

ROBERTA TORRES CARELI

**ADESÃO DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPERFÍCIES
UTILIZADAS NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C271a
2005

Careli, Roberta Torres, 1975-
Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies
utilizadas no processamento de alimentos. / Roberta Tor-
res Careli. - Viçosa: UFV, 2005.
xiv, 65f : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referência bibliográfica: f. 54-63

1. Bactérias - Adesão. 2. *Pseudomonas fluorescens*.
3. Química de superfície. 4. Alimentos - Preparo. 5.
Microscopia de epifluorescência. 6. Contagem de placas I.
Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 589.95

ROBERTA TORRES CARELI

**ADESÃO DE *Pseudomonas fluorescens* EM SUPERFÍCIES
UTILIZADAS NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Aprovada em: 27 de julho de 2005.

Prof^a Regina Célia Santos Mendonça

Prof. Frederico José Vieira Passos

Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti

Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

A Deus,
Pela presença insubstituível em
cada instante da minha vida,
Dedico.

À Nossa Senhora,
Pela sua proteção de mãe
e por estar comigo em todos os momentos,
especialmente nos mais difíceis,
Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus Uno, Trino e Santo, por caminhar comigo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos pais, fonte de inesgotável amor e compreensão, aos quais devo todas as minhas conquistas, pelo incentivo, pela dedicação e apoio sempre presentes.

À minha irmã Renata, pela presença sempre amiga e pelo incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso e pelo aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Nélio José de Andrade, pela orientação, pela amizade, pelos ensinamentos e por todo apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. José Ivo Ribeiro Júnior, pela ajuda valiosa e pelos ensinamentos.

À Prof^a Nilda de Fátima Ferreira Soares, pelos oportunos esclarecimentos.

À Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti, pela disponibilização da cultura bacteriana, pelos ensinamentos e pelas sugestões.

Ao Prof. Frederico José Vieira Passos pelos ensinamentos, esclarecimentos e pelas sugestões.

À Prof^a Regina Célia Santos Mendonça pelas sugestões.

À Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pelos ensinamentos e pelas sugestões.

Ao Prof. Sebastião César Cardoso Brandão, por permitir a utilização do microscópio de epifluorescência.

À Dr^a Cláudia Alencar Vanetti, técnica do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela ajuda, pelos ensinamentos e esclarecimentos.

À Prof^a Luciana Leal Oliveira de Farinã pela amizade e pelo incentivo.

Ao Luciano Lima, pela importante ajuda.

À todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente José Tomaz (Perereca), Lúcia, Pio, Geralda, Vaninha, Juarez, Sr. Manoel, Sr. Luiz e Adão.

Aos colegas Maurílio e Uelinton, pela troca de conhecimentos.

Às estagiárias Marcília, Patrícia e Lívia, pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Arthur, Aurélia, Cleuber, Fernanda, Sílvia, Maraísa e Daniel, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

À querida amiga Eliana Figueiredo, pela valiosa amizade, pela ajuda e por todos os conselhos.

Ao meu cunhado Marcelo, pela amizade e incentivo.

Às amigas de longa data, Janete e Luciane, por todos os momentos compartilhados.

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

BIOGRAFIA

ROBERTA TORRES CARELI, filha de João Bosco Careli e Miriam Carvalho Torres Careli, nasceu em São Paulo, Estado de São Paulo, em 17 de novembro de 1975.

Em maio de 2002, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade de Viçosa.

Em agosto de 2003 ingressou no Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2005.

ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Adesão bacteriana.....	3
2.1.1. Fatores que afetam a adesão bacteriana.....	4
2.2. Biofilmes bacterianos.....	6
2.3. Superfícies utilizadas no processamento de alimentos.....	13
2.4. Técnicas para a determinação da adesão bacteriana.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Superfícies avaliadas.....	24
3.2. Microrganismo e meios de cultura utilizados.....	25
3.3. Determinação da adesão bacteriana.....	25
3.4. Determinação do número de células aderidas.....	26
3.4.1. Contagem padrão em placas (CPP).....	26
3.4.2. Microscopia de epifluorescência (EPF).....	27
3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
3.6. Delineamento experimental.....	28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Adesão de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em diferentes superfícies de processamento	30
4.2. Grau de adesão de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em função das superfícies de processamento	35
4.3. Avaliação das técnicas EPF e CPP para a determinação das células aderidas às superfícies.....	48
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. APÊNDICE	64

LISTA DE QUADROS

- 1 Dimensões dos cupons das superfícies usados na adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 1352525

LISTA DE TABELAS

- 1 Resumo da análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, aderidas em nove tipos de superfícies avaliadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência e contagem padrão em placas31
- 2 Estimativas das equações de regressão da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, em função do tempo de contato, determinadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP)32
- 3 Médias da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, expressas em log UFC.cm⁻², em nove tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos nos tempos de contato 4 h e 10 h, avaliadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).....36
- 4 Logaritmo de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* nas superfícies agrupadas pelo teste de similaridade para as técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP)37
- 5 Médias da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 no tempo de contato zero em nove tipos de superfícies usadas em indústrias de alimentos avaliadas pela microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).....49

LISTA DE FIGURAS

- 1 Etapas envolvidas na formação e crescimento de biofilmes. (1) Transporte de células planctônicas do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação; (2) Crescimento e divisão de células sésseis em decorrência de nutrientes provenientes do líquido circundante, juntamente com a produção de exopolissacarídeos; (3) Fixação de células bacterianas flutuantes contribuindo para o aumento da massa celular; (4) Liberação de uma pequena quantidade de massa celular que pode ocorrer devido a dois mecanismos diferentes: (a) erosão, ou seja, perda de células individuais ou (b) perda de agregados maiores9
- 2 Número de doenças de origem alimentar, ocorridas no Brasil no período de 1999 a 2004, segundo os locais de ocorrência.....20
- 3 Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, aderidas em diferentes superfícies pela microscopia de epifluorescência. (a) Aço inoxidável 304 # 4 (AIN), Poliuretano liso dupla face (PU_{DF}), PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}), Poliuretano revestido com tecido (PU_{RT}); (b) Poliuretano rugoso dupla face (PU_{DR}), Granito (GRA), Mármore (MAR); e (c) PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}) e Silicone revestido com tecido (SIL_{RT}).....33
- 4 Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, aderidas em diferentes superfícies pela contagem padrão em placas. (a) Aço inoxidável 304 # 4 (AIN), Poliuretano liso dupla face (PU_{DF}), PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}); (b) Poliuretano revestido com tecido (PU_{RT}), PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}), Mármore (MAR); e (c) Poliuretano rugoso dupla face (PU_{DR}), Silicone revestido com tecido (SIL_{RT}) e Granito (GRA)34
- 5 Dendrogramas da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, expressa em log UFC.cm⁻², em nove tipos de superfícies. (a) microscopia de epifluorescência, (b) contagem padrão em placas38

- 6 Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância (seta); b) fissuras com diâmetros variados.....41
- 7 Fotomicrografia de superfície de poliuretano liso dupla face observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância (seta); b) espaço irregular com diâmetro maior do que 3 µm.....41
- 8 Fotomicrografia de superfície de poliuretano revestido com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância (seta), b) Elevação (diâmetro maior) e microfuro (diâmetro menor).....42
- 9 Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila) revestimento fino com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) poucas imperfeições; b) presença de bolhas de ar devido a defeitos de fabricação42
- 10 Fotomicrografias de superfície de poliuretano rugoso dupla face observada por microscopia eletrônica de varredura. a) e b) aspectos não uniformes da superfície, c) ondulações com diâmetros variados; d) depressões com diâmetros variados43
- 11 Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila) revestimento grosso com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de elevações; b) presença de microfuro, c) esgarçamento do tecido (seta); d) porosidade lateral44
- 12 Fotomicrografia de superfície de granito observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de ranhuras e fendas; b) rugosidades (vista lateral); c) e d) ondulações e depressões com diâmetros variados.....45
- 13 Fotomicrografia de superfície de mármore observadas por microscopia eletrônica de varredura. a) e c) presença de ranhuras e fendas; b) rugosidades (vista lateral); d) presença de porosidades.....46
- 14 Fotomicrografia de superfície de silicone revestido com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) poucas imperfeições; b) presença de elevação; c) esgarçamento do tecido (seta).....47
- 15 Adesão de *P. fluorescens* ATCC 13525, a 28 °C e em caldo nutriente, em algumas superfícies visualizada por microscopia de epifluorescência após diferentes tempos de contato. (a) aço inoxidável 304 # 4, 6 h; (b) Poli (cloreto de vinila) revestimento fino com tecido, 10 h; (c) Poli (cloreto de vinila) revestimento grosso com tecido, 8 h; (d) Granito, 2 h; (e) Mármore, 8 h; (f) Poliuretano liso dupla face, 6 h50

RESUMO

CARELI, Roberta Torres, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005. **Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em Superfícies Utilizadas no Processamento de Alimentos.** Orientador: Nélio José de Andrade. Conselheiros: Nilda de Fátima Ferreira Soares e José Ivo Ribeiro Júnior.

A adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 foi avaliada pela microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP) em superfícies usadas no processamento de alimentos nos tempos de contato 0, 2, 4, 6, 8 e 10 h. O aumento da adesão entre as superfícies, em razão do tempo, não foi acompanhado de forma similar pelas técnicas avaliadas. Por exemplo, no tempo quatro horas, as superfícies que apresentaram maiores logaritmos de UFC.cm⁻² e que não apresentaram diferença significativa na adesão pelo teste de Scott-Knott ($P > 0,05$) foram poliuretano rugoso dupla face, silicone revestido com tecido, poli (cloreto de vinila) revestimento grosso com tecido, granito e mármore pela técnica EPF. Já pela técnica CPP, no mesmo tempo de contato, os maiores logaritmos de UFC.cm⁻² foram para superfícies de silicone revestido com tecido, poliuretano rugoso dupla face, granito e poliuretano revestido com tecido. As superfícies de mármore, granito, poli (cloreto de vinila) revestimento grosso com tecido, poliuretano rugoso dupla face e silicone revestido com tecido diferiram das demais no grau de adesão, expresso em UFC.cm⁻² ($P < 0,05$) nos tempos 4, 6, 8 e 10 horas, quando avaliadas pela técnica da epifluorescência, e de 2 e 10 horas, quando avaliadas pela contagem padrão em placas. Numa outra forma de avaliação, constatou-se também a diferença entre as

técnicas com relação ao agrupamento das superfícies de acordo com a similaridade de adesão. Assim, as superfícies que apresentaram maior percentagem de similaridade e maior média geral com relação à adesão pela técnica EPF foram mármore, granito e poliuretano rugoso dupla face. No caso da CPP, este mesmo fato foi constatado com as superfícies de poliuretano rugoso dupla face, silicone revestido com tecido e granito. As superfícies apresentaram características de microtopografias muito diferentes quando observadas por microscopia eletrônica de varredura, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão observados. As técnicas possuem comportamentos diferentes para cada tempo de contato. Constatou-se que a CPP, além de fornecer resultados menores do que a EPF, também permite a detecção de valores de adesão mais baixos, sendo considerada uma técnica mais sensível. Porém, a CPP fornece resultados mais demorados do que a EPF. Para que haja detecção pela EPF, a quantidade de células aderidas aos cupons deve estar com contagens médias de uma célula por campo, no mínimo. A EPF permite verificar a morfologia das células, bem como, a distribuição destas bactérias aderidas às diferentes superfícies avaliadas. É recomendável utilizar a EPF para a quantificação de bactérias sésseis, principalmente quando as contagens sejam menores ou iguais a $4,1 \times 10^5$ UFC.cm⁻². Este experimento mostrou que *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 aderiu nas superfícies avaliadas. Entretanto, não há como sugerir a superfície mais recomendada para a utilização em processamento de alimentos devido a suas aplicações específicas. Os resultados mostram a importância de práticas higiênicas corretas na indústria de alimentos.

ABSTRACT

CARELI, Roberta Torres, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2005. **Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* on food processing surfaces.** Adviser: Nélío José de Andrade. Committee members: Nilda de Fátima Ferreira Soares and José Ivo Ribeiro Júnior.

The adhesion of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 was evaluated by the epifluorescence microscopy (EPF) and the plate count method (CPP) to surfaces used in food processing at 0, 2, 4, 6, 8 and 10 h contact times. The adhesion increase among the surfaces, in relation to time, was not followed in a similar way by the evaluated techniques. For example, in four hours, the surfaces which showed greater CFU.cm⁻² logarithms and that did not show a significant difference in the adhesion by the Scott-Knott test ($P > 0.05$) were the double-faced rugous polyurethane, silicon coated with cloth, PVC thick coated with cloth, granite and marble by the EPF technique. Whereas by the CPP technique, in the same contact time, the greater CFU.cm⁻² logarithms were for the silicone coated with cloth, double-faced rugous polyurethane, granite and polyurethane coated with cloth surfaces. The marble, granite, PVC thick coated with cloth, double faced rugous polyurethane and silicone coated with cloth surfaces differed from the others in the adhesion degree expressed in CFU.cm⁻² ($P > 0.05$) in the 4, 6, 8 and 10 h times, when evaluated by the epifluorescence technique and, at 2 and 10 h, when evaluated by the plate count method. In another kind of evaluation, the differences between the techniques concerning the surfaces cluster according to the adhesion similarity were also observed. Thus, the surfaces, which showed a greater similarity percentage and a greater general average concerning the adhesion by the

EPF technique, were marble, granite and double-faced rugous polyurethane. In the CPP, this same fact was observed with the double-faced rugous polyurethane, silicone coated with cloth and granite surfaces. The surfaces showed very different microtopography characteristics when observed by the scanning electron microscopy, which can justify the differences between the observed adhesion degrees. The techniques have different behaviors for each contact time. It was observed that CPP, besides providing results lower than the EPF, also allowed the detection of lower adhesion values, being considered a more sensitive technique. However, the CPP provides longer results than the EPF. So that there is a detection by EPF, the quantity of adhered cells to the coupons must be with, at least, an average count of one cell per field. The EPF allows the cell morphology assay as well as the distribution of these bacteria adhered to the different evaluated surfaces. It is recommendable to use the EPF technique for the sessile bacteria quantifying, especially when the count is lower or equal to $4,1 \times 10^5$ CFU.cm⁻². This study showed that the *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 adhered to the evaluated surfaces. However, there is no way to suggest the most recommendable surface for the use in the food processing due to their specific application. The results show the importance of the correct hygienic practices in the food industry.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de técnicas de processamento de alimentos e higienização avançadas, o número crescente e a gravidade das doenças de origem alimentar em todo o mundo têm aumentado consideravelmente o interesse dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos. Atualmente, a segurança alimentar constitui uma preocupação para os consumidores e para a indústria de alimentos, bem como para órgãos responsáveis pela saúde pública.

Dessa forma, a produção de alimentos seguros requer basicamente o controle de patógenos desde a fonte produtora, passando pelas boas práticas higiênicas durante o processamento, a manipulação, a distribuição, a estocagem, a venda, a preparação e a utilização até uma abordagem preventiva.

Em geral, um grande problema para a indústria de alimentos tem sido o estado higiênico de superfícies de equipamentos processadores de alimentos por serem fontes potenciais de microrganismos deterioradores e patogênicos. Além disso, tem sido utilizada uma grande diversidade de materiais para comporem estas superfícies. Assim, além do aço inoxidável que é considerada uma superfície convencional e de fácil higienização, também são usados outros materiais, como vidro, borracha, polietileno, polipropileno, poliuretano, policarbonato, teflon, mármore, granito, entre outros.

A higiene de equipamentos e utensílios caracteriza-se, fundamentalmente, por processos em que as superfícies que entram em contato com os alimentos tornam-se sanitariamente adequadas para o processamento. Para isso, deve-se utilizar técnicas corretas de higienização e sanitização para a garantia de qualidade do produto final.

É possível ocorrer adesão bacteriana e formação de biofilmes em praticamente todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos desde as rugosas, que apresentam fissuras e fendas que podem alojar os microrganismos, até as consideradas mais lisas.

Várias técnicas têm sido utilizadas para a determinação da adesão bacteriana e formação de biofilmes. Dentre elas, as técnicas microscópicas têm sido bastante recomendadas. A microscopia de epifluorescência utiliza substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para coloração das células a fim de permitir a visualização ao microscópio.

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a capacidade de adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 em nove tipos de superfícies usadas em indústrias de alimentos, restaurantes industriais e cozinhas domésticas;
- Comparar as técnicas de contagem padrão em placas e microscopia de epifluorescência para avaliar o processo de adesão bacteriana nas superfícies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Adesão bacteriana

A contaminação microbiana em superfícies de contato é uma grande preocupação para a indústria de alimentos. Sob condições favoráveis, as células bacterianas podem aderir e reproduzir. Tais microrganismos, se não completamente removidos, podem contribuir para a formação de uma complexa comunidade microbiana que comprometerá a qualidade e segurança dos alimentos (BOWER et al. 1996).

As pesquisas sobre adesão bacteriana tiveram início há algumas décadas, quando se observou que os microrganismos aderidos eram responsáveis por processos corrosivos em superfícies imersas em sistemas marinhos aquáticos (ZOBELL e ALLEN, 1935; ZOBELL, 1943; COSTERTON et al., 1978; FLETCHER, 1980, CHARACKLIS E COOKSEY, 1983, FLETCHER, 1987).

A adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA, 1994 e 1997, ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

A adesão bacteriana a superfícies sólidas é um fenômeno geral, o qual é reconhecido como o primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes (VALCARCE et al., 2002) e pode levar a uma variedade de problemas, como a corrosão de superfícies metálicas (BEECH e GAYLARDE, 1989) e contaminação cruzada de alimentos processados (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

A sanitização de equipamentos processadores de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada durante a produção. Limpeza e desinfecção são procedimentos que devem ser realizados regularmente, visto que eliminam grande parte dos microrganismos contaminantes do equipamento. Todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a adesão bacteriana, que pode ocorrer até mesmo quando programas de higiene e sanitização são corretamente aplicados. Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

A eficiência dos processos de limpeza e sanitização de superfícies é reduzida pela presença de microrganismos aderidos. Isto tem se tornado um problema com o aumento do uso de procedimentos automáticos de limpeza e equipamentos complexos, que podem apresentar locais que facilitam o desenvolvimento de processos de adesão (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

2.1.1. Fatores que afetam a adesão bacteriana

Vários estudos mostram os fatores que influenciam a adesão bacteriana em superfícies envolvidas no processamento de alimentos. Dentre estes fatores incluem-se fase de crescimento da célula, tipo e propriedades do material da superfície inerte, presença de matéria orgânica, temperatura e pH ambiental. Alguns autores ainda citam outros fatores envolvidos com adesão de bactérias como as características do microrganismo, espécie, carga, hidrofobicidade, concentração, presença de apêndices superficiais, como *pili*, fímbrias, flagelo, cápsula; a síntese de substâncias exopoliméricas; as características do material aderente, como carga e microtopografia; e as características do meio que envolve o microrganismo, tal como tempo de contato e turbulência (TROLLER, 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al. 1996).

Estudos demonstram que há influência do tipo de superfície no processo de adesão de *Pseudomonas fluorescens*, sendo que este microrganismo adere melhor em superfície de zinco seguida das superfícies de alumínio e cobre, respectivamente (VALCARCE et al., 2002).

CZECHOWSKI (1990) constatou que as bactérias aderem quase que imediatamente as superfícies com as quais elas entram em contato, até mesmo em baixas temperaturas, como 5 °C e 11 °C. Entretanto, a consolidação e o subsequente

aumento da população na superfície do biofilme é dependente do tempo e o crescimento da maioria dos microrganismos seria retardado a baixas temperaturas (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

A adesão bacteriana depende das propriedades físico-químicas do material do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e metais dependem da composição química da superfície do metal e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE et al., 2002).

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de microrganismos às superfícies sólidas. A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentem papel relevante na adesão de microrganismos em superfícies inertes para processamento de alimentos e em superfícies de alimentos, a exemplo da carne. As superfícies com elevada carga elétrica, como o vidro, suportam melhor o processo de adesão do que as superfícies com menor carga, como o poliestireno (DENYER et al., 1993).

Embora os mecanismos não sejam completamente entendidos, esses fatores físico-químicos têm um papel importante na aderência microbiana (HOOD e ZOTTOLA, 1995). Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultivo (KUMAR e ANAND, 1998).

As células bacterianas e o substrato adquirem cargas superficiais geralmente negativas, como resultado da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície. Essas cargas de superfície podem atrair íons com carga contrária, que estão na fase aquosa circundante. Assim, quando a bactéria está próxima da superfície do substrato, interações começam a se desenvolver, as quais são resultantes das cargas positivas e negativas que circundam as duas superfícies. A magnitude dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e da constante dielétrica do meio circundante, além da distância entre a bactéria e o substrato (DENYER et al., 1993).

A temperatura e o pH também influenciam no mecanismo de adesão da bactéria. STONE e ZOTTOLA (1985) observaram que *Pseudomonas fragi* adere em superfície de aço inoxidável em fluxo contínuo de leite e produz fímbria em 30 minutos, a 25 °C e em duas horas, a 4 °C. Este mesmo microrganismo também apresentou máxima adesão ao aço inoxidável, em pH na faixa de 7,0 a 8,0, o que coincide com o pH ótimo

para o seu metabolismo. Presume-se que a adesão foi auxiliada pelo transporte ativo de cátions para a superfície do aço inoxidável, aumentando sua carga superficial (HERALD e ZOTTOLA, 1988).

ZOTTOLA E SASAHARA (1994) constataram que *Yersinia enterocolitica* adere melhor ao aço inoxidável a 21 °C do que a 10 °C ou a 35 °C. Estes autores verificaram que a 35 °C as células não possuíam flagelo, o que evidencia que essa estrutura é necessária para que a adesão ocorra. Os autores concluíram também que *Y. enterocolitica* adere melhor em pH de 8,0 a 9,5 do que em pH 6,0, nas temperaturas de 10 °C, 21 °C e 35 °C. Em pH 6,0, poucos flagelos foram observados, o que pode ter tido influência na adesão (HERALD e ZOTTOLA, 1988).

2.2. Biofilmes bacterianos

Na natureza e nos alimentos, os microrganismos aderem-se às superfícies e crescem como uma comunidade (DENYER et al., 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; KUMAR e ANAND, 1998).

Em ambientes naturais, todos materiais expostos a condições mínimas requeridas para o desenvolvimento microbiano como água, moléculas orgânicas, sais minerais são geralmente contaminados por microrganismos. Dependendo da disponibilidade destas substâncias e de condições ambientais favoráveis à contaminação inicial pode evoluir para a formação de biofilmes (LEJEUNE, 2003).

Os biofilmes são constituídos por bactérias que se aderem a superfícies e que são envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, ou seja, depósitos onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, conhecidos por glicocálix ou exopolissacarídeo (CRIADO et al., 1994). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, formando uma espécie de crosta, debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer, caracterizando um cultivo “puro” ou uma associação com outros microrganismos. (MOSTELER e BISHOP, 1993).

O alimento pode ser contaminado por bactérias deterioradoras e patogênicas indesejáveis provenientes dos biofilmes. Portanto, a formação de biofilme conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido à deterioração do alimento e persistência de patógenos reduzindo o prazo de validade dos produtos desde o

processamento até a comercialização (BEER et al., 1994, FORSYTHE, 2002). O crescimento de biofilmes em superfícies metálicas também conduz a mudanças no grau do processo de corrosão, geralmente induzindo ao ataque localizado e reduzindo a vida útil de equipamentos industriais (VALCARCE et al., 2002). Além disso, podem reduzir a transferência de calor em trocadores e o fluxo em tubulações (BEER et al., 1994).

A formação de biofilmes, por um outro lado pode ser desejável tanto para a indústria de alimentos, quanto para outros fins. Em estações de tratamento de água ou de efluentes há remoção de organismos patogênicos e redução da quantidade de matéria orgânica na água ou efluente através da interação com biofilmes (TAKAZAKI et al., 1992; XAVIER et al., 2005). Para a indústria de alimentos, alguns exemplos podem ser citados, como a produção de vinagre (BOLETTI, 1921), ácido cítrico e vinho, no qual as bactérias produtoras de ácido acético crescem em biofilmes sobre camadas finas dos tonéis de madeira ou de concreto apresentando como função a conversão do substrato em produto final (SAKURAI et al., 1997).

Em anos recentes, estudos têm sido dedicados a processos de colonização de superfícies e a fisiologia de biofilmes (O'TOOLE et al., 2000; SAUER et al., 2002; LEJEUNE, 2003). O objetivo de se controlar o desenvolvimento de biofilmes é comum em várias áreas de pesquisa como a biotecnologia, a saúde pública e a formação desta complexa comunidade microbiana em superfícies que entram em contato com os alimentos durante o processamento (XAVIER et al., 2005).

Muitas bactérias, no seu habitat natural, podem existir em duas formas diferentes: no estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e no estado sésil, em que estão aderidas a uma superfície (MARSHALL, 1992). O principal conceito do estudo de biofilmes é a diferença no estado fisiológico destas bactérias (LEJEUNE, 2003).

Estudos recentes tem mostrado que a população do biofilme apresenta diferenças entre células planctônicas e células aderidas (LEJEUNE, 2003). Os biofilmes diferem em seu metabolismo, estrutura química, características da superfície da célula, resistência a agentes químicos e físicos comumente usados em procedimentos de higienização, entre outros (ALLISON et al., 2000). As células estão envolvidas em uma matriz polimérica e são diferentes fenotipicamente de quando crescem em suspensão. Uma das maiores diferenças é o aumento da resistência, na

ordem de 10 a 100 vezes, aos agentes antimicrobianos (LE CHEVALLIER et al., 1988; DRUGGAN et al., 1993).

Os biofilmes são naturalmente heterogêneos e, por essa razão a quantificação da morfologia é o principal problema (MIDELET e CARPENTIER, 2004). Embora a função e a aparência de biofilmes em vários ambientes sejam diferentes, todos os biofilmes originam-se da mesma seqüência de eventos (ESCHER e CHACRACKLIS, 1990; VAN LOOSDRECHT et al., 1990; BOS et al., 1999).

Os biofilmes formam-se em qualquer superfície sólida submersa onde haja presença bacteriana. Segundo FORSYTHE (2002), sua formação ocorre numa seqüência de eventos:

i) Os nutrientes dos alimentos são adsorvidos na superfície formando um filme condicionante. Isso leva a uma alta concentração de nutrientes, comparada com a fase fluida, e favorece a formação de biofilmes. A camada de nutrientes afeta ainda as propriedades físico-químicas da superfície, por exemplo, a energia livre da superfície, as mudanças na hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam e dão condições à colonização microbiana.

ii) Os microrganismos aderem à superfície condicionante. A adesão inicial das bactérias por forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbicas é reversível. Mais tarde, a adesão é irreversível devido às ligações mais fortes tais como interações dipolo-dipolo, ligações covalentes e iônicas e interações hidrofóbicas. Os flagelos bacterianos, as fímbrias e os exopolissacarídeos estão envolvidos no contato com filmes condicionantes. O exopolissacarídeo é importante na adesão célula-célula e célula-superfície e também protege as células contra a desidratação.

iii) As bactérias irreversivelmente aderidas crescem e dividem-se, formando microcolônias, as quais aumentam e depois se unem para formar uma camada de células que cobre a superfície. Durante essa fase, as células produzem mais polímeros adicionais que aumentam sua fixação e estabilizam a colônia contra flutuações do ambiente.

iv) A adesão contínua e o crescimento das células bacterianas, conjuntamente com a formação de exopolissacarídeos, leva a formação de biofilmes. A camada de biofilme pode ter vários milímetros de espessura em questão de dias.

v) Com o tempo, o biofilme começa a liberar partículas relativamente grandes de biomassa. As bactérias das partes liberadas podem contaminar o alimento,

distribuindo-se de forma não homogênea no alimento ou iniciar a formação de um novo biofilme na linha de produção.

A Figura 1 representa esquematicamente as etapas iniciais da formação de um biofilme (XAVIER et al., 2005).

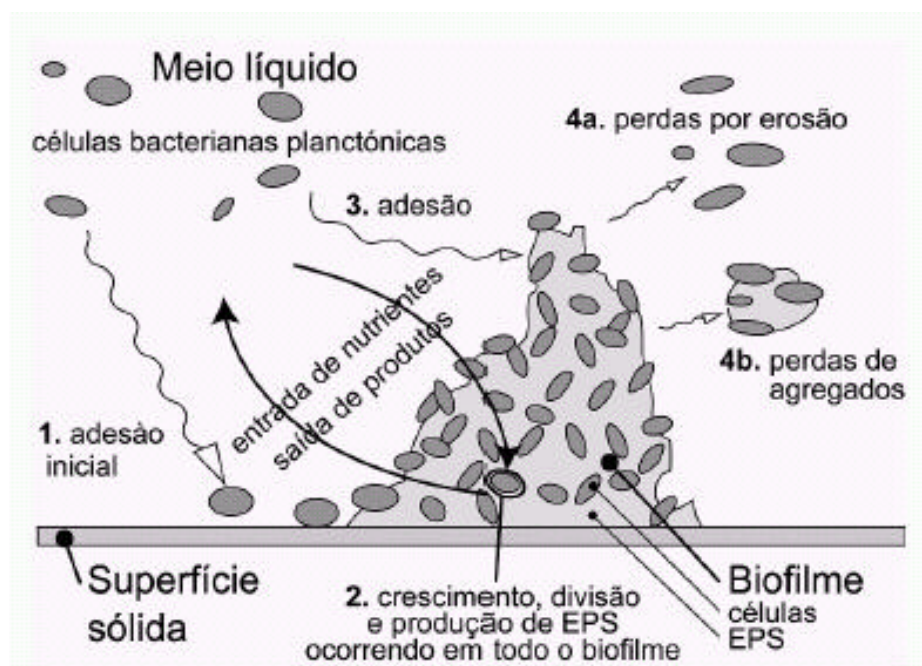


Figura 1 – Etapas envolvidas na formação e crescimento de biofilmes. (1) Transporte de células planctônicas do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação; (2) Crescimento e divisão de células sésseis em decorrência de nutrientes provenientes do líquido circundante, juntamente com a produção de exopolissacarídeos; (3) Fixação de células bacterianas flutuantes contribuindo para o aumento da massa celular; (4) Liberação de uma pequena quantidade de massa celular que pode ocorrer devido a dois mecanismos diferentes: (a) erosão, ou seja, perda de células individuais ou (b) perda de agregados maiores. Fonte: XAVIER et al., 2005

Após a fixação inicial de células bacterianas, o resultado das etapas seguintes define a estrutura e a atividade do biofilme (Figura 1). Estas etapas incluem todos os fatores físicos envolvidos no desenvolvimento de biofilmes e alguns fatores biológicos como crescimento, divisão celular e produção de exopolissacarídeos (XAVIER et al., 2005). Além destes fatores, existe um conjunto de fatores biológicos mais complexos, cuja relevância na formação de biofilmes foi constatada:

(i) Conjugação, o mecanismo de transferência de plasmídeos, ocorre a uma taxa superior entre células em biofilmes do que entre células livres (EHLERS e BOUWER,

1999; HAUSNER e WUERTZ, 1999; ROBERTS et al., 1999) e estirpes de relevância médica contendo certos plasmídeos demonstram maior tendência para a formação de biofilmes (GHINGO, 2001).

(ii) Existe evidência de que a atividade flagelar por parte das células fixas inicialmente é necessária para o desenvolvimento de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (O'TOOLE e KOLTER, 1998).

(iii) Pesquisas baseadas numa cultura pura de biofilme de *P. aeruginosa* cultivado em fluxo laminar indicam que *quorum sensing* é importante para a formação da estrutura de biofilmes (DAVIES et al., 1998).

Muitas bactérias apresentam um sistema elaborado de comunicação entre células permitindo que uma dada espécie possa sentir, integrar e processar informações do seu ambiente, comunicar-se umas com as outras e monitorar a sua própria densidade populacional, ativando ou reprimindo a expressão gênica. Este sistema de comunicação de densidade populacional em bactérias foi chamado de *quorum sensing* (FUQUA et al., 1994). O *quorum sensing* é um mecanismo de transdução de sinal pelo qual as bactérias podem modular diversas funções celulares, dentre elas esporulação, formação de biofilmes, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, produção de proteases, pigmentação e bioluminescência de acordo com a densidade populacional (SMITH, et al., 2004; PINTO, 2005). A comunicação intercelular bacteriana é realizada através da produção de pequenas moléculas chamadas de auto-indutores, como, por exemplo, as acil-homoserina-lactonas (ANTUNES, 2003).

Alguns fenótipos de *P. fluorescens* são, comprovadamente, influenciados por auto-indutores adicionados ao meio de subcultivo. ALLISON et al. (1998) verificaram que a adição do auto-indutor sintético HHL (N-hexanoil homoserina lactona), na concentração de $4,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ao meio de cultura fresco, acelerou e aumentou a formação de biofilme pela estirpe de *P. fluorescens* B52. Os autores sugeriram que a adesão e a formação de biofilme em *P. fluorescens* são influenciados pela presença de acil-homoserina-lactonas.

A formação de biofilme em *P. aeruginosa* envolve uma via programada. Segundo PARSEK e GREENBERG (2000), o *quorum sensing*, sob certas condições, desempenha alguma função na conversão de microcolônias sobre o controle do *quorum sensing* no desenvolvimento do biofilme por *P. aeruginosa*, mas o requerimento da comunicação célula-célula durante a maturação do mesmo pode

variar de acordo com as condições ambientais (HEYDOM et al., 2002). Segundo estudo realizado por SAUER et al. (2002), o *quorum sensing* seria responsável por apenas uma porção do número total de genes cuja regulação é alterada durante o estágio irreversível de desenvolvimento do biofilme. A implicação deste estudo é que o papel do *quorum sensing* e de outros mecanismos de sinalização não estão esclarecidos e que este complexo de sistemas estão sob controle intra e extracelular (STOODLEY et al., 2002).

Com base nos estudos de quorum sensing, a forma de prevenção e controle de biofilmes é outro aspecto importante para pesquisas. Geralmente, uma limpeza e um programa de sanitização efetivos inibirão a formação de biofilmes. Os tratamentos mecânicos e a quebra química da matriz de polissacarídeos são necessários para a remoção de biofilmes (FORSYTHE, 2002).

No controle e na prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental. Um biofilme microbiano presente numa superfície com resíduos oriundos do alimento impede uma efetiva penetração do sanitizante para inativar os microrganismos. O sanitizante reage, também, com resíduos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais. Assim, atividade antimicrobiana sanitizante será prejudicada. Sabe-se que quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes, antes do uso de sanitizantes, a população de microrganismos será reduzida. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam os microrganismos aderidos (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

As bactérias aderidas são cobertas com material orgânico o qual pode inibir a penetração o sanitizante devido à perda de propriedades umectantes. Portanto, a atividade de detergência é necessária para remover essa camada externa, antes da utilização de um sanitizante. Os microrganismos mortos devem ser removidos, pois, do contrário, pode agir como um filme condicionante e como fonte de nutrientes para uma posterior formação de biofilme. Novos agentes de limpeza e tratamentos enzimáticos foram formulados para a remoção efetiva de biofilmes (FORSYTHE, 2002).

O desenho e o projeto dos equipamentos também são aspectos importantes para a prevenção e o controle de biofilmes. Um desenho adequado de equipamentos como tanques, dutos e juntas facilita a limpeza da linha de produção. A microtopografia da superfície pode complicar os procedimentos de limpeza quando fendas e outras imperfeições protegem as células aderidas. O aço inoxidável resiste aos danos de impacto, mas é vulnerável à corrosão, enquanto superfícies emborrachadas são

propensas à deterioração e podem desenvolver rachaduras onde as bactérias podem se acumular (LE CLERCQ-PERLAT e LALANDE, 1994).

Muitos microrganismos estão envolvidos na adesão e formação de biofilmes. Bactérias alteradoras e patogênicas podem participar de processos de adesão e, eventualmente, originar problemas de saúde pública ou de ordem econômica. Dentre as alteradoras encontram-se: *Pseudomonas aeruginosa* (PARSEK e GREENBERG, 2000; HEYDOM et al., 2002), *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. (CRIADO et al., 1994), *Pseudomonas fluorescens* (ALLISON et al., 1998; ROSSONI e GAYLARDE, 2000; VALCARCE et al., 2002), *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al., 1996, 1998) e *Shewanella putrefaciens* (HJELM et al.; 2002). Entre as bactérias patogênicas incluem-se *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, (DOYLE, 1992; SMITH e FRATAMICO, 1995; HOOD, 1996; LEJEUNE, 2003), *Listeria monocytogenes* (BERESFORD, et al., 2001; LEJEUNE, 2003), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000; LEREBOUR et al., 2004), *Vibrio parahaemolyticus* (WONG et al., 2002) e *Klebsiella pneumoniae* (DI MARTINO et al., 2003).

Além de células vegetativas, os esporos bacterianos também podem participar dos processos de adesão às superfícies. Estes são de grande interesse, uma vez que são muito resistentes aos tratamentos térmicos, irradiação, dessecação, vácuo, congelamento e diversos agentes químicos (TORTORA et al., 2000).

Considerando-se que o esporo em criptobiose, ou seja, dormente não resulta em qualquer alteração nos alimentos, mas que ao encontrar condições favoráveis podem converter-se em células vegetativas, é importante que a indústria de alimentos esteja preparada para evitar que os esporos venham contaminar os alimentos e, ou, evitar sua conversão para célula vegetativa através de medidas adequadas de controle (ANDRADE e MACEDO, 1996).

Dentre os microrganismos esporulados envolvidos em processos de adesão destacam-se *Bacillus sporothermodurans* (AKUTSU, 2001), *Bacillus stearotherophilus* (FLINT et al., 2001) e *Bacillus cereus* (JULLIEN et al., 2002). Estes microrganismos participam do processo de adesão com intensidade variada e a liberação deles poderá originar conseqüências indesejáveis à qualidade do alimento (PARIZZI, 1999).

As espécies do gênero *Pseudomonas* são bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, catalase positiva, ligeiramente “curvadas”, com dimensões variando de 0,5 μ m a 1,0 μ m de largura e de 1,5 μ m a 5,0 μ m de comprimento. São

móveis em razão de um ou vários flagelos polares. São aeróbias, tendo o oxigênio como aceptor final de elétrons. A maioria não cresce bem em $\text{pH} \leq 4,5$ (HOLT et al., 1994). Largamente distribuídas na natureza, algumas espécies são patogênicas para homens, animais ou plantas (TYRER et al., 2004).

O gênero *Pseudomonas* é capaz de crescer a baixas temperaturas em função de seu potencial deteriorador destaca-se a espécie *Pseudomonas fluorescens* que é freqüentemente isolada de ambientes da indústria de alimentos (PINTO, 2004).

Esta bactéria pode adaptar-se rapidamente a diferentes condições ambientais e é responsável pela perda de aceitabilidade de alimentos refrigerados pelos consumidores por causa de uma aparência indesejável, produção de proteases e lipases termoestáveis, as quais são responsáveis por aromas e odores desagradáveis no leite mesmo após a morte dos microrganismos pela pasteurização e, ainda, produção de pigmentos na deterioração de ovos (MASSON et al., 2002; FORSYTHE, 2002). Além disso, pode ser encontrada no solo e na água e é comumente a causa de deterioração de alimentos como, por exemplo, ovos, carnes curadas, peixes, vegetais e leite (MASSON et al., 2002).

2.3. Superfícies utilizadas no processamento de alimentos

A Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, aprova o “Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, conforme disposto no Anexo I desta norma, definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com esta Portaria, todo o equipamento e utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que não transmitam substâncias tóxicas, odores e sabores que sejam não absorventes e resistentes à corrosão e capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção. As superfícies devem ser lisas e estarem isentas de rugosidade e frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos ou sejam fontes de contaminação. Deve evitar-se o uso de madeira e de outros materiais que não possam ser limpos e desinfetados adequadamente, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será uma fonte de contaminação. Deve ser evitado o uso

de diferentes materiais para evitar o aparecimento de corrosão por contato (BRASIL, 1997).

As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado (HAYES, 1993).

Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície, podendo apresentar fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficientes para alojar microrganismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização favorecendo o crescimento microbiano e o desenvolvimento de microrganismos (BOWER et al., 1996). Equipamentos processadores de alimentos são fontes potenciais de microrganismos patogênicos (MIDELET e CARPENTIER, 2004). HAEGHEBAERT et al. (2002) mostraram que a contaminação de equipamentos contribuiu com 59% de surtos de doenças de origem alimentar investigadas na França, durante o ano de 2001. Conseqüentemente, é importante melhorar o conhecimento dos fatores envolvidos na transferência de microrganismos de equipamentos para os alimentos, especialmente durante o contato.

A facilidade de higienização de superfícies, além de suas propriedades anticorrosivas e mecânicas, tem sido um dos argumentos decisivos na escolha de materiais para equipamentos da linha de processamento (JULLIEN et al., 2002).

Várias superfícies podem estar envolvidas com a adesão bacteriana em diferentes tipos de equipamentos (WONG et al., 2002). Pesquisas realizadas constataam que diversas superfícies encontradas nas indústrias de alimentos, como aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno, polietileno, policarbonato, teflon e ferro forjado suportam a formação de biofilmes, além de superfícies de alimentos, como frutas, vegetais, carcaças de animais e peixes (ZOTTOLA, 1997).

Destes materiais, o aço inoxidável é reconhecido como de fácil higienização. Esta superfície é comumente usada na construção de equipamentos e utensílios de processamento de alimentos em geral como, tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, mesas, pias, bancadas para manuseio, entre outras aplicações (JULLIEN et al., 2002). As superfícies de aço inoxidável e vidro são de mais fácil limpeza do que polímeros, alumínio e cobre (BOULANGE-PETERMANN, 1996). Além disso, o aço inoxidável é estável a uma variedade de temperaturas de processamento e apresenta alta resistência à corrosão devido a uma

camada protetora de óxido de cromo que se forma na presença de oxigênio (HAYES, 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Segundo BOULANGE-PETERMANN (1996), este material é relativamente mais resistente ao ataque de agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes usados na indústria de alimentos, como hipoclorito de sódio, ácido peracético e iodóforos. Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo fluxo do alimento (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

O aço inoxidável pode ser produzido em vários graus de polimento e finalidades, afetando a adesão bacteriana devido a suas várias microtopografias e propriedades físico-químicas (JULLIEN et al., 2002). A principal diferença entre os graus disponíveis comercialmente é sua composição relativa em elevadas porcentagens de ferro, cromo e níquel e a baixa porcentagem de carbono. Dentre os vários tipos de aços inoxidáveis disponíveis, os mais utilizados são os do chamado grupo 18-8, ou seja, que apresentam em sua composição aproximadamente 18 % de cromo e 8 % de níquel. Deste grupo, as alterações do grau 300, por exemplo, 304 e 316, satisfazem a maioria das necessidades. O grau 304 é resistente a corrosão originada pela maioria dos alimentos e agentes de limpeza, não apresenta problemas de manchas, é de fácil higienização e relativamente barato. Em problemas de corrosão mais intensos, como no caso de salmouras e alimentos muito ácidos, como o vinagre, deve ser empregado o grau 316 que apresenta um cerca de 10 % de níquel e 3 % de molibdênio. O tipo *Hastelloy*, que contém 56% de níquel, 16 % de cromo, 16 % de molibdênio, 5 % de ferro e 4 % de tungstênio é mais resistente a corrosão, mas sua utilização é limitada devido ao alto custo. O aço inoxidável difere também no acabamento da superfície que pode variar de acordo com o polimento empregado que se classifica de 1, sem polimento, até 7, cuja superfície é espelhada. Normalmente, a indústria de alimentos se utiliza o aço inoxidável com polimento 4 (HAYES, 1993).

Segundo HAYES (1993), os tipos de corrosão em superfícies de aço inoxidável são:

i) Pontual: Qualquer lesão na camada de óxido de cromo determina corrosão. Os resíduos alimentícios e inclusos nas partículas da superfície podem produzir corrosão por exclusão de oxigênio. No caso dos alimentos, o problema é mais grave, pois as bactérias que crescem na matéria orgânica podem produzir ácidos que aumentam a corrosão. Além disso, este tipo de corrosão também pode ser produzida por lesões físicas e qualquer ferrugem, mancha ou zona rugosa, que se não tratadas,

podem levar facilmente a lesões mais graves. Uma das principais causas de corrosão é o emprego incorreto de soluções de limpeza e de sanitizantes, especialmente o hipoclorito de sódio. Às vezes, estas soluções são deixadas por muito tempo em contato com a superfície, aplicadas em concentrações erradas ou preparadas com produtos inadequados.

ii) Corrosão eletrolítica: Pode ser originada quando há umedecimento de dois metais diferentes, como o alumínio e o ferro, ou de dois aços inoxidáveis de graus diferentes com a mesma solução. Assim, uma solução de limpeza ou de sanitização pode atuar como um eletrólito e causar corrosão, quando em contato com dois metais diferentes que, por exemplo, fazem parte da mesma peça do equipamento. Os elétrons passam do ferro, metal menos ativo, para o alumínio, metal mais ativo, permitindo a corrosão do alumínio.

iii) Corrosão intergranular: Deve-se ao emprego de um aço inoxidável rico em carbono. Ocorre nos contornos dos grãos dos metais e freqüentemente propaga-se pelo interior da peça, deixando poucos sinais visíveis na superfície. Pode acontecer em lugares próximos às soldas dos equipamentos. É originada por precipitação de carbonetos de cromo nos contornos dos grãos, resultante da permanência prolongada do aço a temperaturas muito elevadas. Este problema pode ser facilmente evitado utilizando aços inoxidáveis com baixo conteúdo de carbono, como o tipo 304, por exemplo.

iv) Corrosão geral: Deve-se ao emprego de um aço inoxidável que não resiste às propriedades corrosivas do alimento processado. Pode ser evitada unicamente pela substituição do equipamento por outro construído com um aço de maior grau de resistência.

Os polímeros são amplamente utilizados na indústria de alimentos em função suas excelentes propriedades, pois são capazes de retardar e prevenir mudanças e deterioração no material de embalagem devido a influências externas como presença de oxigênio, luz e microrganismos. Uma grande vantagem é o seu menor custo em relação a outros materiais usados para embalagem como, por exemplo, o vidro (VERGNAUD, 1998).

As propriedades dos polímeros variam bastante, dependendo da matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Basicamente, os polímeros usados na indústria de alimentos são agrupados em duas categorias: termoplásticos e termoestáveis. Os termoplásticos amolecem quando são aquecidos e

endurecem quando são resfriados, processos que podem ser repetidos várias vezes sem mudanças químicas apreciáveis. Os tipos de termoplásticos mais comumente encontrados em indústrias de alimentos são: polietileno, polipropileno, poli (cloreto de vinila) ou PVC, acrílico, entre outros. Os termoestáveis são capazes de endurecer na primeira vez que são aquecidos, mas se forem reaquecidos pode ocorrer degradação química. Poliéster, resinas epóxi e poliuretanos são polímeros termoestáveis usados na construção de equipamentos envolvidos no processamento de alimentos (HAYES, 1993; RODOLFO Jr. et al., 2002).

Segundo POMPERMAYER e GAYLARDE (2000), o polipropileno está tornando-se um dos materiais mais populares em indústrias alimentícias para a construção de tanques, tubulações, acessórios e superfícies envolvidas no corte de alimentos. Portanto, é importante avaliar a possibilidade de contaminação cruzada de alimentos e determinar o grau de adesão bacteriana e formação de biofilmes em superfícies de polipropileno.

Algumas superfícies consideradas como não convencionais têm sido usadas no processamento de alimentos e pouco estudadas com relação a adesão. Dentre elas, destacam-se silicone, PVC, poliuretano, granito e mármore.

Os silicones são polímeros, quimicamente inertes, resistentes a ácidos e alcalinos, à radiação gama, à decomposição pelo calor, à água ou a agentes oxidantes, além de serem bons isolantes elétricos. Resistentes ao calor e à intempérie, os silicones são apresentados nas formas fluida, resina ou de elastômeros, ou seja, borrachas sintéticas, sempre com numerosas aplicações. Servem, por exemplo, como agentes de polimento, vedação, proteção e apresentam propriedades impermeabilizantes. Suportando temperaturas que podem variar de - 65 °C a 400 °C, o silicone é usado em muitos segmentos da indústria de alimentos sem perder suas características de permeabilidade, elasticidade e brilho (RODRIGUEZ, 1989, ABIQUIM_a, 2004).

Superfícies de silicone possuem várias características que são responsáveis pela sua ampla aplicação, destacando-se sua grande flexibilidade, longevidade e compatibilidade com os meios de aplicação. Por ser inerte e atóxica, não traz malefícios para o meio ambiente, não contamina o solo, nem a água nem o ar. Além disso, não altera o sabor dos alimentos com os quais entram em contato (STEVENS, 1990; ABIQUIM_a, 2004).

Revestimentos de correias transportadoras de alimentos, utensílios de cozinha, máquinas automáticas de servir bebidas, moldes de confeitaria, bandejas de gelo e bicos de mamadeira são apenas algumas das inúmeras peças feitas de elastômeros de silicones para aplicações de contato com alimentos (ABIQUIM_a, 2004).

O PVC caracteriza-se por ser atóxico, impermeável, estável, bom isolante térmico, possui grande durabilidade e não propaga chamas. Além disso, apresenta resistência a maioria dos reagentes químicos e aos agentes oxidantes. O PVC pode ser rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco, colorido ou não. O PVC pode ser formulado com vários tipos de aditivos que o torna o polímero mais polivalente que existe. Esses aditivos podem melhorar as características das superfícies de PVC como sua resistência ao calor ou ao frio, a choques ou à luz, dentre outras. A adição de líquidos orgânicos, denominados plastificantes, conferem ao PVC grande flexibilidade (STEVENS, 1990; RODOLFO Jr. et al, 2002; INSTITUTO..., 2004).

O PVC é o único material plástico que não é 100 % originário do petróleo. O PVC contém 57 % m/m de cloro, originário do cloreto de sódio e 43 % m/m de eteno, de origem petrolífera. Dentre as superfícies de PVC envolvidas com alimentos, destacam-se embalagens usadas para acondicionar alimentos, garrafas para água mineral, construção de tanques, tubulações, acessórios e revestimento de correias transportadoras (HAYES, 1993; INSTITUTO..., 2004).

Os poliuretanos, também conhecidos como policarbamatos, são polímeros com uma ampla variedade de propriedades, todas baseadas na reação de um diisocianato orgânico com componentes contendo grupos de hidróxidos, chamados polióis (STEVENS, 1990; ABIQUIM_b, 2004). Dentre as características deste tipo de superfície destacam-se uma durabilidade elevada, resistência a ácidos, a oxidação, à abrasão e à radiação gama, mas não são muito resistentes a alcalinos (RODRIGUEZ, 1989). Sólidos ou expandidos, flexíveis, semi-rígidos ou rígidos, os poliuretanos podem assumir a forma de artefatos moldados, revestimentos, elastômeros, espumas ou fibras (STEVENS, 1990). Dentre as aplicações na indústria alimentícia destacam-se o uso em revestimentos de correias transportadoras e como isolante térmico na cadeia do frio (ABIQUIM_b, 2004).

Segundo LÓPEZ (1970), as superfícies de granito correspondem às rochas ígneas e metamórficas de granulometria grossa, compostas principalmente de minerais félsicos na proporção de 50 % de quartzo, 30 % de feldspato e 20 % de mica. A dureza do granito é decorrente da presença e proporções relativas destes minerais. Este tipo

de superfície é fisicamente difícil de ser explorada e beneficiada, entretanto, possui alto brilho no polimento e durabilidade mecânica elevada. Além disso, apresenta resistência ao calor e um custo relativamente baixo podendo competir com o custo de superfícies sintéticas. Uma desvantagem é a sensibilidade aos ácidos, podendo levar à perda do brilho e modificação da coloração (FRASCÁ, 2003).

Cientificamente, os mármore são rochas metamórficas e recristalizadas de granulometria grossa e composição à base de carbonatos. Essas superfícies são compostas, fundamentalmente, por carbonato de cálcio (CaCO_3), também conhecido como calcita, cujo conteúdo pode variar entre 90 % a 100 % de acordo com a pureza do material. Já os mármore dolomíticos são compostos por cerca de 54 % de carbonato de cálcio e 46 % de carbonato de magnésio (MgCO_3). Juntamente com o carbonato de cálcio pode haver também outros minerais secundários em maior ou menor quantidade, tais como o óxido de silício (SiO_2), óxido de ferro (Fe_2O_3), óxido de manganês (MnO), óxido de alumínio (Al_2O_3), entre outros, que são considerados como impurezas. Estas diferentes composições são responsáveis pelas diferentes condições de durabilidade e resistência deste material e pela grande variedade de mármore existentes no mercado (LÓPEZ, 1970).

Do ponto de vista prático de sua utilização, a primeira qualidade que distingue os mármore é a cor, que é uma das principais características para sua valorização comercial. De acordo com a coloração, os mármore podem ser classificados como brancos e coloridos. Os primeiros são compostos puramente de carbonato de cálcio, já os últimos apresentam cores diferentes, como, amarelo, verde, roxo, preto, variando de acordo com os minerais de sua composição (LÓPEZ, 1970).

Os mármore são superfícies consideradas macias devido à sua dureza relativamente baixa, por isso, são fáceis de serem cortados e polidos sendo adequados para processamentos industriais. Entretanto, possuem vulnerabilidade para o desgaste físico e reações químicas apresentando grande sensibilidade a agentes ácidos e alcalinos o que pode acarretar em aparecimento de manchas e danos da superfície (FRASCÁ, 2003).

As superfícies de granito e mármore são empregadas amplamente na construção de pias, balcões, mesas e bancadas para manuseio de restaurantes industriais, padarias, algumas microindústrias e cozinhas domésticas. Uma pesquisa realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde mostrou que residências e restaurantes foram os locais de maior ocorrência de doenças de origem

alimentar no período de 1999 a 2004 (Figura 2). Dessa forma, é importante realizar estudos sobre a capacidade de adesão bacteriana e formação de biofilmes nestas superfícies.

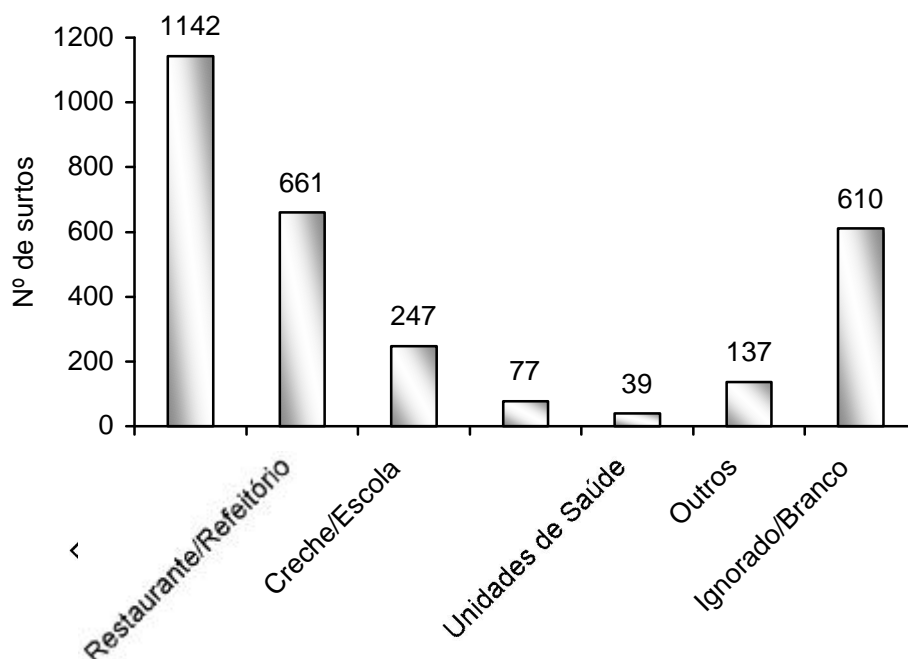


Figura 2 – Número de doenças de origem alimentar, ocorridas no Brasil no período de 1999 a 2004, segundo os locais de ocorrência. Fonte: COVEH/CGDT/DEVEP/SVS (SANTOS, 2004).

2.4. Técnicas para a determinação da adesão bacteriana

A demanda de tecnologias fornece uma quantificação rápida de microrganismos é crescente. Muitos métodos têm sido avaliados, incluindo a microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, microbiologia molecular e bioluminescência. Apesar do uso de tais métodos há algumas restrições como seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade e custo. Além disso, um desafio é atribuído à necessidade de quantificar bactérias aderidas em superfícies, particularmente quando estão na forma de biofilmes.

Atualmente vários métodos microscópicos têm sido usados para avaliar o processo de adesão. Dentre os vários tipos de microscopia utilizados, pode-se citar a microscopia ótica, a de contraste de fase, a confocal, a de epifluorescência e eletrônica

de varredura e de transmissão, sendo que a escolha do tipo de microscopia a ser utilizada dependerá do aspecto de formação do biofilme que se deseja analisar (ZOTTOLA, 1997).

As técnicas microscópicas são as mais recomendadas para a visualização da adesão bacteriana, crescimento e formação de biofilmes em sistemas de processamento de alimentos, podendo até acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real (PARIZZI, 1999).

A microscopia permite obter informações sobre a morfologia de células e colônias microbianas, distribuição destas colônias na superfície, presença de exopolissacarídeos e natureza dos produtos de corrosão, se, por exemplo, são cristalinos ou amorfos. Ela também revela o tipo de ataque por meio das mudanças na microestrutura do metal depois da remoção do biofilme (BEECH, 2004).

Há aproximadamente 60 anos, a microscopia ótica foi utilizada por C. E. ZOBEL, 1935, o primeiro pesquisador a reconhecer o papel da adesão bacteriana na formação de depósitos e corrosão de superfícies sólidas submersas no mar, isto foi feito através da capacidade dos microrganismos aderirem em lâminas de vidro que, posteriormente, foram coradas e observadas ao microscópio ótico. Esta técnica apresenta limitações, dentre elas a baixa resolução e a necessidade do uso de superfícies transparentes, como o vidro (ZOTTOLA, 1994).

A microscopia de contraste de fase também é muito útil nos estudos de adesão microbiana em superfícies. Ela é particularmente recomendada quando se deseja acompanhar o desenvolvimento da formação do biofilme em tempo real, também em uma superfície transparente.

A microscopia confocal é usada para a observação da estrutura de biofilmes, pois permite a possibilidade de efetuar um seccionamento ótico de biofilmes no seu estado hidratado de um modo não destrutivo. Além disso, permite adquirir imagens em canais múltiplos, o que poderá ser utilizado para a observação simultânea de várias sondas fluorescentes, de modo a obter a informação espacial de diversidade funcional no biofilme (LAWRENCE e NEU, 1999).

Desde a sua primeira aplicação há mais de 20 anos atrás (HOBBIE et al., 1977), a contagem de bactérias por microscopia de epifluorescência tem se tornado uma técnica comumente usada para a estimativa de bactérias em diferentes estados fisiológicos usando fluorocromos, ou seja, substâncias fluorescentes seletivas (BERNARDEAU et al., 2001).

A técnica de microscopia de epifluorescência é uma alternativa excelente na quantificação das células aderidas às superfícies que podem ser transparentes ou não. Para uma melhor visualização da adesão bacteriana, recomenda-se o uso de substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para a coloração direta das células, ou ainda o uso de anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo assim a sua observação pela microscopia. Um fator significativo para um melhor aproveitamento operacional deste tipo de microscopia é a existência de uma boa correlação quando comparada à técnica de contagem padrão em placas (TATINI et al., 1991; SAKATE et al., 2004). O uso do corante alaranjado de acridina e do microscópio de epifluorescência produz uma coloração diferencial, em que as bactérias que fluorescem de cor alaranjada são consideradas células viáveis, devido à predominância de atividade nos ribossomos (RNA) diferenciando o seu estágio de desenvolvimento metabólico. Algumas colorações intermediárias podem ocorrer, mas somente as células fluorescendo nas cores laranja ou laranja avermelhado são consideradas como viáveis. A microscopia de epifluorescência pode ser melhorada pelo uso de uma unidade de varredura confocal permitindo o exame de imagens em vários planos podendo também ser reconstituídas para uma observação tridimensional da amostra (PARIZZI, 1999).

Já as técnicas de microscopia eletrônica são as mais indicadas quando se deseja analisar a interação microbiana na matriz do biofilme. De modo geral, as amostras são fixadas usando-se agentes químicos, como por exemplo, o glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar os danos às células pelos cristais de gelo (ZOTTOLA, 1997). Dentre as técnicas de microscopia eletrônica incluem-se a de varredura (MEV) e a de transmissão (MET). Uma seqüência típica de preparação da amostra a ser analisada pela MEV consiste no desenvolvimento de biofilme sobre um “suporte” sólido, como por exemplo, o vidro, o aço inoxidável, a borracha e seguido pela fixação da amostra, dessecação e cobertura com metal. Essas etapas influem na qualidade da imagem resultante. Para análises por MET, após desidratação e fixação, uma resina é infiltrada nas amostras, geralmente epóxi ou metacrilato, formando uma cobertura semelhante a um plástico enrijecido em que as amostras são cortadas em um ultramicrotomo, usando um diamante ou lâmina de vidro, numa espessura de aproximadamente 90 nm, que são colocados em grades de cobre, as quais compõe o MET. Geralmente estas grades são revestidas com um fino filme de polímero para auxiliar no suporte dos

cortes. Urânio ou o chumbo são os metais usados para corar os cortes ultrafinos, desse modo as grades são colocadas em uma coluna e os elétrons transmitidos através da amostra, que pode ser vista por fosforescência (ZOTTOLA, 1997).

A contagem padrão em placas tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos e de superfícies que entram em contato direto com os mesmos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA et al., 1997). Sua presença em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995).

O método de contagem padrão em placas baseia-se na premissa de que cada célula microbiana presente na amostra irá formar, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, uma colônia visível e isolada. Variando o tipo de meio de cultura e as condições de incubação é possível selecionar o gênero ou a espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. A relação correta é feita entre o número de colônias e o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos (SILVA et al., 1997).

Alguns trabalhos compararam as técnicas de microscopia de epifluorescência com a contagem padrão em placas para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos com diferentes níveis de contaminação (HUNTER e McCORQUODALE, 1983; RODRIGUES e KROLL, 1986; BETTS et al., 1988; HOLAH et al., 1988; TATINI et al., 1991; SAKATE et al., 2004), de superfícies utilizadas no processamento (PARIZZI, 1999) e de superfícies de embalagens que entram em contato direto com os alimentos (PIRES et al., 2004). Estes autores obtiveram uma boa correlação linear que variaram de 0,77 a 0,99 entre as duas técnicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial e de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Núcleo de Microscopia e Microanálise, situados na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1. Superfícies avaliadas

Para a avaliação da adesão bacteriana foram selecionadas nove tipos de superfícies que têm sido usadas no processamento de alimentos tanto na indústria quanto em restaurantes industriais e cozinhas domésticas. Assim, foram avaliados cupons de prova de mármore (MAR), granito (GRA), poliuretano revestido com tecido (PU_{RT}), poliuretano liso dupla face (PU_{DF}), poliuretano rugoso dupla face (PU_{DR}), silicone revestido com tecido (SIL_{RT}), PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}), PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}). Além destes, também foi avaliado como padrão cupons de prova de aço inoxidável AISI 304 # 4 (AIN) que é a superfície mais usada no processamento dos alimentos.

As dimensões de cada cupom variaram de acordo com cada tipo de superfície. Desta forma, os cupons avaliados apresentaram as seguintes dimensões de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 - Dimensões dos cupons das superfícies usados na adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

Superfície	Dimensões (mm)		
	L	C	E
AIN	10	10	1
MAR	10	10	3
GRA	10	10	3
SIL _{RT}	10	10	2
PU _{RT}	10	10	2
PU _{DF}	10	10	2
PU _{DR}	10	10	2
PVC _{RF}	10	10	2
PVC _{RG}	10	10	3

L = Largura; C = Comprimento; E = Espessura

AIN = Aço inoxidável 304 # 4; MAR = Mármore; GRA = Granito; SIL_{RT} = Silicone revestido com tecido; PU_{RT} = Poliuretano revestido com tecido; PU_{DF} = Poliuretano liso dupla face; PU_{DR} = Poliuretano rugoso dupla face; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido

3.2. Microrganismo e meios de cultura utilizados

Foi utilizada uma cultura de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, cedida pelo Departamento de Microbiologia da UFV. A cultura foi mantida em tubos Eppendorf de 1 mL em caldo nutriente (OXOID[®]) e glicerol à temperatura de - 80 °C. Para os estudos de adesão, a cultura foi repicada por três vezes consecutivas em caldo nutriente a 28 °C por 24 horas para sua ativação.

3.3. Determinação da adesão bacteriana

Antes de cada análise, os cupons foram limpos por meio de escovação empregando-se água e detergente neutro líquido, rinsados com água destilada e imersos em álcool etílico 70% por 1 hora para remoção de gordura, rinsados novamente com água destilada, secagem ao ar e exposição à luz ultravioleta a 254 nm por 1 hora para sanitização (PARIZZI, 1999).

Vinte e quatro cupons-teste da superfície avaliada foram imersos, à temperatura ambiente, em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente (OXOID[®]) acrescido de um

volume de suspensão de células de *P. fluorescens*, de forma a obter uma contagem entre 10^3 UFC.mL⁻¹ e 10^4 UFC.mL⁻¹. As amostras foram incubadas em banho-maria a 28 °C e as avaliações da quantidade de células aderidas por cm² foram realizadas após 0, 2, 4, 6, 8 e 10 h de tempo de contato, em cada superfície. O tempo zero correspondeu à análise realizada imediatamente após a imersão dos cupons no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana. Após 10 h de incubação, foi determinada a concentração da suspensão.

3.4. Determinação do número de células aderidas

3.4.1. Contagem padrão em placas (CPP)

A adesão bacteriana foi avaliada pela técnica da CPP, em que os cupons foram retirados da suspensão de bactérias em caldo nutriente (OXOID[®]) com o auxílio de pinça esterilizada e imersos separadamente em 10 mL de água peptonada a 0,1% por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos contendo 5 mL da mesma solução diluente e submetidos ao vórtex, durante 1 minuto, para a remoção de células sésseis (PARIZZI, 1999). Diluições apropriadas foram preparadas e transferidas para placas de Petri, nas quais adicionou-se o meio de crescimento PCA (OXOID[®]) e incubou-se a 28 °C por 48 horas, procedendo em seguida, a contagem (SWANSON et al., 1992). Cada colônia contada na placa era equivalente a $2,5 \times 10^0$ UFC.cm⁻² que foi calculado relacionando-se o volume do diluente usado para rinsagem (5 mL), a alíquota usada no plaqueamento (1mL), a média da contagem expressa em UFC obtida nas placas (M), a diluição realizada (D) e a área do cupom (2 cm²). Assim, tem-se:

$$\text{UFC.cm}^{-2} = \frac{(5/1) \times M \times D}{2} = 2,5 \times M \times D$$

3.4.2. Microscopia de epifluorescência (EPF)

Também foi usada a técnica de microscopia de epifluorescência para a avaliação da adesão bacteriana. Inicialmente, os cupons foram retirados da suspensão de bactérias em caldo nutriente (OXOID[®]), com o auxílio de pinça esterilizada e imersos separadamente em 10 mL água peptonada a 0,1%, por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, as células aderidas nas superfícies dos cupons foram fixadas com solução de Kirkpatrick (álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído na proporção de 6:3:1) por 3 minutos e coradas com solução de alaranjado de acridina 0,025% por 5 minutos. O fixador e o corante foram adicionados com o auxílio de pipeta, aplicando-se volumes suficientes para cobrir os cupons. Em seguida, os cupons foram observados em Microscópio de Epifluorescência Leica DC 300F. As células com fluorescência alaranjada foram contadas em cinco a dez campos de cada cupom, dependendo da densidade de células aderidas por campo (BIER et al., 2001). O resultado foi expresso em Contagem Direta ao Microscópio por cm² (CDM.cm⁻²), obtida multiplicando-se o número médio de células pelo fator do microscópio ($3,4 \times 10^3$) que foi calculado de acordo com a objetiva usada. Neste caso, o raio da objetiva foi 0,0975 mm. Assim, o FM é obtido dividindo-se a área do cupom (100 mm²) pela área do campo de observação ($\pi R^2 = 3,1416 \times 0,0975$):

$$FM = \frac{100}{0,02986} = 3.400$$

Neste experimento foi estabelecido que 1 CDM é igual a 1 UFC de modo que os resultados pudessem ser expressos em UFC.cm⁻².

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias das superfícies não submetidas à adesão bacteriana foram realizadas, por microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de verificar as diferenças de microtopografia entre elas.

O preparo de amostras para observação em microscopia eletrônica de varredura foi realizado segundo metodologia descrita por SILVEIRA (1989). Inicialmente, fitas adesivas foram coladas no suporte de porta-amostras do microscópio (*stub*) e aplicou-se uma camada de prata coloidal líquida para melhorar a condutividade elétrica do material. Em seguida, os cupons foram colocados no *stub* e levados ao Metalizador Balzers FDU 010, onde foram submetidos ao processo de metalização com uma fina camada de ouro de 20 nm, evaporada à vácuo, também com a finalidade de torná-los bons condutores elétricos. Posteriormente, os cupons foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 1430 VP, com aumentos variando de 100 X a 2000 X.

3.6. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido segundo um arranjo em parcelas subsubdivididas, com as superfícies em nove níveis (aço inoxidável, mármore, granito, poliuretano revestido com tecido, poliuretano liso dupla face, poliuretano rugoso dupla face, PVC revestimento fino com tecido, PVC revestimento grosso com tecido, silicone revestido com tecido) na parcela com duas repetições segundo o delineamento inteiramente casualizado, as técnicas em dois níveis (CPP e EPF) na subparcela e o tempo de contato em cinco níveis (2, 4, 6, 8, 10 h) na subsubparcela.

Para estudar os três fatores (superfícies, técnicas e tempo de contato) foram realizadas análises de variância para todas as características avaliadas a 5% de probabilidade utilizando o sistema para análises estatísticas SAEG.

Para as superfícies, foram estabelecidos todos os contrastes entre duas médias testados com base no teste de Scott-Knott.

Para as técnicas, as médias foram comparadas pelo teste F.

Para o tempo de contato foram realizadas análises de regressão cujos coeficientes foram testados pelo teste t a 5% de probabilidade, para cada tipo de superfície.

Para o estudo dos três fatores (superfície, técnica e tempo de contato) foi verificada a existência de interações de segunda e terceira ordens, pelo teste F. Assim, em função da significância encontrada, foram realizadas as aplicações dos testes às médias e das análises de regressão.

Com base nas médias dos tempos de contato 2, 4, 6, 8 e 10 h, foram construídos dois dendrogramas para as técnicas EPF e CPP, com o objetivo de verificar a similaridade de adesão bacteriana nas superfícies e realizar um agrupamento visual. O método utilizado foi o da ligação simples com base na distância euclidiana padronizada utilizando o sistema de análises estatísticas SAEG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes superfícies de processamento

Os resultados mostraram que o número de UFC.cm⁻² de *P. fluorescens* diferiu (P < 0,05) em razão do tipo superfície, das técnicas avaliadas e do tempo de contato (Tabela 1). Além disso, foram constatadas diferenças (P < 0,05) nesse número quando se avaliam as interações entre técnica e superfície; tempo de contato e superfície; tempo de contato e técnica; tempo de contato, técnica e superfície, sobre a adesão. Desse modo, os três fatores não puderam ser analisados separadamente, ou seja, são dependentes quando se avalia a adesão.

Na Tabela 2, são mostradas as equações de regressão linear que descrevem as variações dos logaritmos do número de UFC.cm⁻² em função do tempo de contato para cada tipo de superfície e para cada técnica.

A adesão bacteriana, expressa em logaritmo do número de UFC.cm⁻², em função do tempo de contato, está representada nas Figuras 3 e 4. Observou-se que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato para todas as superfícies avaliadas e que a concentração inicial da suspensão no meio de subcultivo aumentou com o tempo de incubação. Após 10 h de incubação, a suspensão atingiu uma concentração em torno de 10⁶ UFC.mL⁻¹.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, aderidas em nove tipos de superfícies avaliadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência e contagem padrão em placas.

FV	GL	QM
Superfície (SUP)	8	3,0128 *
Erro (A)	9	0,1851
Técnica (TEC)	1	47,7096 *
TEC*SUP	8	0,2795 *
Erro (B)	9	0,0283
Tempo de contato(TC)	4	42,5754 *
TC*SUP	32	0,0906 *
TC*TEC	4	1,4778 *
TC*TEC*SUP	32	0,0558 *
Erro (C)	72	0,0284

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F (P < 0,05)

Tabela 2 – Estimativas das equações de regressão da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 em caldo nutriente e a 28 °C, em função do tempo de contato, determinadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).

Superfície	Técnica	Equação de Regressão	R ² (%)
AIN	EPF	= 3,355 + 0,235*TC	92,98
	CPP	= 0,874 + 0,402 *TC	99,31
PU _{DF}	EPF	= 3,130 + 0,272 *TC	98,10
	CPP	= 1,371 + 0,402*TC	96,45
PU _{RT}	EPF	= 3,248 + 0,293*TC	96,01
	CPP	= 2,132 + 0,365*TC	94,95
PU _{DR}	EPF	= 4,123 + 0,235*TC	98,57
	CPP	= 2,387 + 0,361*TC	99,80
PVC _{RF}	EPF	= 3,098 + 0,282*TC	98,86
	CPP	= 0,773 + 0,455*TC	95,59
PVC _{RG}	EPF	= 3,273 + 0,328*TC	93,40
	CPP	= 1,710 + 0,414*TC	99,18
SIL _{RT}	EPF	= 3,517 + 0,320*TC	92,67
	CPP	= 2,276 + 0,374*TC	98,10
GRA	EPF	= 3,840 + 0,264*TC	99,63
	CPP	= 2,052 + 0,422*TC	99,04
MAR	EPF	= 3,544 + 0,300*TC	99,82
	CPP	= 1,585 + 0,451*TC	99,24

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste t (P < 0,05)
 = log UFC.cm⁻²

TC = tempo de contato (horas)

AIN = Aço inoxidável 304 # 4; PU_{DF} = Poliuretano liso dupla face; PU_{RT} = Poliuretano revestido com tecido; PU_{DR} = Poliuretano rugoso dupla face; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; SIL_{RT} = Silicone revestido com tecido; GRA = Granito; MAR = Mármore

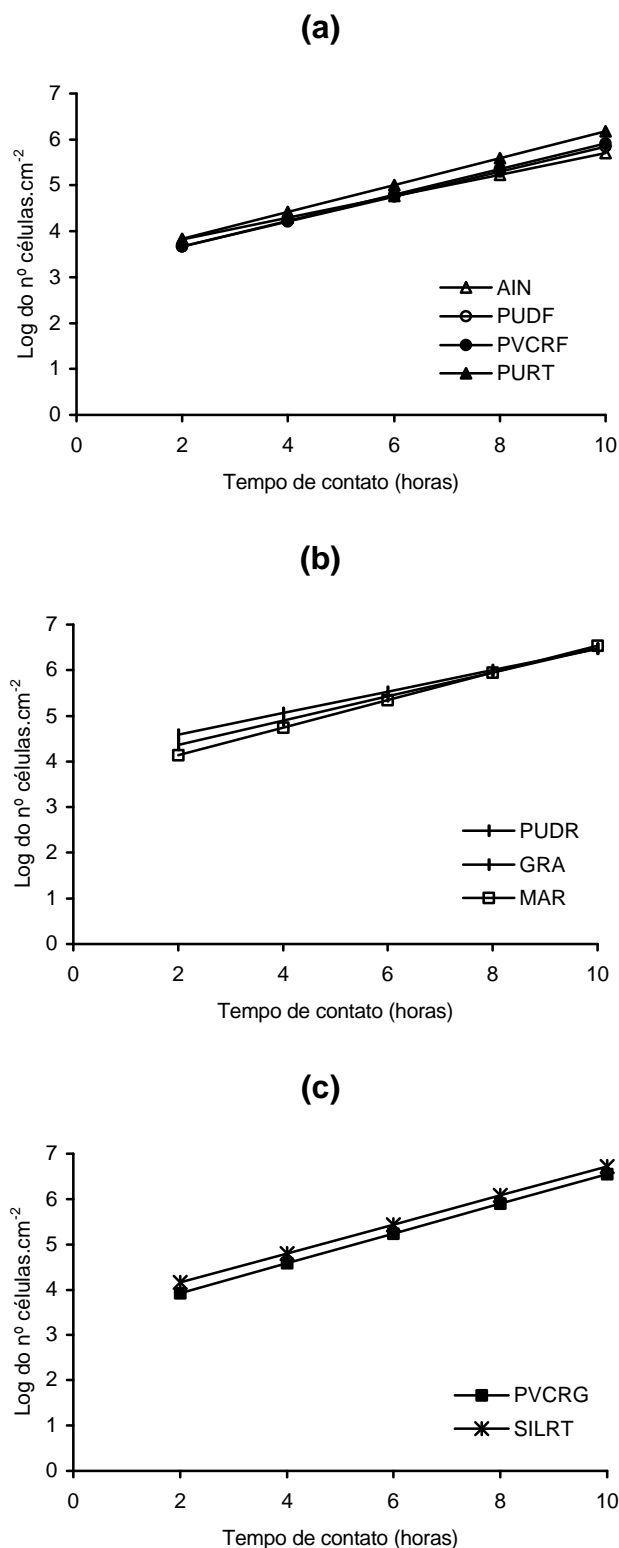


Figura 3 – Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, aderidas em diferentes superfícies pela microscopia de epifluorescência. (a) Aço inoxidável 304 # 4 (AIN), Poliuretano liso dupla face (PU_{DF}), PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}), Poliuretano revestido com tecido (PU_{RT}); (b) Poliuretano rugoso dupla face (PU_{DR}), Granito (GRA), Mármore (MAR); e (c) PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}) e Silicone revestido com tecido (SIL_{RT})

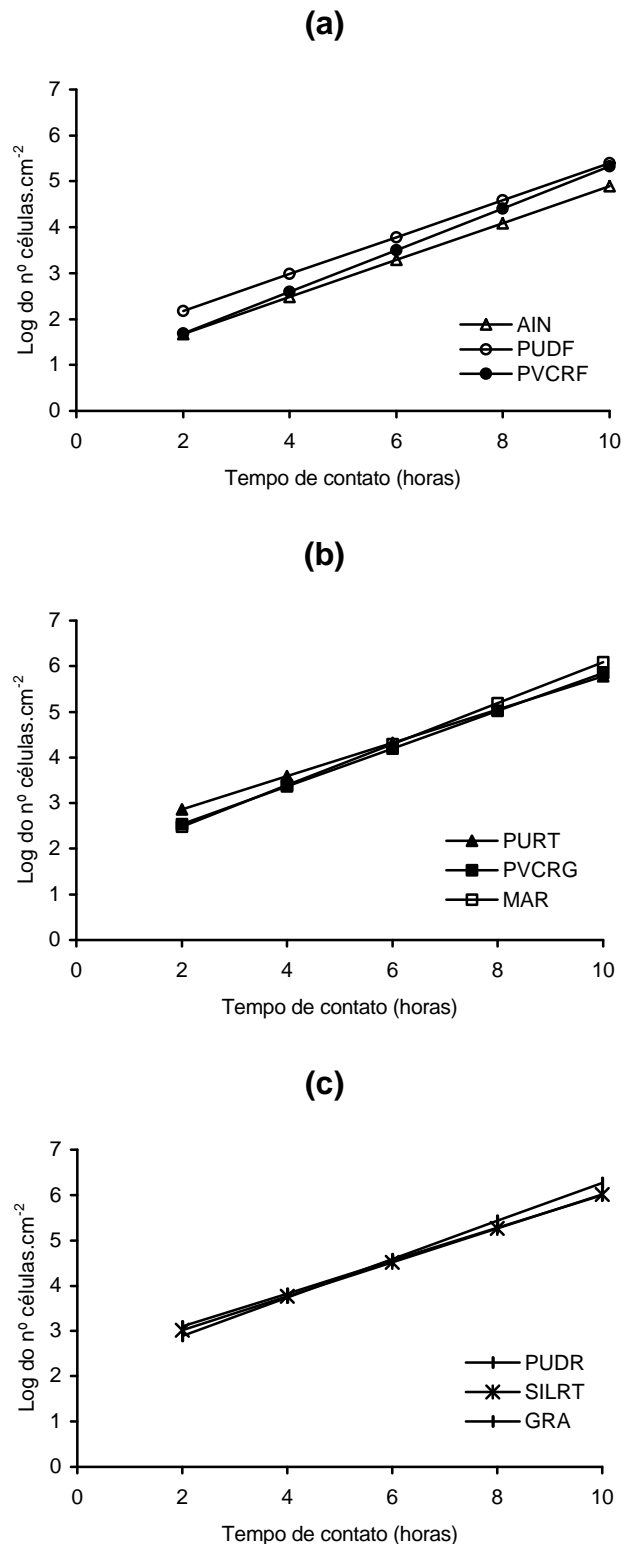


Figura 4 – Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, aderidas em diferentes superfícies pela contagem padrão em placas. (a) Aço inoxidável 304 # 4 (AIN), Poliuretano liso dupla face (PU_{DF}), PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}); (b) Poliuretano revestido com tecido (PU_{RT}), PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}), Mármore (MAR); e (c) Poliuretano rugoso dupla face (PU_{DR}), Silicone revestido com tecido (SIL_{RT}) e Granito (GRA)

4.2. Grau de adesão de *Pseudomonas fluorescens* em função das superfícies de processamento

Constatou-se que a adesão entre as superfícies variou com o tempo, a técnica e as suas características de microtopografia.

O aumento da adesão entre as superfícies, em razão do tempo, não foi acompanhado de forma similar pelas técnicas avaliadas (Tabela 3). Por exemplo, no tempo quatro horas, as superfícies que apresentaram maior adesão expressa em logaritmo de UFC.cm⁻² e que não apresentaram diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($P > 0,05$) foram PU rugoso dupla face (5,12), silicone revestido com tecido (5,10), PVC revestimento grosso com tecido (4,98), granito (4,89) e mármore (4,77) pela técnica EPF. Já pela técnica CPP, no mesmo tempo de contato, os maiores logaritmos de UFC.cm⁻² foram para superfícies de silicone revestido com tecido (3,92), PU rugoso dupla face (3,85), granito (3,76) e PU revestido com tecido (3,45). Após 10 horas de incubação, as superfícies que mostraram menor adesão, expressa em logaritmo de UFC.cm⁻², foram aço inoxidável (5,55), PU liso dupla face (5,72), PVC revestimento fino com tecido (5,90) e PU revestido com tecido (6,02) pela técnica de EPF, sendo que as mesmas não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($P > 0,05$). Pela CPP, no mesmo tempo de contato, os resultados mostraram menores valores de adesão para aço inoxidável (4,95), PU liso dupla face (5,10) e PVC revestimento fino com tecido (5,13) diferindo do PU revestido com tecido (5,57) pelo mesmo teste estatístico.

As superfícies de mármore, granito, PVC revestimento grosso com tecido, PU rugoso dupla face e silicone revestido com tecido não diferiram entre si no grau de adesão, expresso em UFC.cm⁻² ($P > 0,05$) nos tempos 4, 6, 8 e 10 horas, quando avaliado pela técnica da microscopia de epifluorescência, e de 2 e 10 horas, quando avaliado pela contagem padrão em placas.

Tabela 3 – Médias da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, expressas em log UFC.cm⁻², em nove tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos nos tempos de contatos 4 h e 10 h, avaliadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).

Superfície	TC ₄		TC ₁₀	
	EPF	CPP	EPF	CPP
AIN	4,52 b A	2,64 c B	5,55 b A	4,95 b B
PU _{DF}	4,20 b A	3,10 b B	5,72 b A	5,10 b B
PU _{RT}	4,59 b A	3,45 a B	6,02 b A	5,57 a B
PU _{DR}	5,12 a A	3,85 a B	6,46 a A	5,93 a B
PVC _{RF}	4,18 b A	2,56 c B	5,90 b A	5,13 b B
PVC _{RG}	4,98 a A	3,18 b B	6,43 a A	5,90 a B
SIL _{RT}	5,10 a A	3,92 a B	6,54 a A	5,87 a B
GRA	4,89 a A	3,76 a B	6,54 a A	6,14 a B
MAR	4,77 a A	3,26 b B	6,54 a A	6,10 a B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada tempo de contato não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e pelo teste F, respectivamente ($P > 0,05$)

AIN = Aço inoxidável 304 # 4; PU_{DF} = Poliuretano liso dupla face; PU_{RT} = Poliuretano revestido com tecido; PU_{DR} = Poliuretano rugoso dupla face; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; SIL_{RT} = Silicone revestido com tecido; GRA = Granito; MAR = Mármore

Foram construídos dendrogramas (Figura 5) para cada técnica avaliada a fim de verificar a similaridade da adesão bacteriana entre as superfícies e realizar um agrupamento visual entre as mesmas.

Pela técnica EPF, as nove superfícies avaliadas foram distribuídas em quatro grupos segundo as suas características semelhantes de adesão (Tabela 4 e Figura 5a). No primeiro grupo, as superfícies aço inoxidável, PU liso dupla face e PVC revestimento fino com tecido apresentaram 78,67% de similaridade e o log de UFC.cm⁻² da média geral de adesão de 4,77. A superfície de PU revestido com tecido, pertencente ao segundo grupo, foi agrupada separadamente das demais pela EPF com média geral do log de UFC.cm⁻² de 5,00. No terceiro, encontram-se o mármore, granito e PU rugoso dupla face com 80,21%, de similaridade e o log de UFC.cm⁻² da média geral de adesão de 5,43. No quarto, as superfícies agrupadas foram PVC revestimento grosso com tecido e silicone revestido com tecido, sendo a porcentagem de

similaridade correspondente a 72,44 e o log de UFC.cm⁻² da média geral de adesão de 5,34. Portanto, as superfícies que apresentaram maior percentagem de similaridade e maior média geral com relação à adesão pela técnica EPF foram mármore, granito e PU rugoso dupla face.

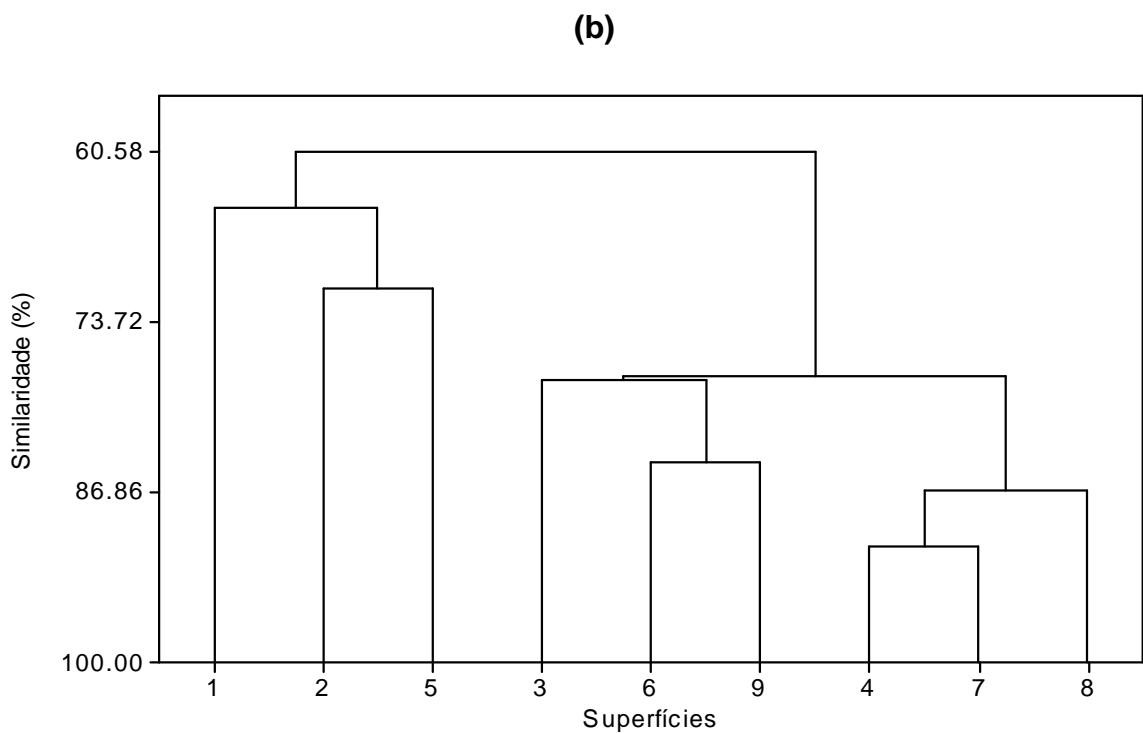
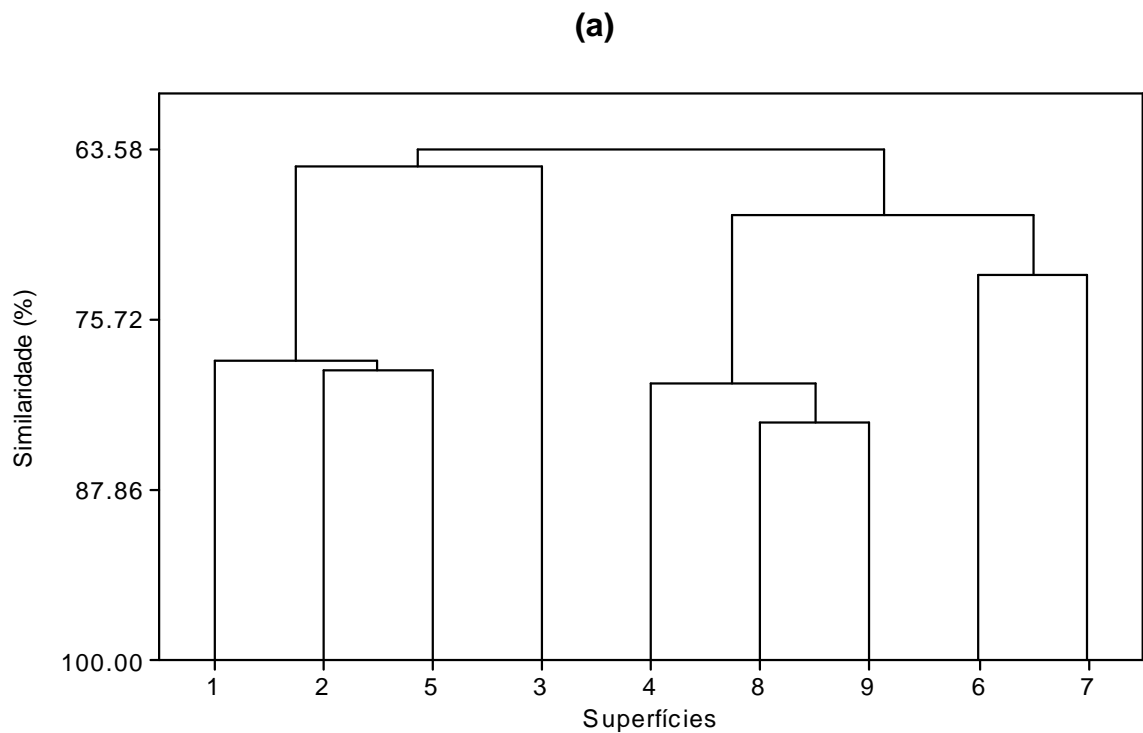
Pela técnica CPP, observa-se três agrupamentos das superfícies com base na similaridade de adesão (Tabela 4 e Figura 5b). No primeiro grupo, encontram-se as superfícies de aço inoxidável, PU liso dupla face e PVC revestimento fino com tecido com 64,82% de similaridade e o log de UFC.cm⁻² da média geral de adesão de 3,52. No segundo, as superfícies de PU revestido com tecido, PVC revestimento grosso com tecido e mármore apresentaram 78,18% de similaridade e o log de UFC.cm⁻² da média geral de adesão de 4,27. No terceiro foram agrupadas as superfícies de PU rugoso dupla face, silicone revestido com tecido e granito com 86,64% de similaridade e o log de UFC.cm⁻² da média geral de adesão de 4,55. No caso da CPP, as superfícies de PU rugoso dupla face, silicone revestido com tecido e granito apresentaram maior percentagem de similaridade e maior média geral de adesão.

Tabela 4 – Logaritmo de UFC.cm⁻² de *Pseudomonas fluorescens* nas superfícies agrupadas pelo teste de similaridade para as técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).

Técnica	Grupos	Superfícies	Log UFC.cm ⁻²
EPF	I	AIN, PU _{DF} , PVC _{RF}	4,77
EPF	II	PU _{RT}	5,00
EPF	III	PU _{DR} , GRA, MAR	5,43
EPF	IV	PVC _{RG} , SIL _{RT}	5,34
CPP	I	AIN, PU _{DF} , PVC _{RF}	3,52
CPP	II	PU _{RT} , PVC _{RG} , MAR	4,27
CPP	III	PU _{DR} , SIL _{RT} , GRA	4,55
*Percentual de acerto após a classificação			100

*Obtido de acordo com a análise discriminante

AIN = Aço inoxidável 304 # 4; PU_{DF} = Poliuretano liso dupla face; PU_{RT} = Poliuretano revestido com tecido; PU_{DR} = Poliuretano rugoso dupla face; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; SIL_{RT} = Silicone revestido com tecido; GRA = Granito; MAR = Mármore



- | | | |
|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 Aço inoxidável 304 # 4 | 2 PU liso dupla face | 3 PU revestido com tecido |
| 4 PU rugoso dupla face | 5 PVC revestimento fino com tecido | 6 PVC revestimento grosso com tecido |
| 7 Silicone revestido com tecido | 8 Granito | 9 Mármore |

Figura 5 – Dendrogramas da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, em caldo nutriente e a 28 °C, expressa em log UFC.cm⁻², em nove tipos de superfícies. (a) microscopia de epifluorescência, (b) contagem padrão em placas

Realizando-se uma comparação entre as duas formas de avaliação dos resultados, teste estatístico de Scott-Knott e teste de similaridade de adesão, observou-se algumas semelhanças entre os mesmos. Para a técnica EPF, as superfícies que compõem o grupo I no teste de similaridade (Tabela 4) não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$) com relação à adesão em todos os tempos de contato avaliados. O mesmo foi verificado para os grupos III e IV pela técnica EPF. Para a técnica de CPP, as superfícies que compõem o grupo III no teste de similaridade (Tabela 4) também não apresentaram diferença significativa na adesão pelo teste estatístico ($P > 0,05$) para todos os tempos de contato.

Há carência de trabalhos com relação à comparação da adesão bacteriana entre os tipos de superfícies avaliadas neste estudo, principalmente granito e mármore. ZAQEUS et al. (2000) mostraram que formação de biofilme bacteriano em superfícies de PVC, polietileno e aço inoxidável expostos a água ozonizada foram muito similares. Entretanto, o número de células aderidas foi um pouco mais elevado em PVC do que em polietileno. BERESFORD et al. (2001) verificaram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas em superfícies de polipropileno, policarbonato, poliuretano, PVC, silicone, borracha, aço inoxidável AISI 304, aço inoxidável AISI 316, aço inoxidável AISI 430 e alumínio em duas horas de contato.

Foram obtidas fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de cada superfície para obter informações sobre as mesmas (Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14).

Na observação microscópica verificou-se que as superfícies apresentaram características de microtopografias muito diferentes, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão constatados neste experimento. No entanto, outros fatores podem estar envolvidos com os mecanismos de adesão, em que se incluem as características do microrganismo como espécie, carga, hidrofobicidade, concentração, presença de apêndices superficiais; a síntese de substâncias exopoliméricas; as características do material aderente, como carga e microtopografia; e as características do meio que envolve o microrganismo, como tempo de contato e turbulência (TROLLER, 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al., 1996).

Todas as imperfeições encontradas podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização e facilitar a penetração de resíduos de alimentos que servirão de substrato para a adesão bacteriana, crescimento e, conseqüentemente, formação de biofilmes. Algumas imperfeições apresentam tamanhos suficientes para

alojar e proteger as células microbianas, visto que, as dimensões de *Pseudomonas* são de aproximadamente 0,5 μm a 1,0 μm de largura e 1,5 μm a 5,0 μm de comprimento, (HOLT et al., 1994).

Em superfícies de aço inoxidável, pode-se observar a predominância de protuberâncias (Figura 6a) e fissuras que apresentaram diâmetros de 5,07 μm e 8,79 μm (Figura 6b).

Em superfícies de PU revestido com tecido verificou-se a presença de elevações com 27,13 μm , microfuros de 6,45 μm e, ainda, depressões (Figura 8b). Em PU liso dupla face observa-se espaços irregulares próximos a elevações de 3,22 μm (Figura 7b).

Ondulações com tamanhos variando de 5,58 μm e 12,63 μm (Figura 10c) e depressões com diâmetros de 7,88 μm e 27,35 μm são características da microtopografia de PU rugoso dupla face.

Um aspecto relacionado às superfícies de silicone revestido com tecido, PVC revestimento grosso ou fino com tecido e poliuretano revestido com tecido deve ser mencionado. Essas superfícies, apesar de não apresentarem muitas rugosidades na parte superior, possuem um revestimento com tecido, que dificulta a higienização na parte inferior ou, até mesmo, apresenta algum tipo de dano, como corte e esgarçamento favorecendo a adesão de bactérias entre as fibras do tecido (Figuras 11c, 11d e 14c).

Superfícies de mármore e de granito apresentaram microtopografias extremamente rugosas, podendo-se ressaltar características de porosidade com tamanhos variados de 6,12 μm e 13,44 μm (Figura 13d) e presença de ranhuras, fendas (Figuras 12a, 12b, 13a e 13c), ondulações e depressões medindo diâmetros de 6,89 μm (Figura 12d) e de 26,46 μm (Figura 12c).

Vale ressaltar que todas as superfícies avaliadas neste experimento nunca haviam sido usadas. Muitas vezes, para a limpeza e sanitização são utilizados produtos e, ou, materiais abrasivos e ácidos, que podem danificar principalmente as superfícies constituídas por minerais, provocando o aumento dos poros microscópicos das mesmas devido à sua composição. Estas superfícies compostas por rochas, como o granito e o mármore, apresentam uma reação de desgaste com o tempo de uso.

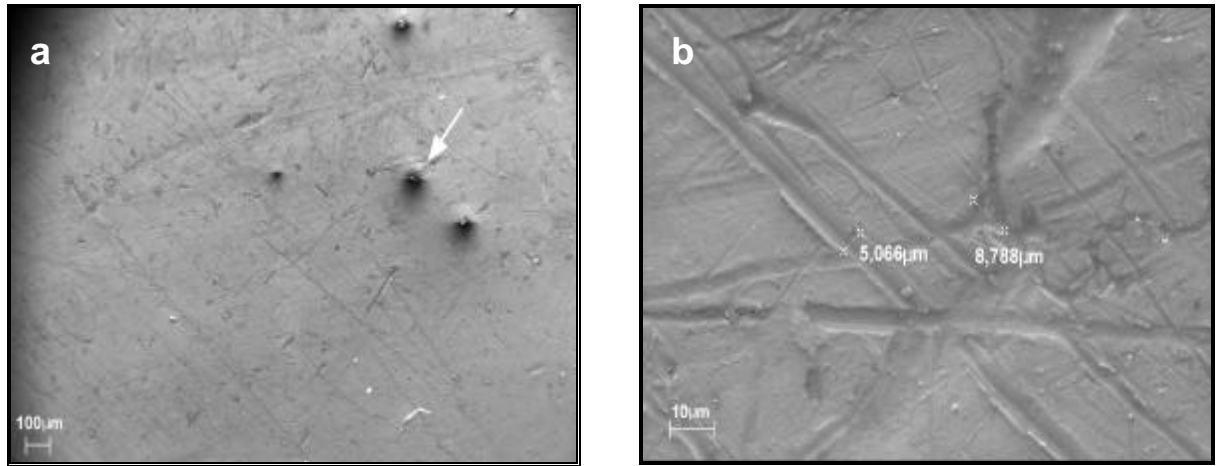


Figura 6 – Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância (seta); b) fissuras com diâmetros variados

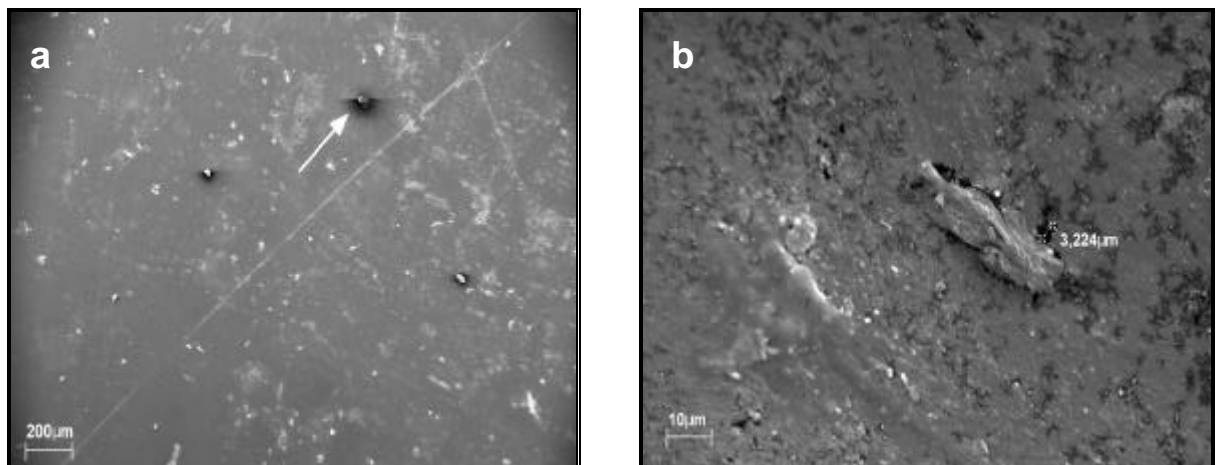


Figura 7 – Fotomicrografia de superfície de poliuretano liso dupla face observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância (seta); b) espaço irregular com diâmetro maior do que 3 μm

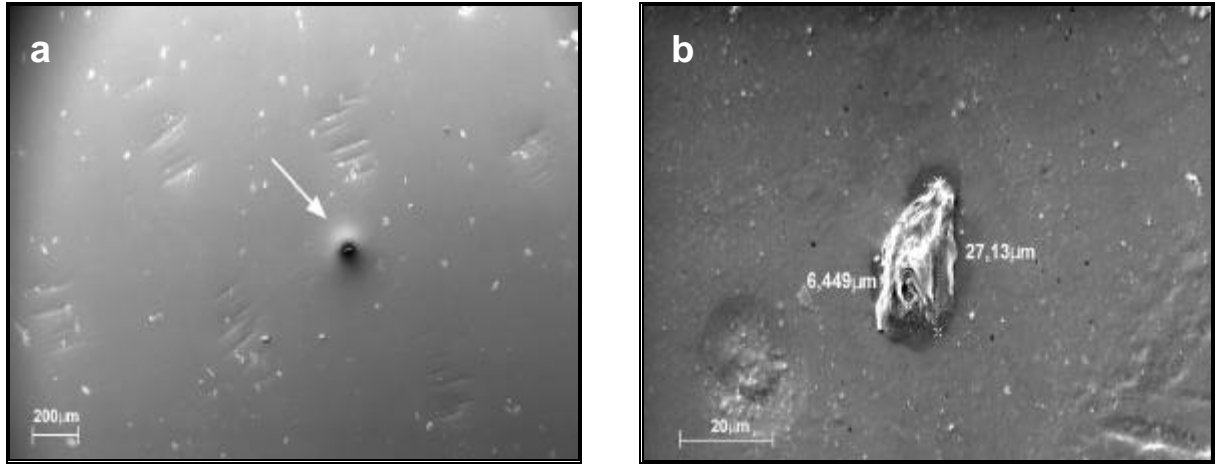


Figura 8 – Fotomicrografia de superfície de poliuretano revestido com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de protuberância (seta), b) Elevação (diâmetro maior) e microfuro (diâmetro menor)

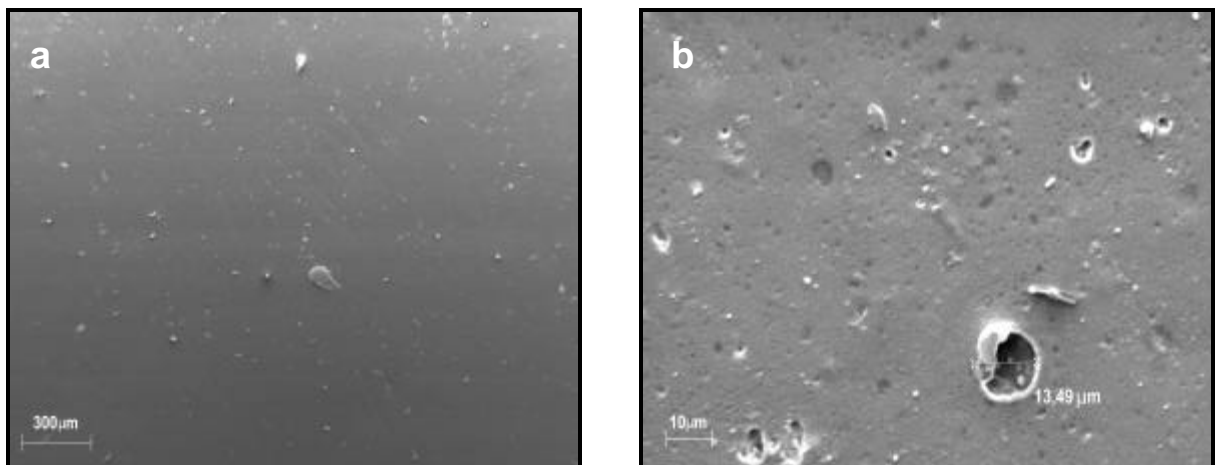


Figura 9 – Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila) revestimento fino com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) poucas imperfeições; b) presença de bolhas de ar devido a defeitos de fabricação

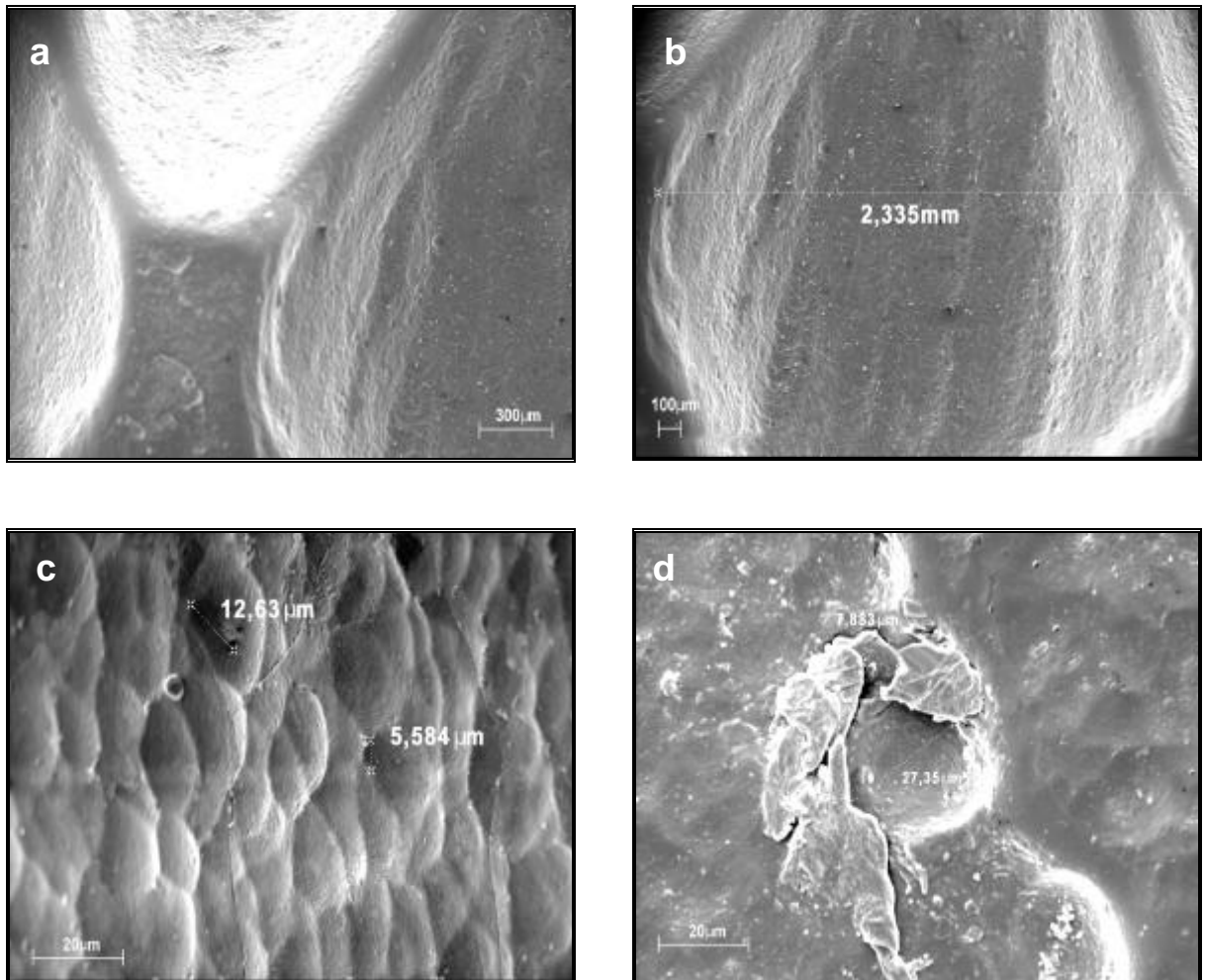


Figura 10 – Fotomicrografias de superfície de poliuretano rugoso dupla face observada por microscopia eletrônica de varredura. a) e b) aspectos não uniformes da superfície, c) ondulações com diâmetros variados; d) depressões com diâmetros variados

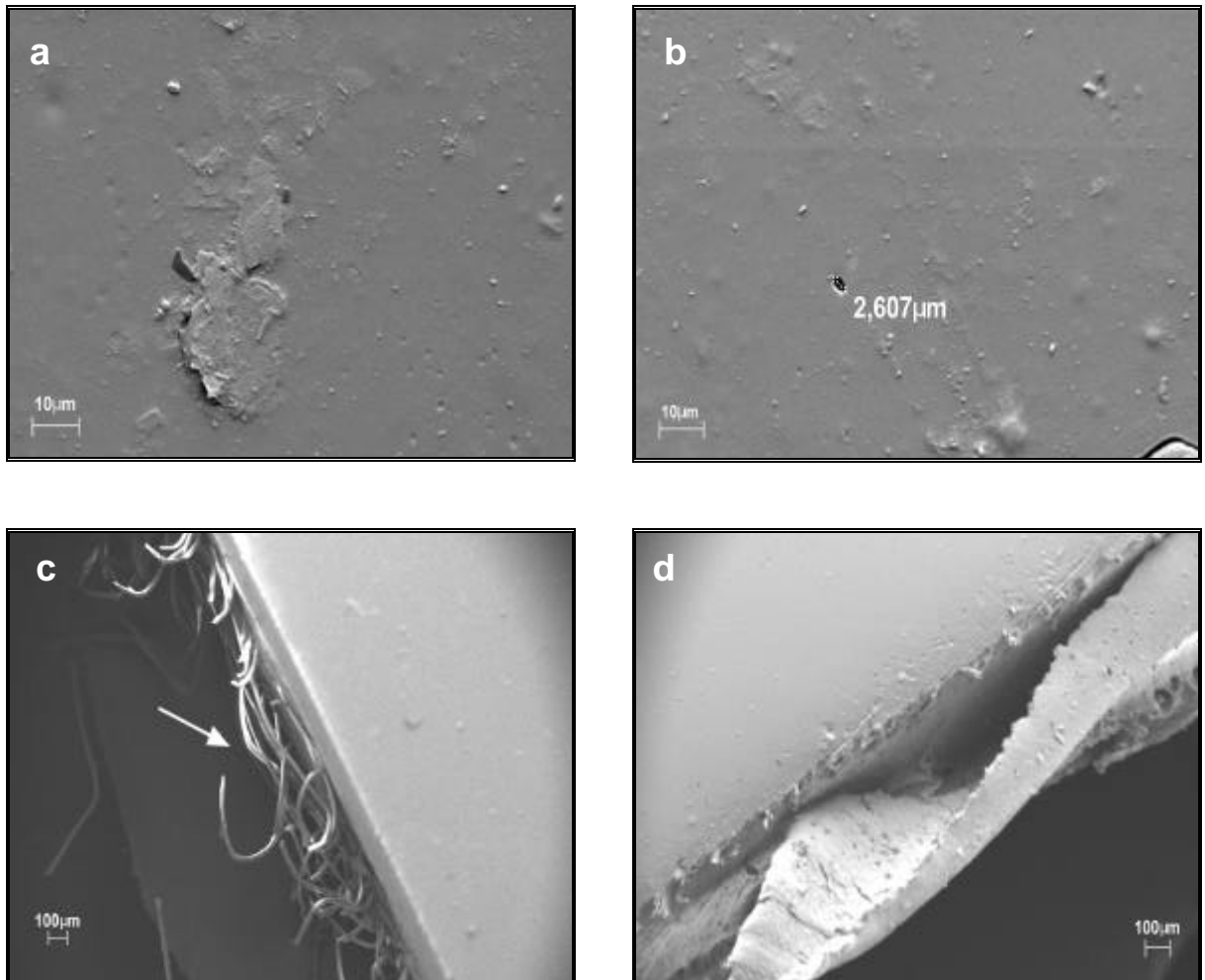


Figura 11 – Fotomicrografia de superfície de poli (cloreto de vinila) revestimento grosso com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de elevações; b) presença de microfuro, c) esgarçamento do tecido (seta); d) porosidade lateral

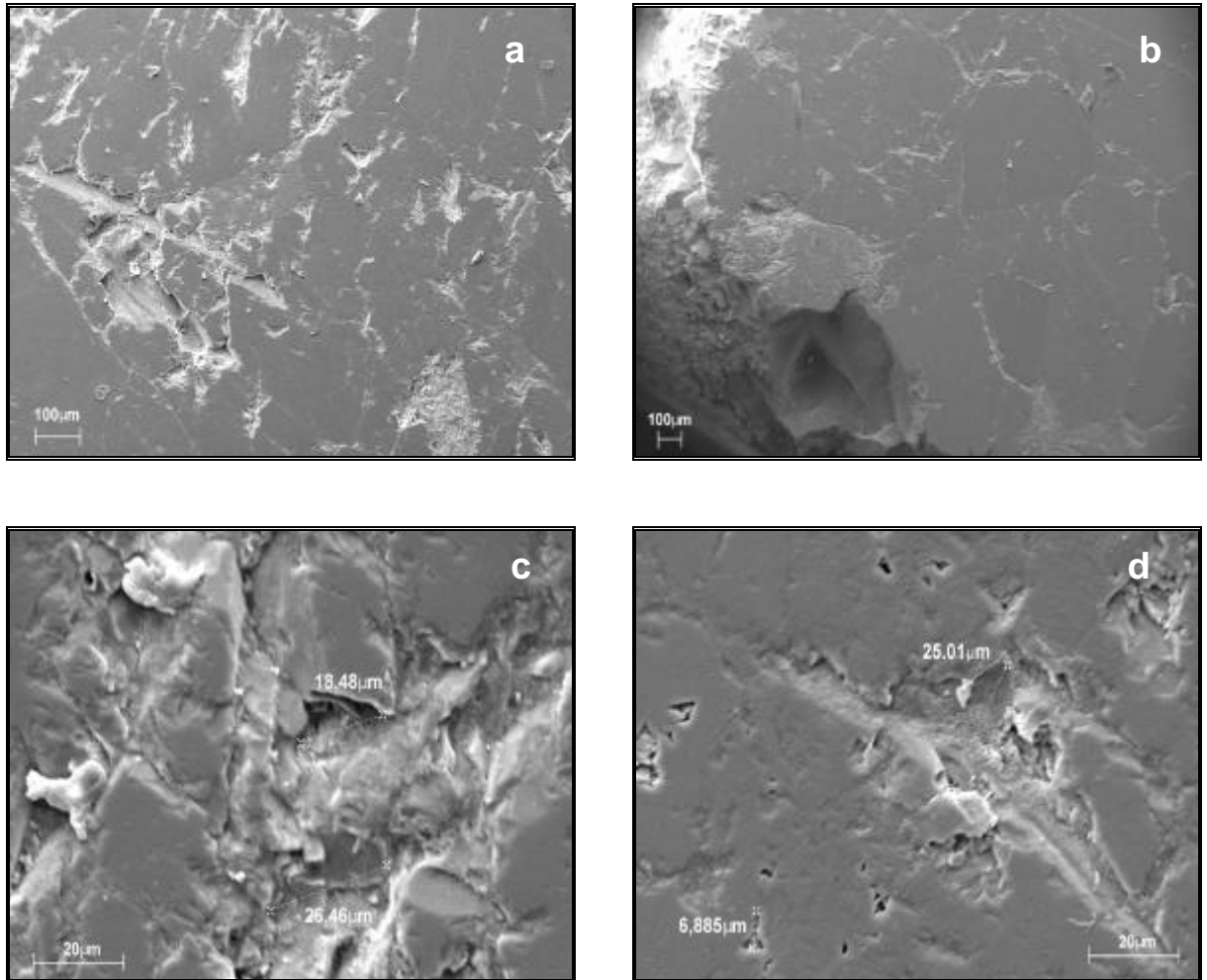


Figura 12 – Fotomicrografia de superfície de granito observada por microscopia eletrônica de varredura. a) presença de ranhuras e fendas; b) rugosidades (vista lateral); c) e d) ondulações e depressões com diâmetros variados

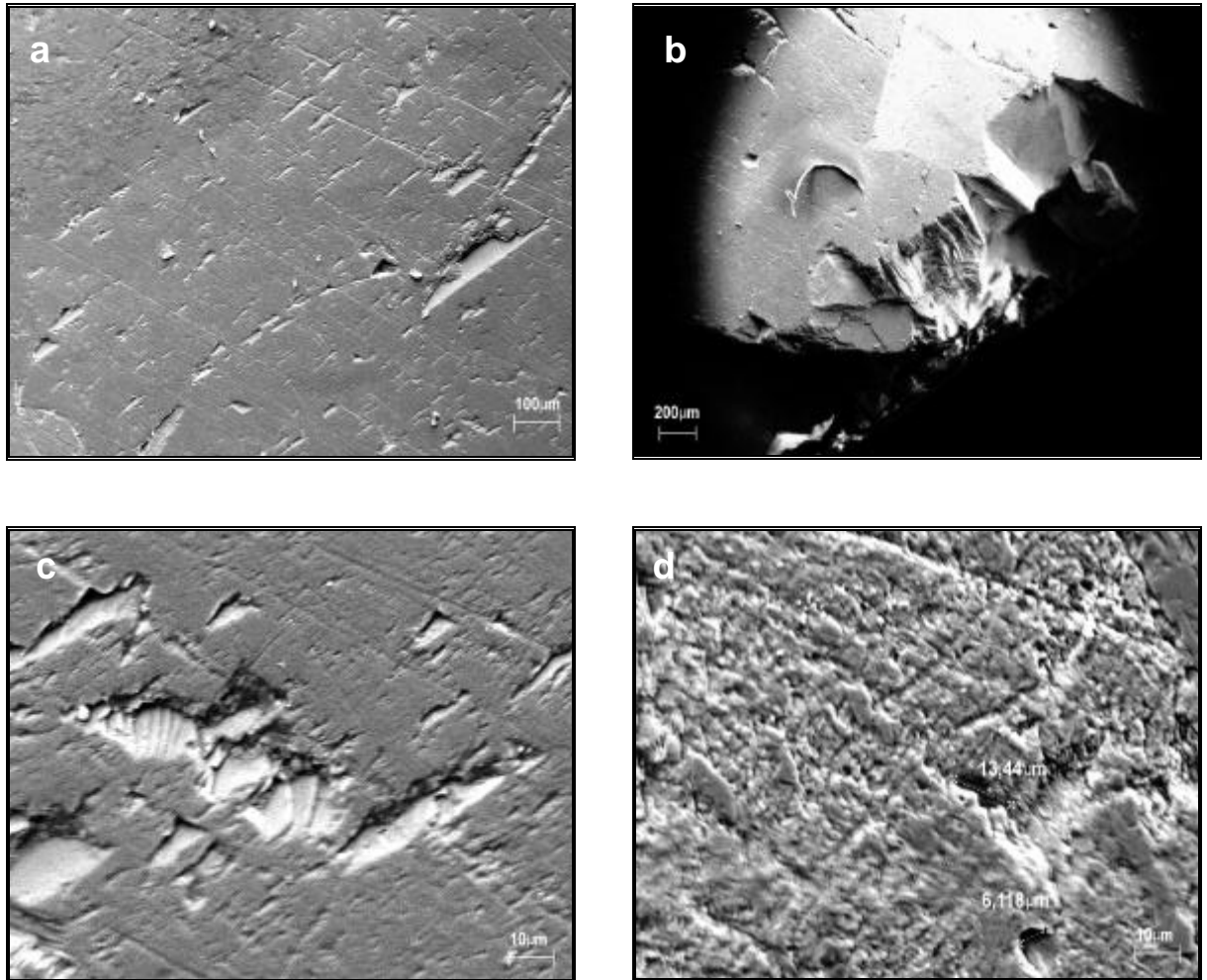


Figura 13 – Fotomicrografia de superfície de mármore observadas por microscopia eletrônica de varredura. a) e c) presença de ranhuras e fendas; b) rugosidades (vista lateral); d) presença de porosidades

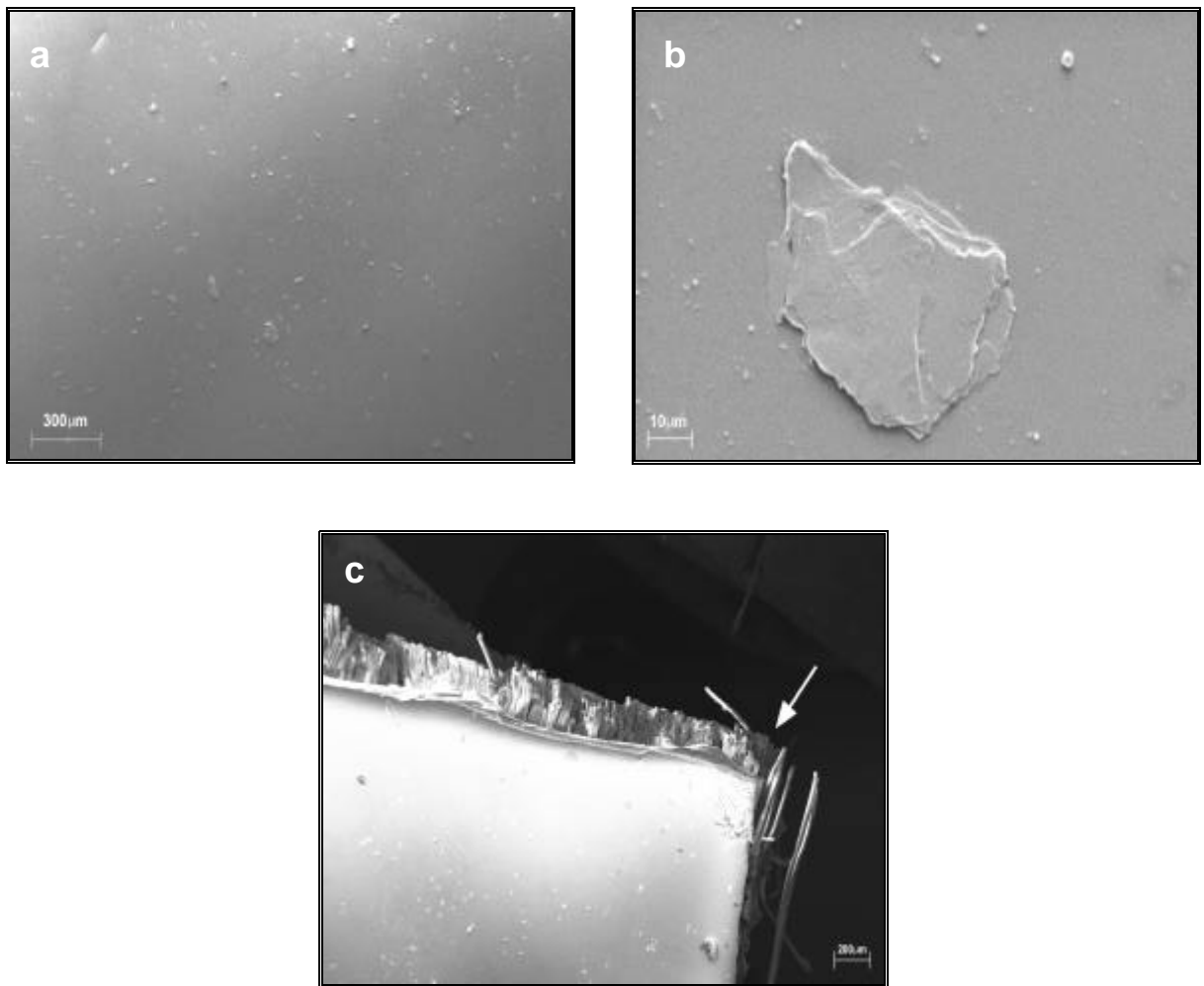


Figura 14 – Fotomicrografia de superfície de silicone revestido com tecido observada por microscopia eletrônica de varredura. a) poucas imperfeições; b) presença de elevação; c) esgarçamento do tecido (seta)

MOREIRA (2002) isolou vários tipos de microrganismos aderidos em bancadas de mármore e granito utilizadas em serviços hospitalares, como *Bacillus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Proteus vulgaris* e *Shigella sonnei*. Entre os microrganismos encontrados nas superfícies de mármore, foi constatado pelo autor 15% de adesão por *Pseudomonas aeruginosa*, 15% de adesão por *Staphylococcus haemolyticus* e 70% de adesão por outros microrganismos.

4.3. Avaliação das técnicas EPF e CPP para a determinação das células aderidas às superfícies

Observou-se, de acordo com a Tabela 3, que ambas as técnicas avaliadas apresentaram resultados que foram diferentes pelo teste F ($P < 0,05$) para os tempos de contato, confirmando resultados de PARIZZI et al. (2004). A EPF sempre fornece resultados de adesão maiores do que a CPP. Uma provável justificativa para o menor número de células sésseis na CPP pode ser devido ao fato de que estas bactérias não são completamente removidas para a solução diluente após a amostra do cupom ser submetida ao vórtex. Uma outra explicação é o fato de que na técnica de EPF utiliza-se um fator de correção do microscópio (FM) para a estimativa do número de células aderidas. Neste caso, o fator de correção utilizado era de 3.400, ou seja, cada célula observada no campo do microscópio era equivalente a $3,4 \times 10^3$ UFC.cm⁻². Para a técnica de CPP, cada colônia contada na placa de Petri era equivalente a $2,5 \times 10^0$ UFC.cm⁻².

Observou-se que a sensibilidade das técnicas se altera de acordo com o tempo de contato. No tempo zero, a técnica CPP nos fornece resultados de adesão para todas as superfícies. No entanto, não foi possível quantificar a adesão neste mesmo tempo de contato para a técnica EPF (Tabela 5), apenas mostrou-se que o log do número de *Pseudomonas fluorescens* aderidas era inferior a 3,53. Estes resultados mostraram que a técnica EPF, quando comparada a CPP, apresenta menor sensibilidade à determinação de baixos números de células sésseis. Dessa forma, a contagem mínima necessária na amostra para que a EPF seja utilizada está diretamente ligada ao fator do microscópio (SAKATE et al., 2004). Portanto, para que haja detecção por esta técnica, a quantidade de células aderidas aos cupons deve estar com contagens médias de uma célula por campo, no mínimo.

Além de terem sido confirmadas a morfologia de bastonetes e de coloração de Gram negativo das células de *P. fluorescens* ATCC 13525 por microscopia ótica, também se pôde fazer a confirmação de características morfológicas, distinguir células alaranjadas de células esverdeadas e verificar como as células aderidas estavam distribuídas em algumas superfícies pela microscopia de epifluorescência (Figura 15). Embora tenha sido possível a contagem das células aderidas, houve dificuldade de observação das mesmas em algumas superfícies como os dois tipos de PVC, silicone revestido com tecido e PU revestido com tecido por esta técnica. É difícil explicar tal fato, uma vez que essas superfícies não são as mais rugosas quando observadas visualmente.

Tabela 5 – Médias da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, a 28 °C e em caldo nutriente, no tempo de contato zero em nove tipos de superfícies usadas em indústrias de alimentos avaliadas pela microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).

Superfícies	Log UFC.cm ⁻²	
	EPF	CPP
AIN	<3,53	1,21
PU _{DF}	<3,53	1,42
PU _{RT}	<3,53	1,93
PU _{DR}	<3,53	2,27
PVC _{RF}	<3,53	1,37
PVC _{RG}	<3,53	1,90
SIL _{RT}	<3,53	1,76
GRA	<3,53	1,42
MAR	<3,53	1,67

AIN = Aço inoxidável 304 # 4; PU_{DF} = Poliuretano liso dupla face; PU_{RT} = Poliuretano revestido com tecido; PU_{DR} = Poliuretano rugoso dupla face; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; SIL_{RT} = Silicone revestido com tecido; GRA = Granito; MAR = Mármore

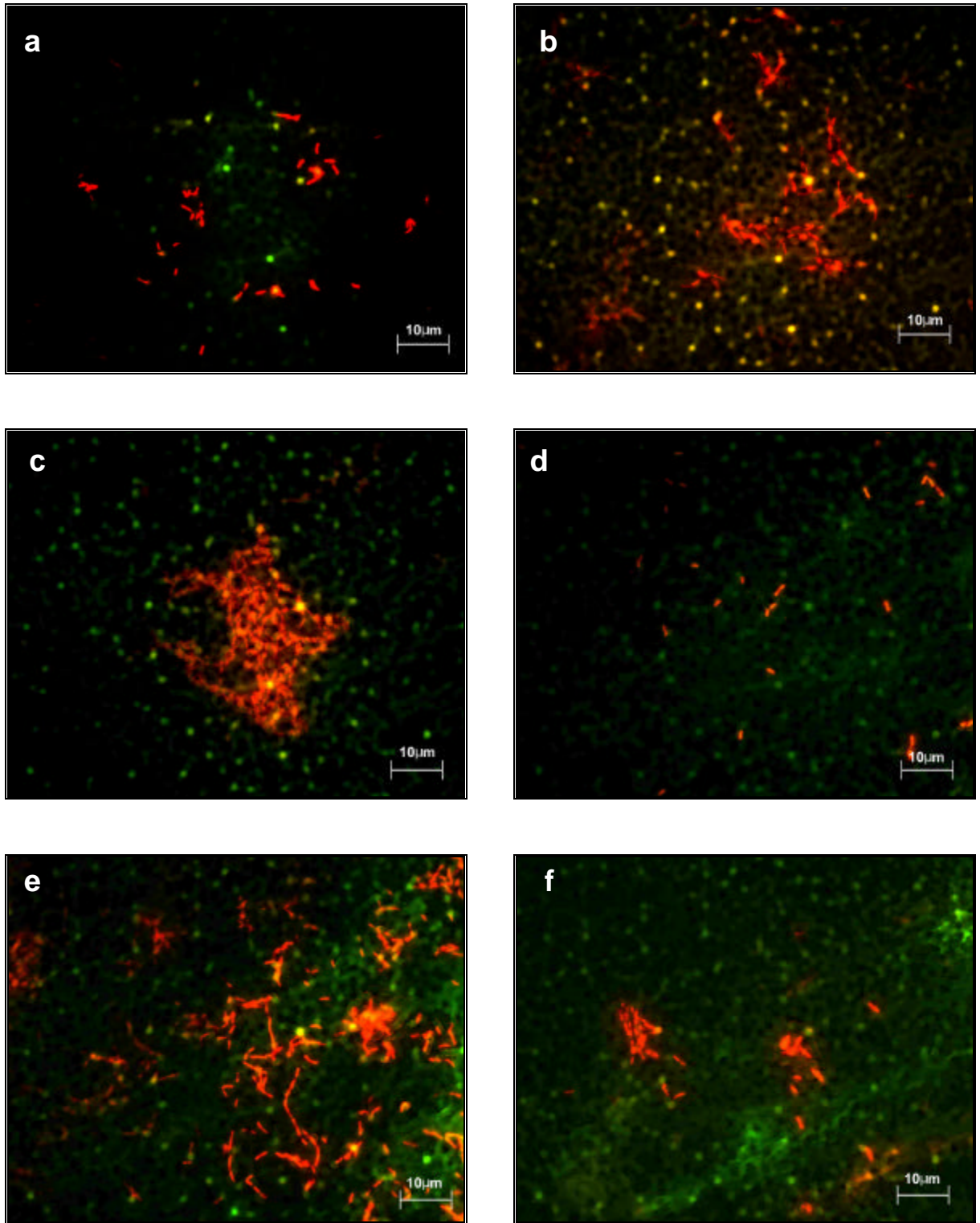


Figura 15 – Adesão de *P. fluorescens* ATCC 13525, a 28 °C e em caldo nutriente, em algumas superfícies visualizada por microscopia de epifluorescência após diferentes tempos de contato. (a) aço inoxidável 304 # 4, 6 h; (b) Poli (cloreto de vinila) revestimento fino com tecido, 10 h; (c) Poli (cloreto de vinila) revestimento grosso com tecido, 8 h; (d) Granito, 2 h; (e) Mármore, 8 h; (f) Poliuretano liso dupla face, 6 h

Diante das observações ao microscópio, verificou-se que a EPF pode ser considerada como uma técnica recomendável para a avaliação da adesão bacteriana, principalmente quando o número de células por campo é inferior a 120, ou seja, contagens de até $4,1 \times 10^5$ UFC.cm⁻². Valores mais elevados poderiam diminuir a exatidão pela contínua contagem por campo e levariam o analista ao cansaço visual, podendo ocasionar a obtenção de resultados não exatos.

No entanto, a EPF fornece resultados em apenas 20 minutos, portanto, bem mais rápidos quando comparado com a CPP, que demanda 48 horas para a realização das contagens. Por esse motivo, há a possibilidade de se analisar uma maior quantidade de amostras por dia pela EPF.

Como foi visto neste experimento, as duas técnicas permitem avaliar a adesão bacteriana. Vários estudos têm sido realizados com a técnica de EPF para avaliar adesão bacteriana e formação de biofilmes (ROSSONI e GAYLARDE, 2000; KALMOKOFF et al., 2001), eficiência de sanitizantes em biofilmes de *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas aeruginosa* (WIRTANEN et al., 2001), enumeração de bactérias em leite cru (SAKATE et al., 2004), quantificação de bactérias probióticas em alimentos (BERNARDEAU et al., 2001), controle microbiológico de vinhos (KOPKE et al., 2000), entre outros.

Estudos têm sido realizados com a técnica de CPP para avaliar a adesão de esporos de *Bacillus cereus* em aço inoxidável após o procedimento de higienização (JULLIEN et al., 2002), ocorrência de esporos de *Bacillus cereus* em linha de processamento de leite (FAILLE et al., 2001), detecção de *Streptococcus thermophilus* em linha de processamento de queijos (KNIGHT et al., 2004) e formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em aço inox (CARPENTIER e CHASSAING, 2004).

5. CONCLUSÃO

Todas as superfícies avaliadas permitiram maior ou menor grau de adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, de acordo com o tempo de contato.

O aumento da adesão do microrganismo entre as superfícies, em razão do tempo, não foi demonstrado de forma similar pelas técnicas de contagem padrão em placas e microscopia de epifluorescência, quando avaliado pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Houve diferença entre as técnicas com relação ao agrupamento das superfícies de acordo com a similaridade de adesão. Assim, as superfícies que apresentaram maior porcentagem de similaridade e maior número de *Pseudomonas fluorescens* aderidas pela técnica de microscopia de epifluorescência foram mármore, granito e poliuretano rugoso dupla face. No caso da contagem padrão em placas, este mesmo fato foi constatado para as superfícies de poliuretano rugoso dupla face, silicone revestido com tecido e granito.

As superfícies apresentaram características de microtopografias muito diferentes quando observadas por microscopia eletrônica de varredura, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão observados. As superfícies de poliuretano rugoso dupla face, mármore e granito são extremamente rugosas, podendo destacar ainda características de porosidade especialmente nas pedras.

As técnicas possuem comportamentos diferentes para cada tempo de contato. Em todos os casos, constatou-se que a contagem padrão em placas além de fornecer resultados menores do que a microscopia de epifluorescência também permite a detecção de valores de adesão mais baixos, sendo considerada uma técnica mais

sensível. Porém, a contagem padrão em placas fornece resultados em torno de 48 h, mostrando-se como uma técnica mais demorada, pois o tempo gasto para realização de análises pela microscopia de epifluorescência é de cerca de 20 minutos.

Não há como fazer uma sugestão sobre qual superfície seria a mais recomendada para a utilização em processamento de alimentos, em virtude de suas aplicações específicas. É necessário um estudo posterior para verificar se as imperfeições encontradas em cada tipo de superfície estariam servindo como um esconderijo para estas bactérias aderidas.

Os resultados mostram a importância de práticas higiênicas corretas na indústria de alimentos. Dessa forma, sugere-se avaliar estes procedimentos de higienização e o uso de agentes sanitizantes mais adequados às superfícies submetidas à adesão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM_a - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **Atividades Setoriais: Silicones**. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/setorial/silicones/asp>>. Acesso em: 29 set. 2004.

ABIQUIM_b - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **Poliuretanos**. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/canais.asp?id=13>>. Acesso em: 29 set. 2004.

AKUTSU, C. K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. Viçosa, MG. UFV, 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

ALLISON, D. G., McBAIN, A. J., GILBERT, P. Biofilms: problems of control. In: **Community Structure and Co-operation in Biofilms**, Proceedings of the 59th. Symposium of the Society for General Microbiology, Exeter, UK. eds GILBERT, P., LAPPIN-SCOTT, M., WILSON, M. Cambridge, UK. p. 309-328. University Press, 2000.

ALLISON, D. G., RUIZ, R., SANJOSE, C., JASPE, A., GILBERT, P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 179-184, 1998.

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

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

ANDRADE, N. J., MACEDO, J. A. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela. 182 p., 1996.

ANTUNES, L. C. M. A linguagem das bactérias. **Ciência hoje**, v. 33, n. 193, p.16-20, 2003.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state of the art methods of study. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 53, p. 177-183, 2004.

BEECH, I. B., GAYLARDE, C. C. Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 201-207, 1989.

BEER, D., SRINIVASAM, R., STEWART, S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilm during disinfection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4339-4344, 1994.

BERESFORD, M. R., ANDREW, P. W., SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1000-1005, 2001.

BERNARDEAU, M., VERNOUX, J. P., GUEGUEN, M. Usefulness of epifluorescence for quantitative analysis of lactobacilli in probiotic feed. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p.1103-1109, 2001.

BETTS, R. P.; FARR, L., BANKES, P., STRINGER, M. F. The detection of irradiated foods using the direct epifluorescent filter technique. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 64, p. 369-335, 1988.

BIER, J. W., SPLITTSTOESSER, D. F., TORTORELLO, M. L. Microscopic methods. In: DOWNES, F. P., ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. APHA, cap. 4, p. 37-42, 2001.

BOLETTI, F. T. Manufacturer of vinegar. **Microbiology: a textbook on microorganisms general and applied**. C. E. Marshall. London, Churchill, p. 636-648, 1921.

BOS, R., VAN DER MEI, H. C., BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 23, p. 179-230, 1999.

BOULANGE-PETERMANN, L. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, v. 5, p. 21-36, 1996.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. **Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, Boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e Qualidade na Área de Alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 13 mai 2005.

CARPENTIER, B., CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premisses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 111-122, 2004.

CHARACKLIS, W. G., COOKSEY, K. E. Biofilm and microbial fouling. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 93-137, 1983.

COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86-89, 1978.

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

CZECHOWSKI, M. H. Gasket and stainless steel surface sanitation: environmental parameters affecting bacterial attachment. **Australian Journal of Dairy Technology**, p. 38-39, 1990.

DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., COSTERTON, J. W., GREENBERG, P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DENYER, S. P., GORMAN, S. P., SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Londres: Blackwell Scientific Publications. 333 p., 1993.

DI MARTINO, P., CAFFERINI, N., JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 *pili* facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 9-16, 2003.

DOYLE, M. P. A new generation of foodborne pathogens. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 12, n. 8, p. 490-493, 1992.

DRUGGAN, P., FORSYTHE, S. J., SILLEY, P. Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. In: **New Techniques in Food and Beverage Microbiology**. Society for Applied Bacteriology, Technical Series nº 31. Blackwell Science, Oxford, p. 120-125, 1993.

EHLERS, L. J., BOUER, J. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. **Water Science and Technology**, v. 7, p. 163-171, 1999.

ESCHER, A., CHARACKLIS, W. G. Modeling the initial events in biofilm accumulation. In: CHARACKLIS, W. G. and MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York, p. 445-486, 1990.

FAILLE, C., FONTAINE, F., BÉNÉZECH, T. Potencial occurrence of adhering living spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 892-900, 2001.

FLETCHER, M. Adherence of microorganisms to smooth surfaces. In: BEACHEY, E.H. (Ed.) **Bacterial adherence**. New York: Chapman and Hall, p. 78-97, 1980.

FLETCHER, M. How do bacteria attach to solid surfaces? **Microbiology of the Science**, v. 4, p. 133-136, 1987.

FLINT, S., PALMER, J., BLOEMEN, K., BROOKS, J., CRAWFORD, R. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 151-157, 2001.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Consultoria, supervisão e revisão técnica: Eduardo César Tondo. Porto Alegre: Artmed, p. 151-154, 2002.

FRASCÁ, M. H. B. O. Mármore e granito: uso e conservação. Disponível em: <<http://www.ipt.br/tecnologia/chat/?ARQ=110>> Acesso em: 05 dez. 2004.

FUQUA, W. C., WINANS, S. C., GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 269-275, 1994.

GHINGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, v. 412, p. 442-445, 2001.

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

HAUSNER, M., WUERTZ, S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3710-3713, 1999.

HAYES, P. R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Tradução Bernabé Sanz Pérez. Zaragoza : Acribia, p.187-196, 1993.

HERALD, P. J., ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal Food Protection**, v. 51, n. 6, p. 445-448, 1988.

HEYDOM, A., ERSBOLL, B., KATO, J., HENTZER, M., PARSEK, M., TOLKER-NIELSEN, T., GIVSKOV, M., MOLIN, S. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling and stationary-phase factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2008-2017, 2002.

HJELM, M., HILBERT, L. R., MOLLER, P., GRAM, L. Comparison of adhesion of the food spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens* to stainless steel and silver surfaces. **Journal of Applied Microbiology**. v. 92. p. 903-911, 2002.

HOLAH, J. T., BETTS, R. P., THORPE, R. H. The use of direct epifluorescent microscopy (DEM) and direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p. 215-221, 1988.

HOLT, J., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9^a ed., Baltimore: Williams Wilkins, p.93, 1994.

HOOD, S. K. **Adherence of foodborne microorganisms to stainless steel**. Ph.D Thesis. University of Minnesota, St Paul, p.129, 1996.

HOOD, S., ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 8-18, 1995.

HUNTER, A. C., McCOQUODALE, R. M. Evaluation of the direct epifluorescent filter technique for assessing the hygienic condition of milking equipment. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p. 9-16, 1983.

INSTITUTO DO PVC. **O PVC**. Disponível em: <<http://www.institutodopvc.org/pvc.htm>>. Acesso em: 29 set. 2004.

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

KALMOKOFF, M. L., AUSTIN, J. W., WAN, X. D., SANDERS, G., BANERJEE, S., FARBER, J. M. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.725-734, 2001.

KNIGHT, G. C., NICOL, R. S., McMEEKIN, T. A., Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 305-318, 2004.

KOPKE, C., CRISTOVÃO, A., PRATA, A. M., PEREIRA, C. S., MARQUES, J. J. F., SANROMA, M. V. Microbiological control of wine. The application of epifluorescence microscopy method as a rapid technique. **Food Microbiology**, v. 17, p. 257-260, 2000.

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

LAWRENCE, J. R., NEU, T. R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. **Methods Enzymology**, v. 310, p. 131-144, 1999.

LE CHEVALLIER, M. W., CAWTHON, C. L. D., LEE, R. G. Inactivation of biofilm bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2492-2499, 1988.

LE CLERCQ-PERLAT, M. N., LALANDE, M.. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. **Journal of Food Engineering**, v. 23, p. 501-517, 1994.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 179-184, 2003.

LEREBOUR, G. CUPFERMAN, S. BELLON-FONTAINE, M. N. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin[®] reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 7-16, 2004.

LÓPEZ, E. S. **Piedras, granitos y marmoles**. 7 ed. Barcelona:CEAC,1970. 200p.

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society Microbiology News**, v. 58, p. 202-207, 1992.

MASSON, Y., AINSWORTH, P., FULLER, D., BOZKURT, H., IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 125-131, 2002.

MIDELET, G., CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 262-270, 2004.

MOREIRA, L. R. C. **Bancadas hospitalares: Superfícies e porosidades como fontes potenciais de infecção**. São José dos Campos, SP. Univap, 2002. 91p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, 2002.

O'TOOLE, G. A., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2000.

O'TOOLE, G. A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 295-304, 1998.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

PARIZZI, S. Q. F., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., SILVA, C. A. S., MONTEIRO, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, PR, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PARSEK, M. R., GREENBERG, E.P. Acyl homoserine lactone quorum sensing in Gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher

organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8789-8793, 2000.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

PINTO, U. M. **Quorum sensing em bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite**. Viçosa, MG: UFV, 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.

PIRES, A. C. S., ANTUNES, V. C., SILVA, C. A. S., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., PINTO, F. C., CORREIA, R. F., SANTOS, N. T. Adesão de *Pseudomonas fluorescens* e esporos de *Bacillus subtilis* em polietileno submetido a irradiação com Cobalto ⁶⁰. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 59, p. 304-307, 2004.

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

ROBERTS, A. P., PRATTEN, J., WILSON, M., MULLANY, P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. **FEMS Microbiology Letter**,. v. 177, p. 636, 1999.

RODOLFO Jr., A., NUNES, L. R., ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. Consultoria e revisão técnica Elias Hage Jr. São Paulo: Proeditores/Braskem, 400 p., 2002.

RODRIGUES, U. M., KROLL, R. G. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, p. 139-144, 1986.

RODRIGUEZ, F. **Principles of polymer systems**. 3rd ed. New York: Hemisphere Publishing Corporation, p. 602-603, 1989.

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

SANTOS, D. F. **Panorama nacional da segurança de alimentos**. In: I Fórum Estadual do Programa Alimentos Seguros – Palestra – Feira do Empreendedor, Anhembi, São Paulo, 2004.

SAKATE, R. I., BRANDÃO, S. C. C., PARIZZI, F. E., VANETTI, M. C. D., ANDRADE, N. J. Enumeração de bactérias em leite cru, utilizando a técnica de contagem direta por microscopia de epifluorescência (Direct epifluorescent filter technique – DEFT). **Higiene Alimentar**. v. 18, nº 120, p. 50-54, 2004.

SAKURAI, A., IMAI, H., TAKENAKA, Y., SAKAKIBARA, M. Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 689-696, 1997.

SAUER, K., CAMPER, A. K., EHRLICH, G. D., COSTERTON, J. W., DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1140-1154, 2002.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 295p., 1997.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W., HADDAD, A., SESSO, A., SILVEIRA, M., BARTH, O. M., MACHADO, R. D., SOUTO-PADRÓN, T. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, v. 1, p. 71-79, 1989.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 159 p., 1995.

SMITH, J.L., FRATAMICO, P.M. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.696-708, 1995.

SMITH, J. L., FRATAMICO, P. M., NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1053-1070, 2004.

STEVENS, M. P. **Polymer chemistry: an introduction**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, p. 440-492, 1990.

STONE, L. S., ZOTTOLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 951-956, 1985.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G., COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SWANSON, K. M. J.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H. JOHNSON, M. G ,Colony count methods. In: VANDERZANT, C., SPLITTSOESSER, D.F. (Ed.) **Compendium of methods to the microbiological examination of foods**. 3^a ed. APHA, cap.4, p.75-95, 1992.

TAKAZAKI, M., SUDO, R. NISHIMURA, O., KIM, H. Y. Simultaneous removal of nitrogen and THM precursors by developed submerged biofilm process for drinking water. **Water Science and Technology**, v. 26, n. 9, p. 2021-2024, 1992.

TATINI, S. R., MEKALA, P., EL-HABAZ, A., GRIFFITHS, M. W. Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing grade raw milks. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 861-867, 1991.

TYRER, H., AINSWORTH, P., IBANOGLU, S., BOZKURT, H. Modelling the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in ready-to-eat meals. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 137-143, 2004.

TORTORA, G. J., BERDELL, R. F., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, cap. 4, p. 96-98, 2000.

TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2ª ed., New York: Academic Press, p. 52-69, 1993.

VALCARCE, M. B., BUSALMEN, S. R., SÁNCHEZ, S. R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 61-66, 2002.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M., LYKLEMA, J., NORDE, W., ZEHNDER, A. J. B. Influences of interfaces on microbial activity. **Microbiology Reviews**, n. 54, p. 75-87, 1990.

VERGNAUD, J. M. Problems encountered for food safety with polymer packages: chemical exchange, recycling. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 78, n. 3, p. 267-297, 1998.

WIRTANEN, G., SALO, S., HELANDER, I. M., MATTILA-SANDHOLM, T. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. **Colloids and Surfaces**, v. 20, p. 37-50, 2001.

WONG, H., CHUNG, Y., YU, J. Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. **Food Microbiology**, v. 19, p. 341-350, 2002.

XAVIER, J. B., PICIOREANU, C., ALMEIDA, J. S., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, 2005. Disponível em: <<http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf>> Acesso em: 01 jul. 2005.

ZAQUEUS, O. M., IIVANAINEN, E. K., NISSINEN, T. K., LEHTOLA, M. J., MARTIKAINEN, P., J. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Research**, v. 34, p. 63-70, 2000.

ZOBELL, C. E., ALLEN, E. C. Attachment of marine bacteria to submerged surfaces. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 30, p. 1409-1411, 1935.

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 39-56, 1943.

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

ZOTTOLA, E. A . Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: Tortorello, M. L., Gendel, S. M. **Food microbial analysis – new technologies**. IFT basic symposium series. Marcell Dekker, INC. Cap.16, p. 315-346, 1997.

7. APÉNDICE

Apêndice – Médias da adesão de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 expressas em log UFC.cm⁻² em nove tipos de superfícies usadas em indústrias de alimentos nos tempos de contato (2, 4, 6, 8 e 10 h) avaliadas pelas técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e contagem padrão em placas (CPP).

Superfície	TC ₂		TC ₄		TC ₆		TC ₈		TC ₁₀	
	EPF	CPP	EPF	CPP	EPF	CPP	EPF	CPP	EPF	CPP
AIN	3,57 b A	1,62 b B	4,52 b A	2,64 c B	4,94 b A	3,19 c B	5,26 b A	4,02 c B	5,55 b A	4,95 b B
PU _{DF}	3,59 b A	1,95 b B	4,20 b A	3,10 b B	4,93 b A	3,94 b B	5,37 b A	4,83 b B	5,72 b A	5,10 b B
PU _{RT}	3,61 b A	2,74 a B	4,59 b A	3,45 a B	5,20 a A	4,77 a B	5,61 b A	5,09 b B	6,02 b A	5,57 a B
PU _{DR}	4,51 a A	3,07 a B	5,12 a A	3,85 a B	5,66 a A	4,58 a B	5,92 a A	5,33 a B	6,46 a A	5,93 a B
PVC _{RF}	3,73 b A	1,75 b B	4,18 b A	2,56 c B	4,67 b A	3,17 c B	5,47 b A	4,89 b B	5,90 b A	5,13 b B
PVC _{RG}	3,59 b A	2,67 a B	4,98 a A	3,18 b B	5,37 a A	4,23 b B	5,86 a A	4,98 b B	6,43 a A	5,90 a B
SIL _{RT}	3,81 b A	2,83 a B	5,10 a A	3,92 a B	5,71 a A	4,68 a B	6,03 a A	5,31 a B	6,54 a A	5,87 a B
GRA	4,38 a A	2,78 a B	4,89 a A	3,76 a B	5,44 a A	4,77 a B	5,87 a A	5,48 a B	6,54 a A	6,14 a B
MAR	4,11 a A	2,62 a B	4,77 a A	3,26 b B	5,40 a A	4,17 b B	5,90 a A	5,32 a B	6,54 a A	6,10 a B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada tempo de contato não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott e pelo teste F, respectivamente (P > 0,05).

AIN = Aço inoxidável; PU_{DF} = Poliuretano liso dupla face; PU_{RT} = Poliuretano revestido com tecido; PU_{DR} = Poliuretano rugoso dupla face; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; SIL_{RT} = Silicone revestido com tecido; GRA = Granito; MAR = Mármore