à manipulação incorreta ou presença de pragas. Na indústria de laticínios as gaxetas têm sido uma fonte potencial de contaminação (SURMAN et al., 1996).

A análise das superfícies internas de borracha e aço-inox, após os procedimentos de higienização revelaram uma composição genérica de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, onde os Gram negativos predominaram (96-100%), sendo a maioria composta por *Acinetobacter spp* (59,5-75,6%), *Pseudomonas spp* (14-21%) e *Flavobacterium spp* (7-14%) (LEWIS e GILMOUR, 1987). Resultante da sonicação de gaxetas, pedaços de sua superfície liberados conjuntamente com biofilme, indicaram uma composição de vários tipos morfológicos: células Gram positivas saudáveis, que sugerem não terem sido afetadas pelo processo de CIP (Cleaning in Place) e Gram negativas aparentemente não viáveis (KRYNSKI et al., 1992).

2.4.1. Microrganismos psicrotróficos e suas implicações

O armazenamento de leite por longos períodos à temperatura de refrigeração tem resultado em novos problemas de qualidade para a indústria de laticínios devido ao crescimento de bactérias psicrotróficas. Incluem-se bastonetes curtos ou longos, cocos, ou víbrios; Gram negativos ou Gram positivos; esporulados ou não; aeróbicos, anaeróbicos facultativos ou anaeróbicos (COUSIN, 1982). TERNSTRÖM et al. (1993) relataram que 81 amostras de leite cru mantidas a 5° C tiveram uma vida média de apenas 4,2 dias devido a alterações causadas por bactérias Gram negativas. Quanto ao leite pasteurizado, 65% das amostras mantidas à 5° C e 51% das amostras de leite mantidas à 7° C também foram deterioradas especialmente por Gram negativas; e que aproximadamente um terço das amostras de leite pasteurizado e armazenado a 5° C e metade das amostras de leite armazenado a 7° C apresentaram crescimento de bactérias Gram positivas (a maioria, por cepas de *Bacillus*).

Muitos destes microrganismos são produtores de lipases e proteases termo-resistentes que sobrevivem às condições de processamento do leite longa vida (Ultra Alta Temperatura -UHT- no qual o leite é submetido durante 2-4 segundos à temperatura entre 130° C e 150° C, mediante processo térmico de fluxo contínuo e envasado assépticamente) provocando alterações indesejáveis nas propriedades organolépticas e comprometendo a vida de prateleira destes produtos (KUMURA et al., 1993).

Lipídeos, proteínas e compostos organosulfurados de baixo peso molecular são alguns dos componentes de alimentos que podem ser degradados por enzimas endógenas dos alimentos produzindo substâncias que têm uma maior influência no sabor. Destes, os lipídeos são os mais significativos devido a sua vulnerabilidade à degradação por hidrólise e oxidação (ADAMS, 1991). A ocorrência natural de proteases que resistem aos processos de pasteurização e UHT causam gelatinização e sabor amargo sob armazenamento (ADAMS, 1991; BARACH et al., 1975).

Baseando-se na correlação existente entre o número de psicrotróficos e atividade enzimática em amostras de leite refrigerado, GONZÁLEZ et al. (1993), com vistas a uma rápida detecção destes microrganismos, utilizaram o teste imuno-enzimático (ELISA) com anticorpos policlonais contra a proteína F de *P. fluorescens* AH-70 para quantificar a presença deste deteriorante em amostras de leite cru.

Formas esporuladas em leite pasteurizado tornaram-se muito importante devido ao seu crescimento à temperatura de refrigeração (COUSIN, 1982). Algumas espécies de *Bacillus* são psicrotróficas, tendo sido demonstrado que o choque térmico aumenta a taxa de germinação de esporos e acabam crescendo no leite.

2.4.1.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, em forma de bastonete não esporulado e móvel por peritríquios ou flagelo polar (BERGEY'S,

1974). Foi reconhecida como patógeno para seres humanos há 60 anos, mas os alimentos não eram considerados veículos de transmissão deste microrganismo até recentemente. Nos Estados Unidos, estima-se que 1.850 pessoas adoecem com listeriose a cada ano e destes, 425 morrem. Mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos com sistema imunológico debilitado são grupo de risco. Aproximadamente 1/3 dos casos de contaminação por *L. monocytogenes* ocorrem durante a gravidez (IOWA, 1999) .

A *L. monocytogenes* pode ser encontrada na água e no solo. Os vegetais podem ser contaminados. Animais são também portadores da bactéria, mas não desenvolvem a doença e podem contaminar os alimentos de origem animal como carnes e produtos derivados do leite. Pode ser encontrada em uma variedade de alimentos *in natura*, como carnes cruas e vegetais, bem como em alimentos processados devido à contaminação pós-processamento (IOWA, 1999).

É altamente resistente às variações do ambiente tais como salinidade e acidez. Pode crescer em tensões de oxigênio reduzidos e baixas temperaturas, e sobreviver por longos períodos no meio ambiente, em alimentos e nas instalações (HARRIGAN e PARK, 1991). *L. monocytogenes* tem sido isolada de alimentos incluindo leite cru e pasteurizado. Mesmo quando presente em níveis baixos no alimento pode multiplicar-se durante o armazenamento, inclusive à temperatura de refrigeração, mas não sobrevive ao tratamento com calor (MUIR, 1996).

BLACKMAN e FRANK (1996) observaram que após 10 dias de incubação, houve crescimento significativo sobre teflon, apesar da carência de nutriente. KIM e FRANK (1995) verificaram que a redução de água disponível é um fator limitante ao desenvolvimento de biofilmes de *L. monocytogenes*, visto que a acumulação ocorre mesmo em baixos níveis de nutrientes como nitrogênio, fosfato ou açúcar. Os autores concluíram que as superfícies que não podem ser mantidas secas, sejam limpas com frequência. OH e MARSHALL (1995) puderam observar que *L. monocytogenes* aderida ao aço-inox e em presença de meio rico em nutrientes aumentou significativamente sua resistência a um sanificante à base de monolaurato de glicerol, cujo nome comercial é "monolaurin", em relação aquelas células que se desenvolveram em meio mais pobre.

MAFU et al. (apud MAFU et al.,1990) demonstraram que *L. monocytogenes* é capaz de se fixar ao aço-inox, vidro, polipropileno e borracha após um curto período de contato, às temperaturas de 4 e 20° C e que a presença de exopolissacarídeo pode ser observada sobre polipropileno e vidro, às mesmas temperaturas.

MAFU et al. (1990) constataram em seu estudo que *L. monocytogenes* foi mais resistente aos sanificantes (hipoclorito de sódio, quaternário de amônio e iodóforo) quando aderida em superfícies mais porosas, polipropileno e borracha, que nas não porosas, aço inox e vidro.

2.4.1.2. *Bacillus cereus*

São bactérias em forma de bastonete, esporogêneo, móveis por flagelo lateral (BERGEY'S, 1974). As bactérias deste gênero caracterizam-se por uma intensa atividade metabólica, já que produzem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos, o que torna sua identificação muitas vezes difícil (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A presença de *Bacillus cereus* é muito comum em leite cru e uma das maiores fontes de contaminação é o latão. O latão mal lavado, guardado por uma noite antes do uso, estimula a esporulação da forma vegetativa, porque a lavagem dilui nutrientes do leite.

Cepas psicrófilas de *Bacillus spp* foram encontradas em 25 – 35% de 97 amostras de leite cru (SHEHATA e COLLINS, 1971). Estes microrganismos mostraram-se capazes de crescer a temperaturas de 7° C ou mesmo abaixo de 7° C.

Os resultados obtidos por WIRTANEN et al. (1996) demonstraram que cepas de *Bacillus* foram capazes de crescer sobre aço-inox e teflon após os procedimentos de limpeza no lugar (CIP curto – aplicação de detergente alcalino por 7 minutos). Entretanto, mais células foram significativamente removidas quando houve prolongamento da fase alcalina (20 minutos) do tratamento alcalino-ácido (detergentes) e da utilização de ácido etileno diaminotetracético (EDTA).

Espécies de *B. cereus* são apontadas como deteriorante, pois produzem uma enzima com efeitos semelhantes ao da renina, causando o

defeito denominado “coagulação doce” (CRIELLY et al., 1994). Além disso, *B. cereus* e *B. cereus* var. *mycoides* podem causar o defeito “creme amargo” em leite em pasteurizado. É explicado pela produção de enzimas (fosfatases) que hidrolizam a lecitina da membrana do glóbulo de gordura do leite, resultando em agregações de gorduras (COUSIN, 1982, MUIR, 1996).

A maioria de suas cepas é capaz de produzir metabólitos extracelulares, dentre os quais encontram-se a toxina diarréica e a toxina emética, associadas às síndromes gastroentéricas correspondentes e só produzem intoxicação quando presente em número igual ou superior a 10^5 (CRIELLY et al., 1994) ou 10^7 células/g (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Entretanto, o leite parece não ser um bom substrato para produção de toxinas por *B. cereus*, uma vez que os casos de intoxicação por *Bacillus* têm sido detectados em raras ocasiões (MUIR, 1996).

2.4.1.3. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas spp. são bactérias Gram negativas, sob forma de bastonetes curvos ou retos, móveis por flagelo polar, monotríquios ou multitríquios (BERGEY'S, 1974).

Segundo CRAVEN e MACAULEY (1992) o gênero *Pseudomonas* predominou entre as Gram negativas presentes em leite pasteurizado refrigerado às temperaturas de 4 e 7° C (96,2 e 93,0 %). Sendo que *P. fluorescens* correspondeu a 70,5 e 71,3 %, às respectivas temperaturas, dentre outras espécies. E que a exposição aos tratamentos potencialmente letais

(calor, desidratação e sanificação) aplicados no beneficiamento do leite, quando ao invés de destruir os microrganismos só causem danos, pode resultar na recuperação dos mesmos. Isto foi observado pelos autores com relação ao gênero *Pseudomonas* cuja recuperação ocorreu mais rapidamente à temperatura de 7 do que à de 4° C.

O crescimento e a atividade metabólica de *Pseudomonas spp.* originada pela contaminação pós-pasteurização (CPP) é o fator mais determinante na manutenção da qualidade do leite pasteurizado a 72° C por 12 –15 segundos e estocado a 4-7°C. LERICHE e CARPENTIER (1995) obtiveram de seus resultados a temperatura ótima de crescimento para *Pseudomonas fluorescens* como sendo a de 25°C. Entretanto são capazes de crescer acima da temperatura de congelamento (MUIR, 1996).

Representam normalmente no máximo 10 % da microbiota do leite recém coletado. Entretanto é considerado um dos mais importantes psicrotróficos que dominam a microbiota do leite cru ou pasteurizado, durante o armazenamento. Têm uma capacidade elevada para colonizar superfícies, que é provavelmente resultante de sua habilidade de produzir exopolímeros (LERICHE e CARPENTIER, 1995). Tem sido isolada de biofilmes dos sistemas de água potável (BROWN e GAUTHIER, 1993) e sua resistência a iodóforos se deve muito provavelmente à densidade celular.

2.5. Procedimentos gerais de higienização

Segundo ANDRADE e MACÊDO (1996) a higienização visa basicamente a preservação da pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica dos alimentos. Uma das consequências mais graves da má higienização nas indústrias de alimentos é a possível ocorrência de doenças de origem alimentar.

A higienização é dividida em duas etapas bem definidas e com objetivos distintos: limpeza e sanificação. A primeira visa a remoção de resíduos orgânicos e minerais enquanto a segunda busca eliminar patógenos e reduzir saprófitas ou alteradores a níveis seguros (ANDRADE e MACÊDO, 1996; GUTHRIE, 1983).

Reações químicas alcalinas e/ou ácidas são aplicadas dependendo da característica do resíduo (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Estes detergentes, misturados ou não, com ou sem aditivos, são usados para remover gorduras ou outras sujidades e promover a limpeza. Classificam-se conforme sua função em : alcalinos – solubilização das proteínas e gorduras; ácidos – remoção de depósitos minerais; surfactantes – aumentam o poder de molhagem da água, devido a redução da tensão superficial; fosfatos - suspensão de resíduos e deslocamento por emulsificação; complexantes – controle de depósitos (SPRENGER, 1995).

O principal elemento de toda limpeza das instalações de laticínios é a água. As impurezas da água que devem ser consideradas referentes a limpeza são: i) matérias em suspensão que devem ser reduzidas ao mínimo

para evitar depósitos nas superfícies dos equipamentos limpos; ii) a dureza da água (presença de sais de magnésio e cálcio) representam o maior problema no uso dos detergentes (exceto detergente ácido) pela redução da eficiência e pela formação de depósitos; iii) a presença de ferro e sais de manganês acima de 0,3 mg/L podem causar depósitos coloridos (HARPER, 1983). LeCHEVALLIER et al. (1988) estudaram sistemas de distribuição de água potável e observaram a presença de bactérias encapsuladas aderidas às tubulações, sob níveis baixos de nutrientes, após sofrerem processo de desinfecção por derivados clorados.

Para o sucesso da higienização alguns fatores devem ser considerados, como a qualidade do produto, o tipo de produto e de superfície dos equipamento e utensílios. KRYSISNKI et al.(1992) constataram que a resistência de células aderidas de *Listeria monocytogenes* foi dependente da superfície estudada, sendo bem maior sobre poliéster/poliuretano, seguida pelo poliéster e aço-inox. Para MAFU et. al. (1990) a eficiência dos sanificantes testados (hipoclorito de sódio, iodóforos e quaternário de amônio) foi maior em superfícies não porosas como aço-inox e vidro.

As características dos principais tipos de superfícies usadas nas indústrias de alimentos e os cuidados necessários na escolha quanto à sua finalidade podem ser observadas no Quadro 2.

Inclue-se também a energia aplicada durante a limpeza, que pode estar disponível em três formas distintas: energia cinética (física , mecânica e turbulência ou imprimindo velocidade quando aplicada através de líquidos no

Cleaning in Place); energia térmica – proveniente da utilização de água quente e vapor; e energia química – dos detergentes. Normalmente é utilizada uma combinação de duas ou mais formas de energia, sendo o tempo de contato essencial (SPRENGER, 1995; ANDRADE e MACÊDO, 1996).

QUADRO 2. Características dos principais tipos de superfícies usadas nas indústrias de alimentos

Superfície	Características	Cuidados
Madeira	Permeável à umidade, gordura e óleo; difícil manutenção; é destruída por alcalinos	Difícil de higienizar
Aço carbono	Detergentes ácidos e alcalinos clorados causam corrosão. Devem ser galvanizadas (recobertas por Zn)	Zn pode desaparecer com o uso. Zn: absorvido em alimentos ácidos – é tóxico
Estanho	Corroído por alcalinos e ácidos	Superfícies estanhadas não devem entrar em contato com alimentos
Concreto	Danificado por alimentos ácidos e agentes de limpeza	Deve ser denso e resistente a ácidos
Vidro	Liso e impermeável. Danificado por alcalinos fortes e outros agentes de limpeza.	Dever ser limpo com detergente neutro ou de média alcalinidade.
Tinta	Depende da técnica de aplicação. Danificado por agentes alcalinos fortes.	Algumas tintas são adequadas à indústria de alimentos.
Borracha	Não deve ser porosa, não esponjosa. Não afetada por alcalinos fortes. Não atacada por solventes orgânicos e ácidos fortes.	
Aço inoxidável	Geralmente resistente à corrosão; superfície lisa e impermeável, resistentes à oxidação a altas temperaturas; facilmente higienizado tipo 304 (18% Cr e 8% Ni) Tipo 316 (10% Ni e 2% Mo)	É caro. Certos tipos podem ser corroídos por halogênios.
Plástico	Barato, transparentes quando necessário, relativamente resistente à corrosão; podem ser resistentes a ácidos e álcalis; alguns são resistentes à temperatura elevada	Sofrem abrasão Plastificantes apresentam a flexibilidade mas podem migrar para os alimentos (gordurosos)
Cobre e suas ligas	Resistente à corrosão / bom condutor de calor. Induz à oxidação de óleos e gorduras e destruição da Vit. C Descoloração de hortaliças	Absorvido em alimentos ácidos Cobre é tóxico e leva à oxidação de gorduras e pigmentos.
Níquel e cobre (2:1)	Grande resistência à corrosão em presença de salmoura	
Alumínio	Baixa densidade, boa transmissão de calor. Atacado por ácidos, hidróxidos e hipoclorito.	Al é tóxico – Sistema nervoso central

Adaptado de: Andrade e Macêdo (1996)
Sprenger (1995)
Hayes (1993)

2.5.1. Limpeza no lugar/Cleaning in place (CIP)

É o método predominante para limpeza e sanificação de equipamentos que processam alimentos líquidos (RONNER e WONG ,1993). É um sistema automático e permanente para limpeza de equipamentos e tubulações que dispensa desmontagem e que envolve a circulação de detergentes não espumosos e sanificantes (SPRENGER, 1995). Utiliza uma combinação de efeitos químicos e físicos, que incluem os fatores: tempo de contato, temperatura, força e agentes químicos capazes de remover as sujidades das superfícies (HARPER, 1983). Nestes procedimentos de higienização a energia cinética é devida a turbulência e a velocidade imprimida às soluções de limpeza (ANDRADE e MACÊDO, 1996, SPRENGER, 1995).

2.5.2. Fases da higienização

2.5.2.1. Pré-lavagem:

Nesta fase é aplicada somente água com o objetivo de retirar os resíduos presentes nas superfícies. Normalmente ocorre a remoção de cerca de 90% daqueles solúveis em água (HARPER, 1983).

A temperatura ideal de aplicação é de 40° C, porque acima desta, provoca a desnaturação de proteínas, enquanto abaixo, a solidificação das gorduras (ANDRADE e MACÊDO, 1996; GUTHRIE, 1983).

2.5.2.2. Lavagem com detergentes:

A maior importância no uso de sabões e detergentes se deve à atuação de seus componentes que auxiliam a emulsificação e remoção de resíduos das superfícies, provocando redução do nível de microrganismos. Os alcalinos são aplicados com a finalidade de remover os resíduos protéicos e gordurosos enquanto que os ácidos evitam a formação de incrustações minerais em função do alimento e da qualidade química da água (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

2.5.2.3. Enxágüe:

Objetiva a remoção de resíduos de limpeza. Adicionalmente, a remoção de microrganismos é esperada. WIRTANEN et al. (1996) em seu experimento com *Bacillus cereus*, observaram que o enxágüe super quente (70° C/20 minutos) não foi efetivo em eliminar os biofilmes, de onde apenas um pequeno número de células foi removida ou morta.

A avaliação da água de enxágüe é garantida após o uso de cada tipo de detergente: para os alcalinos, o uso de fenolftaleína como indicador de pH, resultando em uma água incolor e com pH abaixo de 8,3; para os ácidos, o uso de metilorange resulta em água amarela, que caracteriza pH próximo à neutralidade (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

2.5.2.4. Sanificação:

Embora a limpeza possa reduzir um grande número de microrganismos, não é suficiente para garantir a qualidade do alimento, uma vez que os fatos evidenciam que uma operação de limpeza insatisfatória pode ser o maior veículo de contaminação do alimentos (SPRENGER, 1995). Portanto com a sanificação visa-se a eliminação de microrganismos patógenos e a redução de deteriorantes destas superfícies. Sua correta aplicação deve ser imediatamente anterior ao uso dos equipamentos e utensílios. Esta etapa da higienização pode ser feita através de agentes físicos ou químicos (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Dentre os agentes físicos estão o vapor quente e a radiação ultra-violeta (comprimento de onda abaixo de 3000 Å/ 2 minutos, atinge somente os microrganismos que estão em seu raio de luz). Quanto aos agentes químicos, são mais adequados para uso nas indústria aqueles que não têm efeito deletério sobre os alimentos, equipamentos ou pessoal (SPRENGER, 1995).

A atuação dos sanificantes químicos se faz por alguns mecanismos sobre as células vegetativas: alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição de sistemas enzimáticos essenciais à célula, destruição da estrutura protéica da parede celular e oxidação de componentes celulares (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Estes mecanismos ficam mais evidentes quando os sanificantes são testados em microrganismos em suspensão o que necessariamente não ocorre aos aderidos sobre superfícies (BEST et al., 1988; RONNER e WONG, 1993; MOSTELLER e BISHOP, 1993). BEST. et al. (1990)

demonstraram que células de *Listeria spp.* aderidas sobre superfícies foram mais resistentes aos desinfetantes do que aquelas em suspensão.

A eliminação de biofilmes é insatisfatória quando são usados somente desinfetantes, ainda que o agente seja eficaz contra células em suspensão. Isto é devido à limitada penetração dos vários desinfetantes em função da presença do glicocálix que serve como uma barreira entre os sanitizantes e as membranas celulares (WIRTANEN et al., 1996).

A limpeza de uma indústria processadora de alimentos deve ser baseada em um planejamento sistemático de modo a evitar a formação de biofilmes. São importantes o “lay out” e o “desing” dos equipamentos, a natureza do material das superfícies em contato com o alimento e os procedimentos de limpeza (ZOTTOLA, 1994; RONNER e WONG, 1993). Em chips de poliéster/poliuretano testados por KRYNSINSKI et al. (1992), além da dificuldade durante a limpeza, nenhum detergente removeu os microrganismos aderidos quando só foi aplicada uma etapa do processo de higienização (limpeza), mas quando seguidos pela sanificação houve efetiva redução da carga microbiana.

O resultado da limpeza CIP observado em superfícies de aço inox foi menos eficiente ao remover biofilmes de três espécies do gênero *Bacillus* quando comparado ao teflon, porque os microrganismos encontravam-se fixados mais firmemente àquela superfície (WIRTANEN et al., 1996).

2.5.2.4.1. Sanificantes químicos disponíveis às indústrias :

2.5.2.4.1.1. Compostos clorados:

Dentre estes compostos orgânicos e inorgânicos, o mais utilizado é o hipoclorito de sódio, que sob forma líquida tem teores de 1 a 10% de cloro residual total (CRT). Sua ação germicida ocorre quando se encontra em solução aquosa por liberação de sua forma não dissociada, o ácido hipocloroso (HClO) (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A concentração de hipoclorito de sódio recomendada para a sanificação de equipamentos na indústria de alimentos varia entre 100-200 mg/L e a faixa ótima durante a sanificação (seja por imersão, circulação, aspersão ou nebulização) se encontra entre 7,5 – 8,5. Entretanto, dependendo da quantidade e tipo de sujidade presente, pH, tempo de contato, temperatura e presença de microrganismos em forma esporulada ou não, sua concentração pode ultrapassar 2.000 mg/L a fim de assegurar a sanificação (SPRENGER, 1995).

Os mecanismos de ação do ácido hipocloroso incluem: i) reação de oxidação das proteínas da membrana celular, formando composto N- cloro tóxicos; ii) responsável por danos à membrana, o que dificulta o transporte de carboidratos e de aminoácidos, podendo resultar no extravazamento de componentes celulares; iii) reação com o DNA, oxidando bases purínicas e pirimidínicas, com paralização da síntese protéica; iv) provoca a descarboxilação oxidativa de aminoácidos formando nitrilas e aldeídos; v) causa aberrações cromossomais e vi) inibição do consumo de oxigênio, que

afeta a fosforilação oxidativa. Apresenta ação bactericida e esporicida, sendo efetivo contra uma grande variedade de microrganismos: bactérias, vírus, leveduras e fungos filamentosos (SPRENGER, 1995).

São instáveis ao armazenamento e inativados por matéria orgânica, precipitam-se em água contendo ferro e sua eficiência diminui com aumento do pH da solução (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

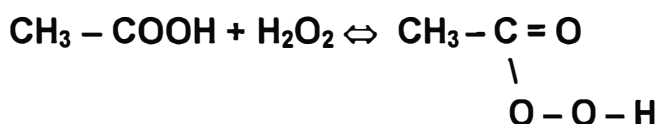
Podem corroer superfícies de aço inox, menos resistentes quando em altas concentrações por longo tempo, e remover carbono de borracha (HARPER, 1983). Segundo SPRENGER (1995), para evitar corrosão o hipoclorito deve ser usado abaixo de 40° C, no máximo de 200 mg/L e com o tempo de contato de 20 minutos. A resistência à corrosão de diversas superfícies é mostrada no Quadro 2.

LeCHEVALIER et al. (1988) pesquisaram a ocorrência de bactérias do grupo coliformes nos sistemas de água constando que a idade do biofilme (7 dias) em superfície vidro e com baixo nível de nutrientes (1 mg de glicose por litro), diminuiu a eficiência do sanificante à base de cloro frente à cepa de *Klebsiella pneumoniae* (encapsulada ou não) quando comparado à monocloramina.

2.5.2.4.1.2. Ácido peracético e ácidos percarboxílicos

relacionados:

O ácido peracético é o princípio ativo de diversos sanificantes disponíveis comercialmente, incluindo em sua composição: peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante conforme equilíbrio a seguir :



Recentemente um novo ácido percarboxílico foi descrito por CORD (apud FATEMI e FRANK, 1999) contendo ácido octanóico equilibrado com sua forma peroxidada (ácido peracético e peróxido de hidrogênio) o que resulta no aumento de sua efetividade. Este sanificante foi denominado ácido peroctanóico (POA).

De uma maneira geral, na indústria de alimentos a concentração recomendada varia entre 300-700 mg/L, age melhor entre pH 2-4 e temperatura até 30° C (ANDRADE e MACÊDO, 1996) .

Devido suas propriedades corrosivas e oxidativas o ácido peracético exige alguns cuidados na escolha dos materiais utilizados. É compatível com o vidro, porcelana, P.V.C., polietileno, polipropileno PTFE (teflon), borrachas butílica e nitrílica, aço inox e alumínio (99,5% em liga com 2 % de magnésio). É incompatível com álcalis, ácidos, metais (ferro, cobre, níquel, titânio, chumbo,

manganês, cromo, prata, zinco, alumínio e suas respectivas ligas) e algumas borrachas naturais e sintéticas (ANDRADE e MACÊDO, 1996; TOMAZELLI et al, 1999).

O ácido peracético apresenta um amplo espectro com ação rápida sobre as bactérias, fungos, vírus, algas e esporos. Oxida os grupos sulfidril e ligações dissulfeto das enzimas microbianas, interrompendo os processos metabólicos. Altera o equilíbrio químico-osmótico da membrana microbiana e ao oxidar a parede celular ocasiona seu rompimento (TOMAZELLI et al, 1999). A eficiência sobre diversos microrganismos se deve portanto à capacidade de oxidar os componentes celulares. Contudo, mostrou-se relativamente ineficaz, contra biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes* aderidas à borracha e teflon (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

O ácido peracético apresenta propriedades físicas diferentes de outros ácidos percarboxílicos (ex.: ácido peroctanóico, perglutárico e perbenzóico), mas a reatividade e propriedade toxicológica são similares (LABORATORY CHEMICAL, 1999). FATEMI e FRANK (1999) verificaram que o ácido peroctanóico foi mais eficiente que o ácido peracético contra células de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas sp.* em biofilme na presença de matéria orgânica.

Devido à instabilidade dos princípios ativos, requer monitoramento para indicar as concentrações individualmente, que é feito através de titulações de volumetria de oxirredução por iodometria e permanganometria.

2.4.2.4.1.3. Compostos quaternários (CQA):

São agentes tensoativos catiônicos que apresentam uma atividade germicida mais relevante do que sua capacidade de atuar como detergente. A concentração recomendada se encontra entre 300-400 mg/L, agindo melhor em pH 9,5 –10,5.

Devido às suas propriedades residuais inerentes, que podem ser vantajosas em certas situações, precisa ser usado com cuidado por determinadas indústrias de alimentos quando esta característica é indesejável (SPRENGER, 1995).

Seus vários mecanismos de ação incluem: inibição enzimática, desnaturação protéica e lesão da membrana citoplasmática, com posterior vazamento dos constituintes celulares (FRANK e KOFFI, 1990). Formam um filme bacteriostático sobre as superfícies. Segundo ANDRADE e MACÊDO (1996) atuam com menos eficiência sobre bactérias Gram negativas como coliformes e psicotróficos, porém sua atividade pode ser aumentada com o uso do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pois esse quebra alguns compostos da parede celular, facilitando a penetração dos CQA pela membrana. Apresentam, no entanto, excelente atividade contra bolores e leveduras.

Por diminuir a tensão superficial da água, apresentam boas características de penetração, tornando-se eficientes em superfícies porosas (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Contudo, mostrou-se menos efetivo perante *Listeria monocytogenes* aderida à borracha Buna-N. (RONNER e WONG,

1993). MOSTELLER e BISHOP (1993) constataram que esta ineficiência se deve à presença de glicocálix, que serve como uma barreira entre o sanificante e as membranas celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no laboratório do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

3.1. Manutenção dos microrganismos da cultura estoque

Utilizou-se cultura de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, obtida da coleção de culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Pública (INCQS / FIO CRUZ) que foi mantida em ágar nutriente inclinado a 4º C, sofrendo transferências a cada dois meses.

3.2. Preparação da suspensão de células dos microrganismos

As culturas estoque em ágar nutriente (Merck 5450) inclinado foram transferidas para caldo triptona de soja (TSB)(Merck 5459), com auxílio de alça de níquel-cromo e incubadas em estufa de 30° C por 24 horas. Foram feitas transferências diárias para ativação das culturas, num total de três. No quarto dia as culturas foram transferidas para ágar triptona soja (TSA)(Merck 1.05458) inclinado e incubadas a 30° C por 18 - 24 horas. A suspensão celular foi obtida através da lavagem da massa celular contida no ágar inclinado com caldo nutriente.

3.3. Padronização do inóculo - Desenvolvimento da curva padrão

A determinação da equação de regressão linear que permite transformar dados de absorbância em números de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, teve como finalidade conhecer a concentração exata do inóculo a ser empregado no experimento envolvendo adesão bacteriana.

A partir da suspensão celular obtida como descrito no item 3.2, foram preparadas as diluições 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 em caldo nutriente. Determinou-se a contagem do número de células de cada um destes pontos por plaqueamento de alíquotas de 0,1 mL de diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1%. Utilizou-se o meio TSA para as sementeiras. As placas foram incubadas em estufa a 30° C, durante 48 horas e logo após, foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Concomitantemente determinou-se o valor de absorbância (densidade ótica) a 580 nm de cada ponto (diluição 1:10, 1:20, 1:50, 1:100) em espectrofotômetro (Spectronic 20- Bausch e Lomb). Estes valores foram plotados em um gráfico de Absorbância x Log_{10} UFC/mL para determinação da equação da reta através de regressão linear simples. A equação e a figura encontram-se no apêndice 2.1 e 2.2.

3.4. Preparação das superfícies dos carreadores

As superfícies testes de aço inox (tipo 304, nº 4) constituíram-se de retângulos de 20 x 10 mm. Estes carreadores foram tratados por imersão em solução NaOH 1N por uma noite e a seguir, lavadas em água corrente até a obtenção de reação neutra com a fenolftaleína (incolor). Os carreadores foram então tratados com solução de ácido nítrico 0,8% e aquecidos a 70° C por 4 minutos. Este procedimento visou simular o empregado na indústria, que recomenda limpeza ácida a 80° C (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Após enxágüe abundante, foram tratados com acetona por 30 minutos e lavados com água destilada esterilizada por duas (2) vezes. Seguiu-se a autoclavagem a 121°C/ 15 minutos dos carreadores imersos em água destilada.

3.5. Preparo das soluções de sanificantes

Todos os produtos testados foram obtidos da PLURON (Marcos de Camargo Farias & Cia. Ltda., Catanduva, SP). As soluções de sanificantes foram preparadas com água destilada esterilizada (pH 6,1) até uma (1) hora antes do

experimento de modo a conter as seguintes concentrações finais: hipoclorito de sódio (PLURON 444-A), solução com 300 mg/L de cloro residual livre em pH 8,8; quaternário de amônio (PLURON 464-A) solução com 350 mg/L de substância ativa em pH 10 e solução à base de ácido peracético (PLURON 461-1) em pH 10, contendo 45 mg/L de ácido peracético e 120 mg/L de peróxido de hidrogênio.

3.6. Delineamento experimental

3.6.1. Adesão bacteriana

Os carreadores foram retirados assepticamente do recipiente contendo água destilada esterilizada com auxílio de garras. Foram usados dois (2) grupos de carreadores, um sem matéria orgânica e outro com matéria orgânica aderida, num total de 80 carreadores para cada experimento. A aderência de matéria orgânica foi obtida pela imersão dos carreadores esterelizados em leite integral a 2% de sólidos. Depois estes foram retirados com pinça e/ou garra esterilizada e colocados para secar em placa de Petri esterilizada durante 30 minutos a temperatura de 45° C (figura 1).

Foram colocados 20 carreadores de cada grupo em frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo volume final de 200 mL de leite integral a 2%, suficiente para que estes ficassem submersos. Inoculou-se com pipeta esterilizada um volume suficiente de suspensão de células, para se obter um inóculo final de 10^6 UFC/mL. Incubou-se por até 96 horas à temperatura de 25° C. A cada 24 horas os carreadores foram transferidos para meio fresco e depois reincubados. Durante estas transferências, as células não aderidas eram removidas dos

carreadores através de rinsagem com solução tampão fosfato. Em intervalos de 8, 24, 48, 72, 96 horas foram retirados 8 carreadores de cada grupo, para determinação da contaminação, sendo que 2 eram para controle (sem tratamento com sanificante).

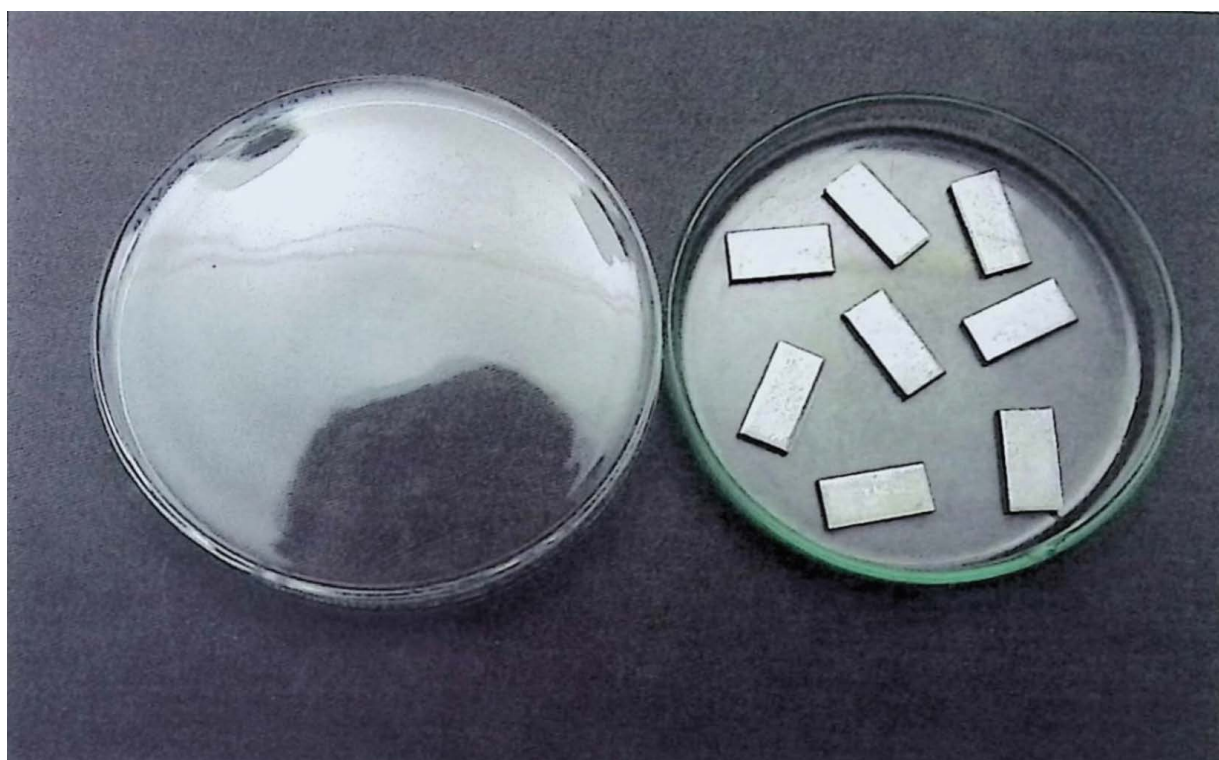


FIGURA 1: Carreadores de aço inoxidável, medindo 10 x 20 mm.

3.6.2. Determinação da eficácia dos sanificantes

Em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de garras esterilizadas, os carreadores foram lavados com solução tampão fosfato e expostos a 10 mL de

sanificante durante 30 segundos a 25° C. Preparou-se controle por exposição à 10 mL de água destilada esterilizada no lugar do sanificante. Primeiramente eram removidos com garra esterilizada os carreadores do grupo sem matéria orgânica aderida, rinsados e colocados em placas de petri esterilizada. O mesmo procedimento era feito com o grupo matéria orgânica aderida. Na mesma ordem os carreadores eram expostos dois a dois aos sanificantes em tubos de ensaio, utilizando-se pinça esterilizada.

Depois de 30 segundos de exposição eram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de caldo Lethen (adicionado de 0,1% de tiosulfato de sódio e 2% de Tween 80 -Reagen- como neutralizantes para hipoclorito de sódio e quaternário de amônio, respectivamente)(Difco 0681-17) e levados ao Banho de Ultrasom (Thornton) por 10 minutos. A contaminação dos carreadores foi determinada por plaqueamento em profundidade em ágar TSA (alíquota de 1 mL) diretamente desta suspensão e de diluições sucessivas em 9 mL de água peptonada 0,1% (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

3.7. Análise estatística

O experimento foi repetido três vezes. Os dados foram analisados pelo Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, U.F.V., Minas Gerais).

O método estatístico constituiu-se da Análise Conjunta de Variância das Médias e da Análise de Variância das Médias para o modelo inteiramente casualizado de experimento em esquemas fatoriais. O teste foi complementado

com aplicação do Teste de Duncan para comparação múltipla das médias e localização das diferenças ao nível de significância de 5% e 1%.

Para a realização da Análise de Variância foram necessários dois testes preliminares: um para estudo da homogeneidade dos erros, empregado-se o Teste de Cochran, e o outro, para o estudo da normalidade dos dados onde foi aplicado o Teste de Lilliefors.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da adesão bacteriana

No presente experimento as contagens dos carreadores não expostos aos sanificantes (controles) atingiu valores de até 1×10^5 UFC/cm² (Figuras 6 e 7) com apenas 8 horas em contato com material contaminado, evidenciando a adesão bacteriana logo nas primeiras horas de incubação e que a superfície utilizada no experimento é capaz de exercer forte influência na atração e adesão por *Pseudomonas fluorescens*.

Segundo RONNER e WONG (1993) *Listeria monocytogenes* desenvolveu biofilme e produziu uma matriz de glicocálix mais intensamente sobre superfícies de aço inox. HOOD e ZOTTOLA (1997_a) puderam observar aderência de células de *Pseudomonas fluorescens* sobre carreadores de aço inox em meios

variados, dentre eles leite desnatado reconstituído a 1%, após 1 hora de inoculação.

Neste trabalho, a presença de matéria orgânica favoreceu a adesão aos carreadores. Em seu trabalho com biofilmes produzidos por 3 diferentes espécies de *Bacillus*, WIRTANEN et al. (1996) verificaram que *Bacillus thuringiensis* aderiu mais firmemente às superfícies impregnadas com leite.

A análise conjunta de variância mostrou que as contagens dos carreadores com matéria orgânica aderida foram significativamente superiores ($P < 0,05$) àquelas obtidas com carreadores sem matéria orgânica aderida (Tabela 1). Entretanto não foi detectada diferença significativa entre as contagens nos diferentes tempos ($P > 0,05$).

Os resultados das figuras 2 a 7 mostram que as contagens obtidas no início e no final do período de incubação foram bastante semelhantes, apenas ligeiramente maiores após 96 horas em relação às 8 horas iniciais. HOOD e ZOTTOLA (1997_a) observaram que a composição do meio de crescimento teve pouca influência na habilidade das bactérias (*Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* e *L. monocytogenes*) aderirem ao aço inox, mas sim o fato das superfícies terem sido ou não pré-condicionadas, isto é, imersas em meio de crescimento por uma hora e depois enxaguadas antes do teste.

TABELA 1. Análise conjunta de variância das médias de UFC/cm² obtidas com os diferentes sanificantes em diferentes tempos.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	P
Total	119	267.6438			
Total Redução	39	213.9725	5.486474	8.18	.0000
SAN *	3	176.5610	58.85367	87.72	.0000
Tempo	4	2.638029	0.6595072	0.98	*****
MO **	1	13.25345	13.25345	19.75	.0000
SAN +Tempo	12	5.181986	0.4318322	0.64	*****
SAN+ MO	3	9.038420	3.012807	4.49	.0058
Resíduo	16	7.299562	0.4562226	0.68	*****
Resíduo	80	53.67130	0.6708913		
Média geral = 2.2097		Coeficiente de variação = 37.068			
*Sanificantes		**Matéria orgânica			

Neste experimento o tempo de 8 horas foi suficiente para a aderência da *Pseudomonas* aos carreadores. O método empregado para determinação da carga microbiana aderida aos carreadores foi a sonicação por 10 minutos, conforme recomendações da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (RUBINO et al., 1992) na metodologia da diluição de uso para teste de eficiência de sanificantes (carreadores em superfície rígida). LERICHE e CARPENTIER (1995) também empregaram este procedimento após certificarem-se que o mesmo é capaz de recuperar células de *Salmonella* em biofilme.

4.2. Teste de eficiência dos sanificantes sobre as superfícies contaminadas

Os testes de eficácia de sanificantes feitos em laboratórios com bactérias em suspensão podem conduzir a falsos resultados, não correspondendo à verdadeira eficiência dos sanificantes sob condições de processamento, onde as células podem se encontrar aderidas (MOSTELLER e BISHOP, 1992).

Em seu experimento testando microrganismos em suspensão, MOSTELLER e BISHOP (1992) verificaram que os mesmos sanificantes aqui empregados foram capazes de reduzir em até 5 ciclos logarítmicos o número de bactérias, dentre elas *Pseudomonas fluorescens*. Entretanto a mesma eficiência não foi alcançada quando se encontravam aderidas a gaxetas de borracha e teflon sob a proteção de um glicocálix intacto.

Todos os sanificantes aqui testados mostraram maior eficiência na redução da contaminação com *Pseudomonas* em carreadores sem matéria orgânica (Figuras 2 a 7).

Comparando-se a atuação do hipoclorito de sódio nas primeiras 8 horas dentro dos dois grupos, pode-se observar que em presença de matéria orgânica aderida o crescimento bacteriano foi significativamente maior ($P < 0,05$).

Quanto ao quaternário de amônio sua eficiência foi a menos evidente especialmente no grupo com matéria aderida, onde algumas vezes não chegou a atingir 1 redução decimal em relação ao controle ($< 1RD$) (Figuras 3, 5 e 7).

Nas primeiras 24 horas as contagens nas sequências experimentais demonstraram reduções de até 5 ciclos logarítmicos ou reduções decimais (5 RD)

em relação ao controle para o hipoclorito de sódio quanto ao grupo matéria orgânica aderida (Figuras 3, 5 e 7).

Para o tempo de 48 horas dentro dos dois grupos de carreadores houve uma melhor atuação do hipoclorito de sódio em relação ao ácido peracético, assim mantendo-se nos períodos de 72 e 96 horas com relação ao grupo com matéria orgânica aderida.

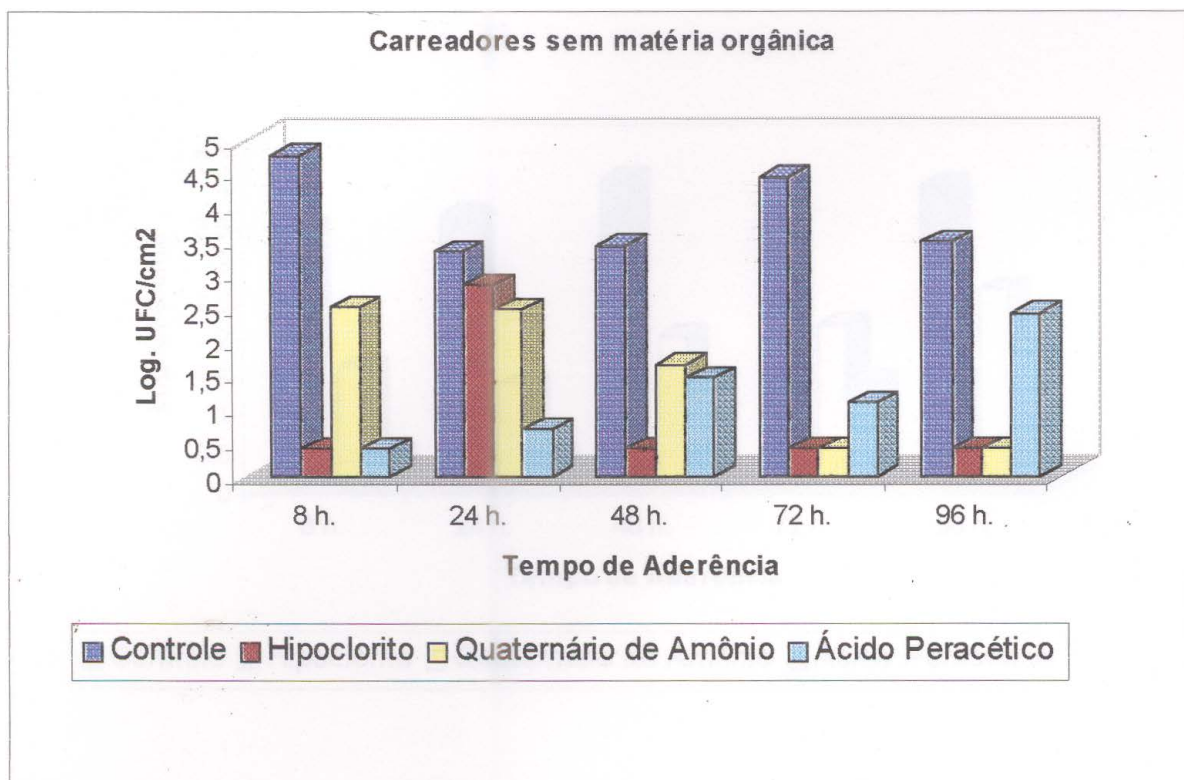


FIGURA 2. Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempo, em contato com leite 2 % a 25°C.(experimento 1)

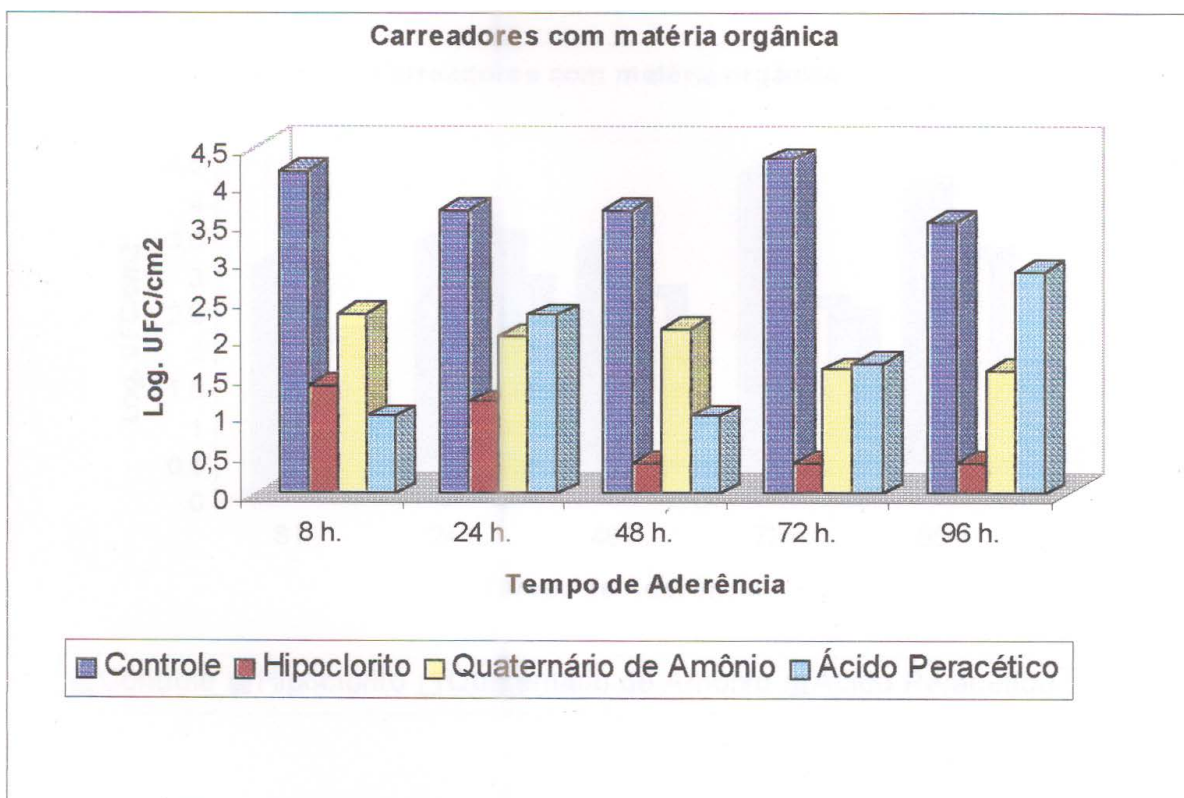


FIGURA 3. Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempo, em contato com leite 2 % a 25°C. (experimento 1)

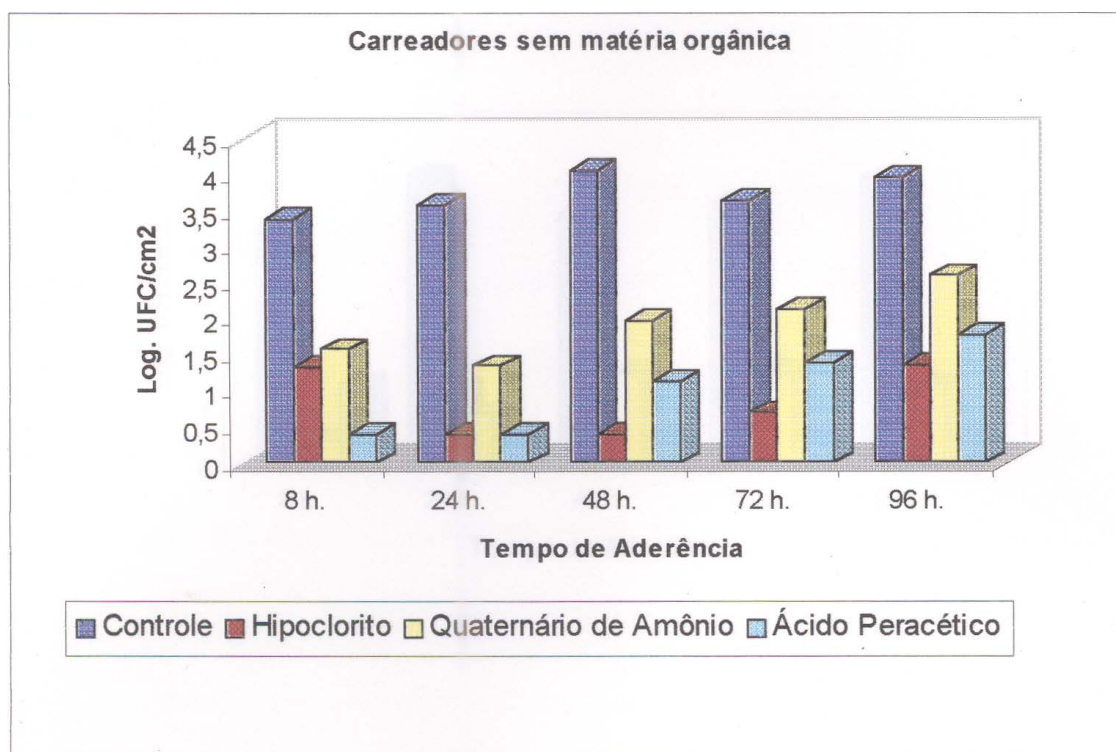


FIGURA 4. Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempo, com leite 2% a 25°C. (experimento 2)

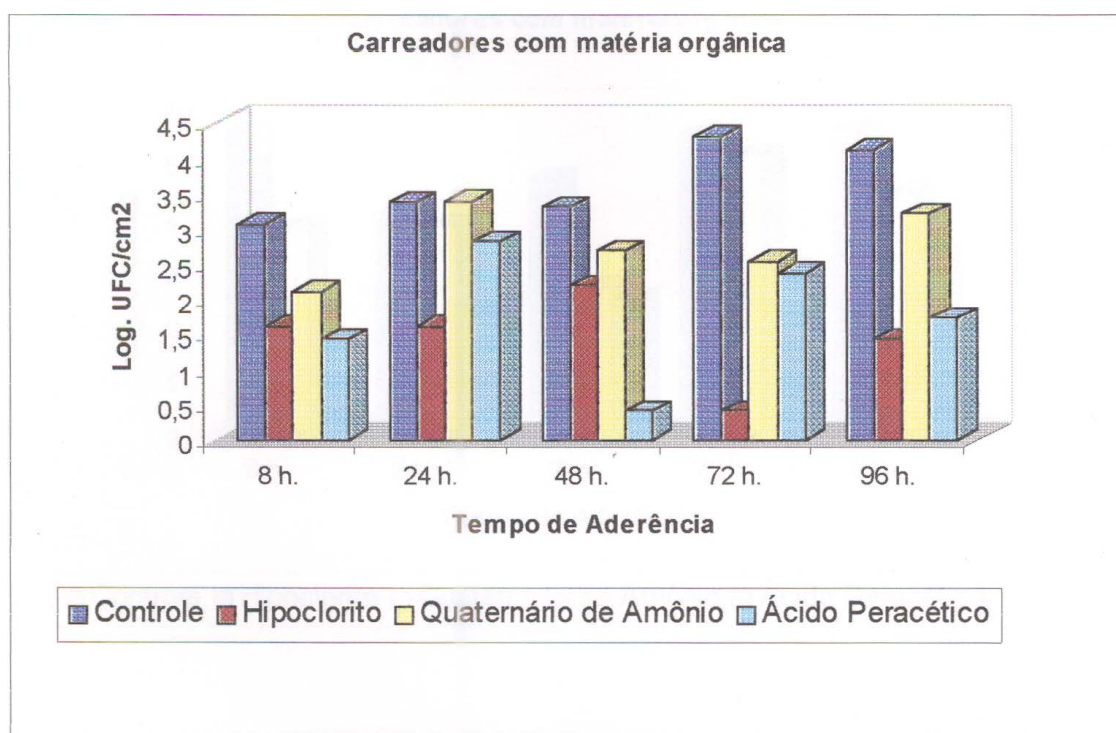


FIGURA 5. Níveis de contaminação dos carreadores em diferentes intervalos de tempo com leite 2 % a 25° C . (experimento2)

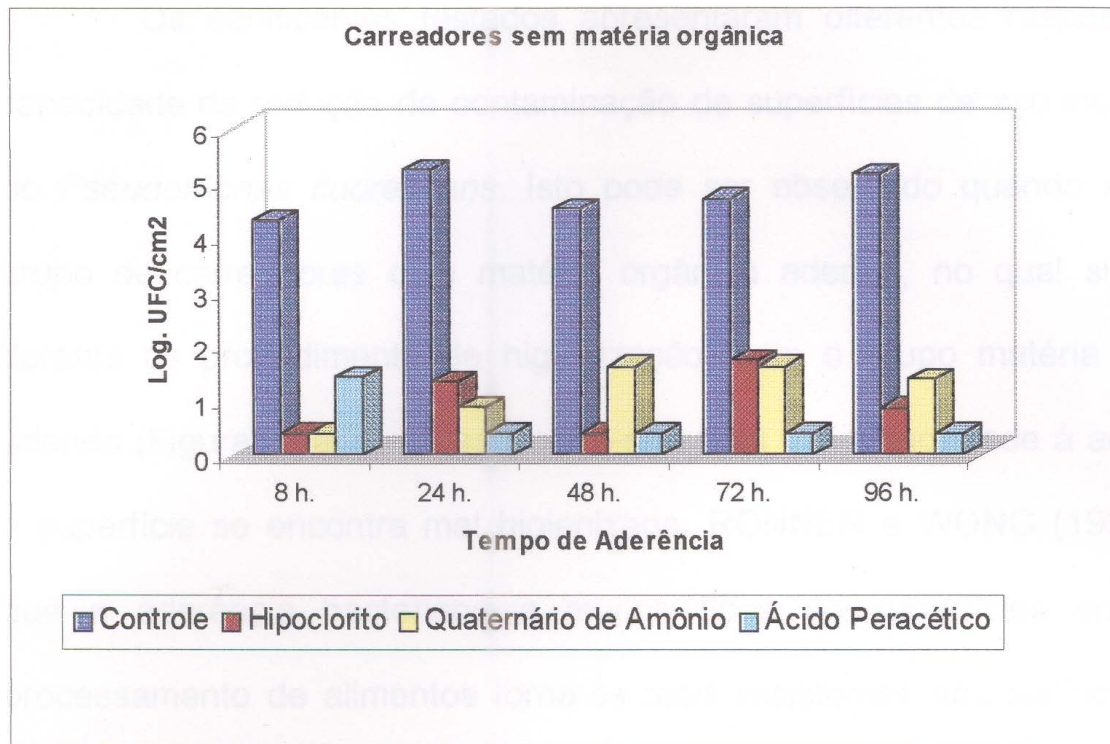


FIGURA 6. Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempo, com leite 2% a 25°C. (experimento 3)

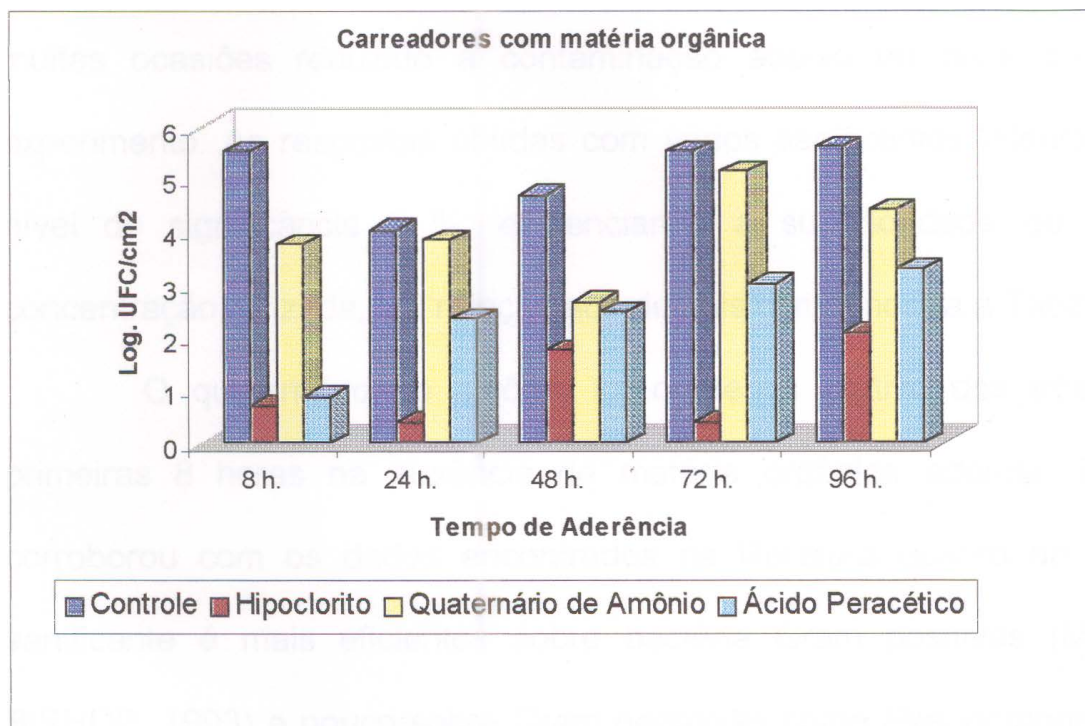


FIGURA 7. Níveis de contaminação dos carreadores após diferentes intervalos de tempo, com leite 2% a 25°C. (experimento 3)

Os sanificantes testados apresentaram diferentes respostas quanto à capacidade de redução da contaminação de superfícies de aço inox com células de *Pseudomonas fluorescens*. Isto pode ser observado quando se compara o grupo de carreadores com matéria orgânica aderida, no qual simula-se falha durante os procedimento de higienização, com o grupo matéria orgânica não aderida (Figuras 2 a 7), pressupondo-se assim maior facilidade à adesão quando a superfície se encontra mal higienizada. RONNER e WONG (1992) sustentam que a aderência bacteriana a muitos tipos de superfícies encontradas no processamento de alimentos torna-as mais resistentes aos sanificantes que em condições planctônicas (em suspensão), e que o comportamento das células de biofilmes é fortemente influenciado pelo tipo de superfície.

Em todas as repetições o hipoclorito de sódio mostrou-se o sanificante mais efetivo nos testes em carreadores com matéria orgânica aderida, tendo em muitas ocasiões reduzido a contaminação abaixo do nível de detecção do experimento. As respostas obtidas com vários sanificantes diferiram entre si ao nível de significância 5 %, evidenciando a superioridade do hipoclorito na concentração utilizada, em relação aos demais como mostra a Tabela 2.

O quaternário de amônia foi o menos efetivo dos três, mesmo nas primeiras 8 horas na ausência de matéria orgânica aderida. Este resultado corroborou com os dados encontrados na literatura quanto ao fato que este sanificante é mais eficiente sobre bactéria Gram positivas (MOSTELLER e BISHOP, 1993) e pouco sobre Gram negativas como *Pseudomonas* e coliformes (GUTHRIE, 1993).

TABELA 2. Teste de Duncan para as médias de Log (UFC/cm²) de *P.fluorescens* em superfícies de aço inox com matéria aderida, tratadas com diferentes sanificantes em comparação à superfície não tratada (controle).

Sanificante	Número de dados	Médias	Comparação
Controle	15	4.2020	A
Quaternário de amônio	15	2.8967	B
Ácido peracético	15	1.9820	C
Hipoclorito	15	1.0873	D

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de significância ($P < 0,05$)

Nos testes com carreadores sem matéria orgânica aderida, o ácido peracético apresentou eficiência equivalente ao hipoclorito (Tabela 3). Em presença de matéria orgânica aderida o desempenho deste sanificante foi menor (Tabela 2), provavelmente devido ao menor poder de oxidação pelo ácido peracético e a baixa concentração utilizada. Segundo MOSTELLER e BISHOP (1993) o ácido peracético a 200 mg/L foi capaz de produzir altas reduções sobre *Pseudomonas fluorescens* e *Yersinia enterocolitica* aderidas a gaxetas de teflon, após 30 segundos de exposição.

Nestes resultados com ácido peracético as reduções obtidas variaram entre 2 a 5 RD nas primeiras horas. Entretanto, nos períodos subseqüentes, as contagens foram geralmente maiores, alcançando valores elevados e portanto uma menor redução em relação ao controle às 96 horas de adesão bacteriana.

TABELA 3. Teste de Duncan para as médias de Log (UFC/cm²) de *P. fluorescens* em superfícies de aço inox sem matéria aderida, tratadas com diferentes sanificantes em comparação à superfície não tratada (controle).

Sanificante	Número de dados	Médias	Comparação
Controle	15	4.1373	A
Quaternário de amônio	15	1.5327	
Ácido peracético	15	0.99480	C
Hipoclorito	15	0.8913	C

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de significância ($P < 0,05$).

Padrões relativos a níveis de contaminação de equipamento de laticínios recomendado pela American Public Health Association (APHA) é de 2 UFC/cm² (apud ANDRADE e MACÊDO, 1996). Os padrões sugeridos por LÜCK (1981) são os seguintes: menos de 10/cm² (bom), entre 10 e 50/cm² (satisfatório) e mais de 50/cm² (insatisfatório). Entretanto, conforme o autor, esses padrões não são considerados estritos o suficiente, pois mesmo contagens de 10 UFC/cm² poderiam causar apreciável redução na vida de prateleira de um produto devido à contaminação pós-pasteurização.

De acordo com esses padrões, apenas os tratamentos com hipoclorito e ácido peracético em carreadores sem matéria orgânica aderida foram, de maneira geral, eficientes na sanificação das superfícies contaminadas. Em algumas ocasiões o tratamento com estes sanificantes resultou em até 5 RD em relação ao controle (Figuras 2, 4 e 6).

Em carreadores com matéria orgânica aderida apenas o sanificante hipoclorito de sódio, provavelmente devido ao seu poder oxidativo e a alta concentração utilizada, foi capaz de reduzir a carga bacteriana a cerca de 10 UFC/cm² em média.

Com base na Análise de Variância os resultados demonstraram que o fator tempo e interação para ambos os grupos analisados não foram significativos, ou seja, o tempo não interferiu na atividade dos sanificantes.

O Teste de Média comparando os três sanificantes e controle demonstrou a existência de interação significativa. O Coeficiente de Variação foi considerado razoável em ambos os grupos.

Os dados obtidos através da análise conjunta demonstraram que existe interação entre sanificantes e matéria orgânica e seu desmembramento para cada grupo de carreadores mostrou algumas diferenças ao nível de significância de 1%. (Tabela 1).

5. CONCLUSÕES

É conclusivo que a existência prévia de matéria orgânica propicia maior aderência das bactérias conforme demonstram os resultados logo nas primeiras horas de contato como o microrganismo.

Em 8 horas de contato dos carreadores com leite a 2% contaminado com *Pseudomonas fluorescens* já foram suficientes para o processo de adesão bacteriana.

Pelo método empregado para determinação da carga microbiana aderida aos carreadores (sonicação), não se constatou diferença significativa de contaminação nos diferentes intervalos de tempo utilizados.

O tratamento com hipoclorito e com ácido peracético reduziu a contaminação dos carreadores sem matéria orgânica aderida a níveis aceitáveis de até 50 UFC/cm² (<10 UFC/cm² em média).

O quaternário de amônio não se mostrou adequado à sanificação de superfícies de aço inox contaminadas por *Pseudomonas fluorescens*.

A menor diluição de uso de ácido peracético recomendada pelo fabricante não atingiu os níveis que consideramos adequado, devendo provavelmente ser aumentada para obtenção do efeito desejado.

Fica evidente a importância que deve ser dada a todas as etapas da higienização diária de equipamentos e superfícies, visto que a eficiência dos sanificantes diminuiu sensivelmente com os carreadores contendo matéria orgânica aderida, neste caso, leite a 2% de sólidos.

6. SUGESTÕES

Comparar a metodologia de sonicação e raspagem com swabb para avaliar a carga microbiana aderida às superfícies, além da utilização de microscopia de varredura e epifluorescência.

Comparar a metodologia de plaqueamento com a de ATP na quantificação da contaminação.

Estudar o processo de adesão por outros contaminantes importantes na indústria de laticínios como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, isoladamente e em associação, e o efeito de sanificantes mais comumente empregados.

Estudar a adesão bacteriana em outras superfícies, como o plástico empregado nas formas para queijo.

Estudar o efeito de concentrações maiores de ácido peracético na redução de superfícies contaminadas por *Pseudomonas fluorescens*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. B. Review: enzyme inactivation during heat processing of food - stuffs. **International Journal of Food Science and Technology**, v.26, p. 1-20, 1991.
- ANDRADE, N. J, MACÊDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 182 p.
- _____, BRIDGEMAN, T. A ., ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n.7, p. 833-838, 1998.
- AUSTIN, J. W., BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 509-519, 1995.
- BARACH, J. T., ADAMS, D. M., SPECK, M. L. Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 3, p. 391-395, 1975.
- BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology**. Willians & Wilkins Company (ed), 1974. 1268 p.

- BEST, M., SATTAR, S. A., SPRINGTHORPE, V. S., KENNEDY, M. E. Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.11, p. 2856 – 2858, 1988.
- _____, KENNEDY, M. E., COATES, F. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 377-380, 1990.
- BLACKMAN, I. C., FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 59, n.8, p. 827-831, 1996.
- BROWN, M. L., GAUTHIER, J. J. Cell density and growth phase as factors in the resistance of a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) to iodine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 7, p.2320-2322, 1993.
- CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 499-511, 1993.
- CENTER FOR ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY. Monitoring microbial biofilm development on surfaces using no destructive techniques. [Http://www.ra.utk.edu/ceb/proj8.htm](http://www.ra.utk.edu/ceb/proj8.htm) [capturado em 06/11/99].
- COSTERTON, J. W., MARRIE, T. J., CHENG, K. J. Phenomena of bacterial adhesion. In: **Bacterial Adhesion**. Savage, D.C., Fletcher, M (eds.) London: Plenum Press, 1985. p. 3-43.
- _____, CHENG, K. G., GEESEY, K. G., LADD, P.I., NICKEL, J. C., DASGUPTA M., MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.
- COUSIN, M.A. Presence and activity of Psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.
- CRAVEN, H. M., MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage 1. Identification of types. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 38-45, 1992.
- CRIADO, M. T., SUÁREZ, B., FERREIRÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v. 48, p. 123-126, 1994.

- CRIELLY, E. M., LOGAN, N. A., ANDERTON, A. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 256-263, 1994.
- DUDDRIDGE, J. E., PRITCHARD A. M. Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. **Proceeding of the Conference on Microbial Corrosion** Teddington: p. 28-35, 1983.
- FATEMI, P., FRANK, J. F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 761-765, 1999.
- FRANCO, B. D. G. DE M., LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. p.33-81.
- FRANK, J. F., KOFFI, R. A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* in associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 7, p. 550-554, 1990.
- GONZÁLEZ, I., MARTÍN, R., GARCIA, T., MORALES, P., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. E. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 394-401, 1993.
- GUTHRIE, R.K. Control of microorganisms. In: **Food Sanitation**. Guthrie, R.K. (ed.), Connecticut: Saybrook Press, 1983. p. 67-95.
- HARRIGAN, W.F, PARK, R.W.A. In: **Making Safe Food**. Harcourt Brace Jovanovich (Publishers), London: Academic Press, 1991. 178 p.
- HAYES, P.R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Ed. Acríbia S.A., 1993. 378 p.
- HARPER, W.J. Sanitation in dairy Food Plants. In: **Food Sanitation**. Guthrie, R.K. (ed.). Connecticut: Saybrook Press, 1983. p. 154-192.
- HOOD, S. K, ZOTTOLA, E. A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1034-1037, 1997_a.
- _____, _____. Isolation and identification of adherence Gram-negative microorganisms from four meat-processing facilities. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1135-1138, 1997_b.

INTERNATIONAL, DAIRY and FEDERATION. Desing and use of CIP systems in the dairy industry (IDF Document 117). Brussels: **International Dairy Federation**, 1979.

IOWA STATE UNIVERSITY. What is *Listeria monocytogenes*? <http://www.exnet.iastate.edu/pages/families/fs/listeria.html> [capturado em 31/05/99].

JONES, K., BRADSHAW, S. B. Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: a comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 458-464, 1996.

KIM, K. Y., FRANK, J. F. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 24-28, 1995.

KRYSINSKI, E. P., BROWN, L. J., MARCHISELLO, T. J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 4, p. 246-251, 1992.

KUMURA, H, MIKAWA, K., SAITO, Z. Influence of milk proteins on the thermostability of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* 33. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2164-2167, 1993.

LABORATORY CHEMICAL SAFETY SUMMARIES. Peracetic acid (and related percarboxylic acids). <http://www.grccom/hhmi/science/labsafe/lcsstx68.htm>. [capturado em 09/11/99].

LeCHEVALIER, M. W., BABCOCK, T. M., LEE, R. G. Examination and characterization of distribution system biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2714-2724, 1987.

_____, CAWTHON, C. D., LEE, R. G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, 649-654, 1988.

LERICHE, V., CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single-and-binary-species biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1186-1191, 1995.

LEWIS, S. J., GILMOUR, A. Microflora associated with the internal surface of rubber and stainless steel milk transfer pipeline. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 327-333, 1987.

- LÜCK, H. Quality control in the dairy industry. In: **Dairy Microbiology**, v. 2, Robinson, R.K., (ed), London: Applied Science Publishers.1981.
- MAFU, A. A., ROY, D., GOULET, J., SAVOIE, L., ROY, R. Efficiency of Sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. **Journal of Dairy Science**, v.73, n. 12, p. 3428-3432, 1990.
- MARSHALL, K. C. Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In: **Bacterial Adhesion**. Savage, D.C., Fletcher, M. (eds.), London: Plenum Press, 1985. p. 133-161.
- MASOUD, H., SADOVSKAYA, I., de KIEVIT, T., ALTMAN, E., RICHARDS, J. C. , LAM, J. S. Structural elucidation of the lipopolysaccharide core region of the O-chain-deficient mutant strain A28 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype 06 (International antigenic typing scheme). **Journal of Bacteriology**, v.177, n. 23, p. 6718-6726, 1995.
- MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 1, p. 34-41, 1993.
- MUIR, D. D. The self-life of dairy products 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n.1, p. 24-27, 1996.
- OH, D-H., MARSHALL, D. L. Destruction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel using monolaurin and heat. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 3, p. 251-255, 1995.
- PARIZZI, S. Q. F. Adesão bacteriana em superfícies de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência. **Tese de M. S. Universidade Federal de Viçosa**, MG, Brasil, 1998.
- PYLE, B. H., WATTERS, S. K., McFETERS, G. A. Physiological aspects of disinfection resistance in *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 142-148, 1994.
- ROBERSON, E. B., FIRESTONE, M. K. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1284-1291, 1992.
- RONNER, A. B., WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

- RUBINO, J. R., BAUER, J. M., CLARKE, P. H., WOODWARD, B. B., PORTER, F. C., HILTON, H. G. Hard surface carrier test for efficacy testing of disinfectants: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.75, n. 4, p. 635-641, 1992.
- SPRENGER, R. A. The desing of equipment. In: **Hygiene for management**, Doncaster: Highfield Publications,1995. 367 p.
- SHEHATA, T. E., COLLINS, E. B. Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 21, p. 466-469, 1971.
- SURMAN, S., MORTON, G., KEEVIL, B. Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest**, v. 13, n. 1, p. 33-38, 1996.
- TERNSTRÖM, A., LINDBERG, A. M., MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 25-34, 1993.
- TOMAZELLI, I. B., SANTOS, I. R., SCARATTI, D. Eficiência do ácido peracético, álcool iodado e clorhexidina na desinfecção das mãos. **Boletim Técnico – Atualidades em Alimentos e Bebidas**. Vassouras, v. 8, n. 1/2, 1-4, jan./jun., 1999.
- WICKEN, A. J. Bacterial cell walls and surfaces. In: **Bacterial Adhesion**. Savage, D.C.; Fletcher, M (eds.). London: Plenum Press, 1985. p. 45-70.
- WIRTANEN, G., HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.
- ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry ? **Food Technology**, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.

APÊNDICE 1.1. Meios de cultura:

a) CALDO NUTRIENTE

Extrato de carne (Oxoid).....5g
 NaCl (Merck).....5g
 Peptona de carne obtida por
 digestão péptica (Merck 7224).....10g

Dissolver os componentes em 1 L de água destilada, ajustar para pH $7,0 \pm 0,2$. Autoclavar a 121°C/15 minutos.

b) ÁGUA PEPTONADA A 0,1 %

Peptona (bacto peptona Difco).....1,0g
 Água destilada.....1000,0mL

Dissolver a peptona em água destilada. Distribuir em tubos de 9,0 mL e autoclavar a 121°C/15 minutos. pH final $7,0 \pm 0,2$

APÊNDICE 1.2. Reagentes:

a) SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO (0,25 M)

Fosfato de potássio monobásico P.A.
 ($\text{K H}_2 \text{PO}_4$)(Vetec).....34,0g

Dissolver 34,0g de $\text{K H}_2 \text{PO}_4$ em 500 mL de H_2O destilada, ajustar pH 7,2 com Na OH 1N e diluir em 1L. Autoclavar a 121°C/15 minutos.

c) TIOSULFATO DE SÓDIO 0,1 % (Merck 65161)

Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).....0,1g
 Água destilada.....qsp 100,0 mL

APÊNDICE 1.3. Titulação

1.3.1. Determinação da concentração de cloro residual livre por iodometria:

Pipetar em erlenmeyer 50 mL da solução de hipoclorito , adicionar 5 mL de ácido acético glacial e 5mL de iodeto de potássio a 15 % , recentemente preparado. Titular com tiosulfato de sódio 0,1 N padronizado, até que a cor marrom amarelo quase desapareça. Adicionar 5 gotas de solução de amido recentemente preparada e continuar a titulação até o desaparecimento da cor azul.

Cálculo:

mg/L Cl_2 = 70,9 x fc x V = 300 mg/L de cloro residual livre

fc = fato de correção do tiosulfato: 0,9627

V = volume de tiosulfato gasto na titulação: 4,5 mL

1.3.2. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio e ácido peracético por iodometria e permanganometria:

Procedimento (Henkel S.A.):

1. Resfriar a amostra a cerca de 10° C e pesar analiticamente 0,5 a 0,8 g num erlenmeyer que já contenha aproximadamente 30 mL de água destilada.
2. Adicionar 20mL de H_2SO_4 = 1:3
3. Titular com KMnO_4 0,5 N até a coloração levemente rosada. Anotar volume gasto em mL (P).
4. Adicionar 10 mL de KI 10% e 1 mL de solução de amido.

5. Titular rapidamente com solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N, até desaparecer a coloração azul. Anotar o volume gasto em mL (T).

Cálculo:

$$1. \% \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{P \times f \times 0,17}{P.A} \quad (\text{Peróxido de hidrogrogênio}) = 11,73\% \text{ no produto concentrado}$$

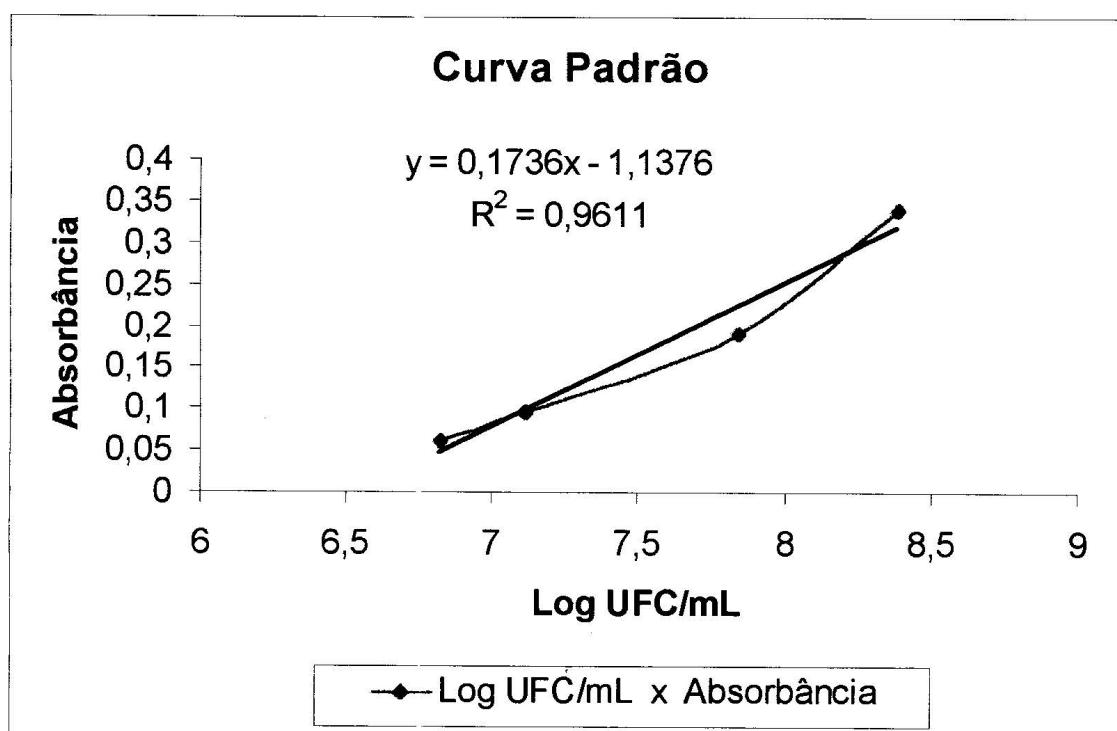
$$2. \% \text{CH}_3 \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} \text{COOH} = \frac{T \times f' \times 0,38027}{PA} \quad (\text{Ácido peracético}) = 4,46\% \text{ no produto concentrado}$$

Sendo:

- P = volume gasto de KMnO_4 0,1 N (mL) : 25 mL
 T = volume gasto de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N (mL) : 5,9 mL
 f = fator de correção do KMnO_4 : 1,381773
 f' = fator de correção do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 0,9943
 PA= peso da amostra em gramas: 0,5 g

APÊNDICE 2.1. Valores de Log UFC/mL e absorbância correspondente

Diluição	Log UFC/mL	Absorbância
1:10	8,38	0,34
1:20	7,84	0,19
1:50	7,11	0,095
1:100	6,82	0,06

APÊNDICE 2.2. Curva padrão para *Pseudomonas fluorescens*


APÊNDICE 3.1. Análise de variância das médias de UFC/cm² obtidas com os diferentes sanificantes em diferentes tempos. *

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	P
Total	59	132.5444			
Total de Redução	19	110.0794	5.793652	10.32	0.0000
SAN	3	105.9338	35.31126	62.87	0.0000
Tempo	4	0.4816232	0.1204058	0.21	*****
SAN+ Tempo	12	3.663977	0.3053314	0.54	*****
Resíduo	40	22.46500	0.5616251		

Média Geral = 1.8773

Coefficiente de variação = 39.919

*Grupo sem matéria orgânica aderida

APÊNDICE 3.2. Análise de variância das médias de UFC/cm² obtidas com os diferentes sanificantes em diferentes tempos. *

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	P
Total	59	121.8460			
Total de Redução	19	90.63963	4.7705507	6.11	0.0000
SAN	3	79.66566	26.55522	34.04	0.0000
Tempo	4	2.606861	0.6517153	0.84	*****
SAN+ Tempo	12	8.367114	0.6972595	0.89	*****
Resíduo	40	31.20632	0.7801580		

Média Geral = 2.5420

Coefficiente de variação = 34.747

*Grupo com matéria orgânica aderida