

FORMAÇÃO DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E MÉTODOS DE VALIDAÇÃO DE SUPERFÍCIES

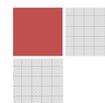
KASNOWSKI, Maria Carmela¹; MANTILLA, Samira Pirola Santos;
OLIVEIRA, Luiz Antônio Trindade; FRANCO, Robson Maia.

¹Doutorandas do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense-UFF, Niterói, RJ, Brasil. melvetk@yahoo.com.br,
samiramantilla@yahoo.com.br

² Professores Doutores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense-UFF, Niterói, RJ, Brasil.

RESUMO

Apesar dos recentes avanços tecnológicos e científicos, principalmente na indústria de laticínios, observa-se a ocorrência de enfermidades de origem alimentar, devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos. A formação de biofilmes ocorre em virtude da deposição e adesão de microrganismos em uma superfície de contato, a qual se fixam, constituem uma matriz de exopolissacarídeos e iniciam seu crescimento. Estes representam uma preocupação à indústria de alimentos por sua potencialidade em resistir a tratamentos antimicrobianos e à sanitizantes, além de causar deterioração, perda da qualidade ou veiculação de patógenos. Esta revisão teve como objetivo analisar as etapas e teorias de formação de biofilmes, os principais microrganismos envolvidos no processo e os métodos de prevenção do mesmo. Para evitar a formação de biofilme em indústrias alimentícias, deve-se atentar para a correta higienização das superfícies e equipamentos, realizando métodos de validação de superfícies como o teste do “swab” como forma de controle



laboratorial ou através da bioluminescência do ATP com o objetivo de evitar o início da produção quando houver falhas na higienização da planta de processamento.

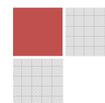
PALAVRAS- CHAVE: biofilme, adesão, microrganismos, superfície, indústria de alimentos.

ABSTRACT

Despite the recent technological and scientific advances, mainly in the industry of milk products, it is observed occurrence of foodborne diseases, due to food ingestion contaminated for pathogenic microorganisms. The formation of biofilms occurs in virtue of the deposition and adhesion of microorganisms in a faying surface, which if fixes, constitutes a matrix of exopolysaccharides and initiates its growth. These represent a concern to the food industry for its potentiality in resisting the treatments antimicrobial and to the clean products, besides causing deterioration, loss of the quality or propagation of pathogens. This revision had as objective to analyze the stages and theories of formation of biofilms, the main involved microorganisms in the process and the methods of prevention of the same. To prevent the formation of biofilm in nourishing industries, it must be attempted against for the correct hygienic cleaning of the surfaces and equipment, carrying through methods of validation of surfaces as the test of “swab” as form of laboratorial control or through the bioluminescence of the ATP with the objective to prevent the beginning of the production when it will have imperfections in the hygienic cleaning of the processing plant.

KEY WORDS: biofilm, adherence, microorganisms, surface, food industry.

INTRODUÇÃO



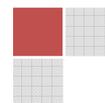
A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas com as bactérias organizadas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme. Esses biofilmes são constituídos por células aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas numa matriz de exopolissacarídeo. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (IST, 2008; KYAW, 2008).

Os biofilmes mais comuns na natureza são heterogêneos, compostos por duas ou mais espécies, podendo os produtos do metabolismo de uma espécie auxiliar o crescimento das demais e a adesão de uma dada espécie fornecer substâncias que promovem a ligação de outras. Inversamente, a competição pelos nutrientes e a acumulação de metabólitos tóxicos produzidos pelas espécies colonizadoras poderão limitar a diversidade de espécies num biofilme (IST, 2008).

Do ponto de vista da segurança alimentar e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada em sua remoção. Se formados em materiais da linha de produção da indústria de alimentos, podem acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria (FLACH et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo a realização do levantamento bibliográfico para explicar a formação e caracterização de biofilmes, ressaltando a importância na indústria de alimentos e os métodos de prevenção de biofilmes disponíveis.

CONCEITO E CONSTITUIÇÃO DE BIOFILMES



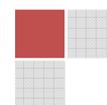
Um biofilme consiste em um complexo ecossistema microbiológico formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sejam bactérias, fungos e/ou protozoários de modo isolado ou em combinação, associados a seus produtos extracelulares constituindo uma matriz de polímeros orgânicos e que se encontram aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (COSTA, 1999; MACEDO, 2006; JAY, 2005; KYAW, 2008).

O biofilme contém partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta denominada matriz, abaixo da qual, os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos, e aumentando a proteção contra agressões químicas e físicas (PARIZZI et al., 2004; MACEDO, 2006).

As bactérias do biofilme possuem a mesma origem genética das bactérias planctônicas, entretanto, suas atividades bioquímicas diferem em 40%, o que as torna mais difíceis de serem eliminadas, pela maior resistência adquirida (MEDONLINE, 2008).

A matriz exopolissacarídea, que é secretada para o meio externo, é capaz de impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente. Em alguns casos, o exopolissacarídeo também pode seqüestrar cátions, metais e toxinas. Por estas razões, os biofilmes podem corresponder a excelentes mecanismos de transferência de metais nos ecossistemas. Foi também relatado a proteção adquirida contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (KYAW, 2008).

Diversos fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não apenas da fisiologia do microrganismo e seus fatores de crescimento, mas também da natureza do substrato (MACEDO, 2006). Dentre estes destacam-se: a genética, a virulência e a resistência do microrganismo; a nutrição; a área e o material da superfície e a velocidade do fluxo de líquidos (MEDONLINE, 2008).



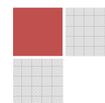
Para a adesão ocorrer devem existir forças atrativas entre a célula e a superfície, e evidentemente essas forças devem ser mais fortes que as repulsivas. Dentre as forças atrativas relacionadas à adesão estão as eletrostáticas, força de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações químicas (MACEDO,2006).

Em suma, o crescimento de qualquer biofilme é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua propagação às células localizadas no interior do biofilme. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme. Quando completamente maduro, o biofilme funciona como um consórcio funcional de células, com padrões de crescimento alterados, cooperação fisiológica e eficiência metabólica. Nesta fase, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética (IST, 2008).

ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME

Os biofilmes são formados sobre superfícies, uma vez que há maiores quantidades de nutrientes nestes locais, em comparação com líquidos. A adesão é facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, algumas vezes referida como glicocálix. Nesse microambiente são formadas microcolônias, bem como canais de água entre e em volta das mesmas. Tal sistema de irrigação que se localiza em volta das microcolônias tem sido correlacionado com um sistema circulatório primitivo, no qual nutrientes são trazidos para dentro e produtos tóxicos são carregados para fora. As células microbianas suspensas em líquidos, que não estão em biofilmes, apresentam-se em estado planctônico (livre flutuação) (JAY, 2005).

Um biofilme maduro pode levar de algumas horas até várias semanas para desenvolver-se, dependendo das condições de seu meio ambiente. Sendo assim, existem na literatura várias teorias propostas para formação de biofilmes (IST,2005; MEDONLINE,2008; MACEDO, 2006). Segundo Macedo (2006) a primeira teoria foi



descrita em 1971 por Marshall *et al.*, e ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram positivas e a parte externa da membrana externa das Gram negativas (MACEDO, 2006). Esta teoria de formação de biofilmes pode ser observada na Figura 1.

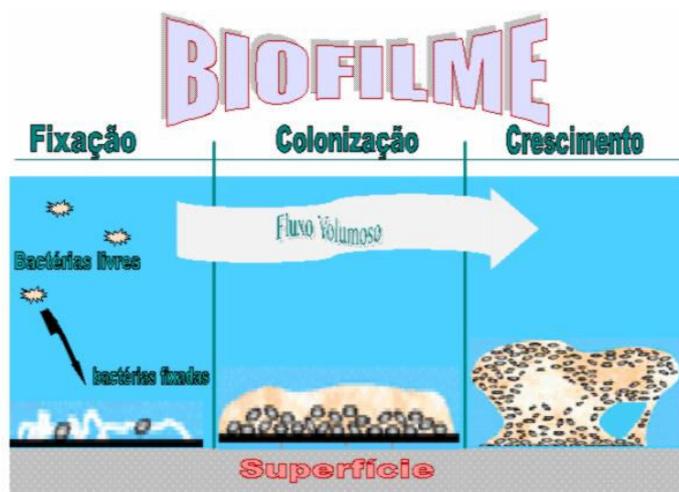
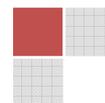


Figura 1 – Primeira teoria de formação de biofilme

Fonte: MEDONLINE, 2008

Outra teoria, ilustrada na Figura 2, sugere para a formação de biofilmes, cinco etapas que didaticamente podem ser colocadas na seguinte ordem: condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; transportes de células e nutrientes para o



sítio de aderência; início do processo de adesão bacteriana (“bactéria pioneira”), ainda reversível, por atração eletrostática; crescimento celular, colonização e adesão irreversível (colonizadores secundários); desenvolvimento e maturação do biofilme (IST,2005; MEDONLINE,2008; MACEDO, 2006).

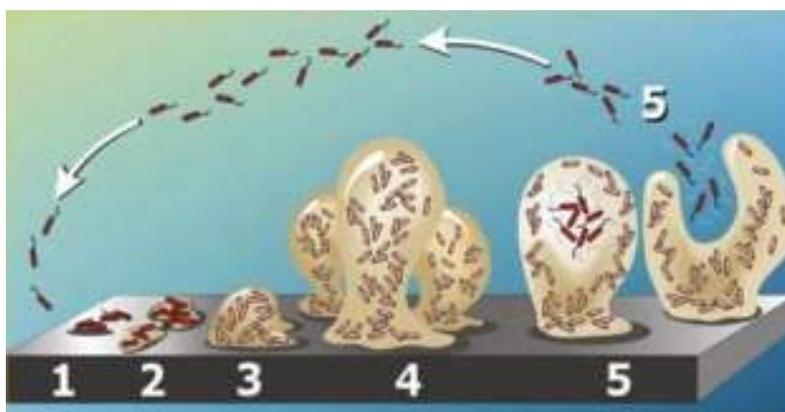
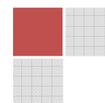


Figura 2- Segunda teoria de formação de biofilme

Fonte: INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2008

O condicionamento de uma superfície limpa e lisa consiste na adesão de moléculas orgânicas a esta superfície que neutralizam a carga que poderia repelir algum microrganismo que tentasse aproximar-se. Deste modo, bactéria planctônica que flutua livremente na água, primeiro adere por forças eletrostáticas e forças físicas, seguida da formação de microcolônias e, na maioria dos casos, a diferenciação das microcolônias em macrocolônias envolvidas numa matriz de exopolissacarídeo, formando biofilmes maduros (IST, 2008; MEDONLINE, 2008).

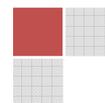
A adesão de uma bactéria a uma superfície abiótica é, geralmente, mediada por interações inespecíficas (forças hidrofóbicas), enquanto que a adesão a um tecido vivo



ou desvitalizado é normalmente mediada por mecanismos moleculares específicos de “ancoragem”, nomeadamente através de lectinas, ligandos ou adesinas. A adesão primária de um organismo a uma superfície é um processo reversível que envolve a aproximação deste à superfície, de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade. Quando o microrganismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada através de interações moleculares específicas mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular. Foi ainda demonstrado que os mecanismos de mobilidade das células, dependentes de *pili* superficiais e do flagelo polar são fundamentais no processo de iniciação de um biofilme (IST, 2008).

Após a adesão primária, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos que complexam os materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, *pili* ou fímbrias. Esses polissacarídeos extracelulares, com carga ou neutros, não só permitem a adesão da célula à superfície, mas também atuam como sistemas trocadores de íons, para captura e concentração de nutrientes da água. À medida que os nutrientes se acumulam, as células pioneiras se reproduzem e a colônia se estabelece originando microcolônias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. As microcolônias também sintetizam matriz exopolissacarídica (EPS) e passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários, que podem se aderir diretamente aos primários ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos e então se aderirem aos primários (IST, 2008; KYAW, 2008).

Posterior à adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme. A densidade e complexidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem (ou morrem) e os componentes extracelulares gerados pelas

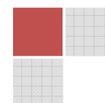


bactérias interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar o glicocálix. Nesta fase, os biofilmes tornam-se altamente hidratados, formando-se estruturas abertas compostas por 73 a 98% (75-95%) de material não celular, incluindo exopolissacarídeo e canais por onde circulam os nutrientes. Este conteúdo aquoso torna o biofilme com aspecto gelatinoso e escorregadio. A rede de polímeros capta outras células e seus resíduos, ou seja, os colonizadores secundários, agregando mais volume ao biofilme. O biofilme nesta fase apresenta alta atividade metabólica (IST, 2008; MEDONLINE, 2008). Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a liberar células em estado planctônico, que se podem rapidamente dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em outros locais. Existem três tipos de processos de dispersão: expansiva, quando parte das células de uma microcolônia sofre lise e outra retoma a motilidade, sendo então liberadas da estrutura; fragmentação, onde porções de matriz extracelular associadas a microrganismos são liberadas, e superficial que ocorre pelo crescimento do próprio biofilme como um todo (KYAW, 2008).

Com a ausência de nutrientes e/ou de oxigênio ou dificuldades na sua difusão, a diminuição do pH e acúmulo de metabólitos secundários tóxicos, inicia-se um processo de morte celular junto à superfície e subsequente desintegração do biofilme (IST, 2008).

Uma vez que o biofilme tenha se estabelecido, passa a ser uma intensa fonte de endotoxinas, muramilpeptídios e polissacarídeos, assim como de fragmentos de endotoxinas que são liberados na água. É extremamente difícil a remoção de biofilmes já constituídos, em função da forte adesão gerada pelas bactérias à superfície (MEDONLINE, 2008).

MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ADESÃO



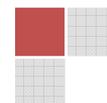
Dos microrganismos frequentemente encontrados num biofilme, as bactérias são o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as principais características que as fazem organismos com grandes capacidades de produção de biofilme (NITSCHKE, 2006).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e podem gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, ressalta-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterococcus faecium*. Como exemplos de patogênicos pode-se citar: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (CRIADO et al. , 1994; LERICHE e CARPENTIER, 1995; SMITH e FRATÂMICO, 1995; ANDRADE et al., 1998; PARIZZI et al., 2004).

LeChevalier et al. (1987) identificaram em tubulações a presença de estruturas morfolologicamente variadas incluindo bastões e cocos em cadeia. Além da predominância de *Arthrobacter* sp, em 20% dos isolados, que cobriam a superfícies de encanamentos, outros gêneros foram determinados, em sistemas de distribuição de água, como *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Achromobacter*.

Segundo Andrade et al. (1998) para se considerar um biofilme é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 à superfície. Por outro lado, Ronner e Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 respectivamente.

Flach et al. (2005) desenvolveram um estudo com o objetivo de determinar a relação entre a produção de fatores de virulência relacionados à colonização de superfícies e à formação de biofilmes. Foram obtidos 101 isolados do biofilme, dos quais 44 correspondiam às espécies bacterianas Gram positivas e todas do gênero *Staphylococcus*, e 57 às espécies Gram negativas. Dentre as Gram negativas foram



isoladas: *Cedecea* sp., *Comamonas* sp., *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechae*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Kluyera* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Serratia fonticola*, *Serratia plymuthica* e *Xanthomonas* sp. Do total de isolados testados, 52,5% foram produtores de cápsulas, 49,4% de fimbria, 4,0% de fimbria tipo I, 53,5% de hemolisina e 20,2% de proteases. Dos microrganismos Gram positivos e Gram negativos, 86,6% e 84,4% foram positivos para o teste de hidrofobicidade respectivamente.

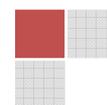
Haun e Cristianini (2004) pesquisaram a formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em placas de aço inoxidável utilizando o leite como substrato através de um sistema dinâmico e outro estático, simulando trocadores de calor e tanques de armazenamento respectivamente. Através do modelo estático foi possível obter contagens acima de 10^5 UFC por placa de aço inoxidável, mesmo após três ciclos de lavagem das placas em água estéril sob agitação.

De um modo geral, os métodos de identificação e estudo de biofilmes podem ser divididos em dois grupos: visuais e não visuais. Como métodos visuais resalta-se a microscopia de contraste, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Os métodos não visuais aplicados correspondem às medidas da impedância e de bioluminescência (MACEDO, 2006).

BIOFILME E A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular (PARIZZI et al. 2004; MACEDO, 2006).

O crescimento de microrganismos na superfície de alimentos é uma das principais causas de deterioração e perdas de produtos processados e *in natura*. Desta forma, com o intuito de prolongar a vida útil dos produtos, agentes antimicrobianos são



adicionados diretamente ao alimento ou pulverizados na superfície para controlar o crescimento da microbiota presente; e embalagens ativas são adotadas visando interagir com o produto alimentício eliminando ou inibindo microrganismos. Dentre estes, podem-se citar nitratos, lactato, nisina, natamicina, benzoato, propionato e, mais recentemente, o composto triclosan (CAMILLOTO et al., 2007).

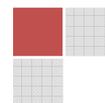
Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos, devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Dessa forma, podem constituir risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos (FLACH et al., 2005).

Alguns especialistas sugerem que a maioria dos surtos, cujos agentes etiológicos são transmitidos por alimentos, parece estar associado a biofilmes e justificam tal teoria com o fato dos surtos serem esporádicos, e não contínuos, assim como somente algumas porções dos produtos estarem contaminadas. Essa teoria surgiu a partir de análises dos famosos surtos de *Salmonella* spp. (leite em pó), *Listeria monocytogenes* (queijo) e *E. coli* O157:H7 (hambúrguer) (ZOTTOLA, 2001).

Em relação à saúde pública, além do perigo de transmissão de enfermidades ao consumidor, convém ressaltar que em um biofilme as bactérias podem ser 1000 vezes mais resistentes a um antimicrobiano, quando comparadas às mesmas células planctônicas (KYAW, 2008).

Na indústria de alimentos os biofilmes podem se acumular em uma variedade de substratos como, por exemplo: aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, poliestileno de baixa densidade, policarbonato, entre outros. Convém ressaltar que o biofilme, quando submetido ao calor, pode cristalizar e formar depósitos ou crostas que são muito aderentes, protegendo novos microrganismos e dificultando ainda mais os procedimentos de higiene (PARIZZI et al., 2004).

Brabes et al. (2004) avaliaram a formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. em superfícies de equipamentos utilizados em uma indústria de laticínios. O aço



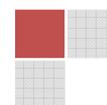
inoxidável foi a superfície que mais proporcionou condições para desenvolvimento de biofilmes, seguido do vidro e do polipropileno.

A adesão e a formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* nas superfícies de mármore, granito e aço inoxidável foram estudadas em função do tempo e temperatura. O número elevado desse microrganismo nas determinadas superfícies é preocupante, uma vez que é capaz de crescer a baixas temperaturas, sendo comumente a causa de deterioração em leite e derivados devido à produção de proteases e lipases termoestáveis (ROSADO et al., 2006).

Morelli et al.(2007) analisaram a adesão de *E. coli* O157:H7 em superfícies de aço inoxidável e PVC, adotadas em unidades de processamento de alimentos, em função do tipo de superfície e tempo de contato. Observaram que *E. coli* O157:H7, capaz de produzir exopolissacarídeos, apresentou maior ou menor grau de adesão nas superfícies avaliadas de acordo com o tempo de contato.

Portanto, o controle da aderência de microrganismos às superfícies é essencial para manutenção da qualidade dos alimentos. As operações de lavagem e sanitização, mesmo que freqüentes, não podem garantir a eliminação completa dos biofilmes, pois sabe-se que muitas das superfícies em contato com o alimento assim como as tubulações e equipamentos, apresentam cantos, sulcos, rugosidades, rachaduras, e “zonas mortas” (de baixo fluxo) onde os biofilmes facilmente se desenvolvem (NITSCHKE, 2006).

Um dos problemas que enfrenta a indústria de laticínios é a recontaminação do leite decorrente da formação de biofilmes em tanques de armazenamento e trocadores de calor. Baseado na tecnologia de esterilização de materiais por gás plasma, utilizada com sucesso na esterilização de instrumentos cirúrgicos, oftálmicos e dentários, foi desenvolvido um trabalho com o objetivo de avaliar a eficiência desse sistema sob células de *Pseudomonas fluorescens* aderidas em placas de aço inoxidável utilizando o leite como substrato. As placas de aço inoxidável com a bactéria aderida foram submetidas a um tratamento com gás plasma, que foi formado a partir de um produto

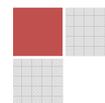


comercial composto por ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético. Foi observado que exposições acima de sete minutos foram capazes de produzir reduções superiores a dois ciclos logarítmicos na inativação do microrganismo (HAUN e CRISTIANINI, 2004).

Outro trabalho foi realizado visando avaliar a adesão dos microrganismos e a produção de fatores de virulência em quatro tipos de materiais de importância industrial: aço inoxidável, vidro, polipropileno e pano de algodão. Resultados preliminares das contagens indicaram que o pano de algodão favoreceu uma maior adesão, seguido por polipropileno, aço inoxidável e vidro, sendo que os dois últimos materiais revelaram aderência bacteriana bastante similar (FLACH et al., 2005).

Em qualquer sistema de circulação de água 99% das bactérias estão protegidas em biofilmes aderidas às superfícies internas, representando mais um problema para as indústrias de alimentos. Os biofilmes são a origem da grande maioria de bactérias que "flutuam" livremente na água corrente, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* considerada uma das que mais coloniza redes hidráulicas. A água potável constitui-se em ambiente limitado em termos de nutrientes, porém mesmo baixíssimas concentrações de matéria orgânica são suficientes para permitir crescimento e reprodução de bactérias (MEDONLINE, 2008)

Os microrganismos aderidos às superfícies apresentam uma resistência maior à ação dos sanificantes. Com base em pesquisas, comprovou-se que estes foram entre 150 e 3000 vezes mais resistentes à ação do ácido hipocloroso do que os microrganismos não aderidos, e em relação à ação de monoclarinas foram de 2 a 100 vezes mais resistentes. Do mesmo modo, as células de *L. monocytogenes* não aderidas foram eliminadas em 30 segundos de contato com o sanificante cloreto de benzalcônio, por sua vez as células aderidas resistiram ao mesmo sanificante de 10 a 20 minutos. Outros microrganismos como *Pseudomonas fluorescens* e *Yersinia enterocolítica*, quando na presença de sanificantes como iodóforo e hipoclorito de sódio sofrem uma redução de 5 RD (reduções decimais) no teste denominado de suspensão mas, quando estão aderidos



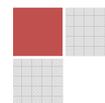
em borracha e teflon, os sanificantes alcançam valores próximos de no máximo 3,20 RD (MACEDO, 2006).

Outro problema enfrentado pelas indústrias é denominado de biocorrosão, definida como um processo complexo de deterioração de materiais promovido por microrganismos ocasionando danos nas suas estruturas (sistemas de refrigeração, tanques, condutas, etc.). Esses danos se traduzem não só em elevados prejuízos econômicos, mas também em problemas de saúde e segurança. Vários microrganismos estão envolvidos no processo sendo as SRB (bactérias redutoras de sulfato) apontadas como o grupo responsável pelos casos mais graves de biocorrosão (LINO e MEIRELES, 2008).

Por outro lado, os biofilmes nas indústrias, em alguns casos, podem ser benéficos, como na produção e degradação de matéria orgânica, degradação de poluentes ou na reciclagem de nitrogênio, enxofre e vários metais. A maioria destes processos requer o esforço coletivo de organismos com diferentes capacidades metabólicas. Assim, os biofilmes são usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de efluentes domésticos e industriais, metabolizando esgotos e águas contaminadas. No processo de tratamento de água potável, a remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de trihalometanos pode ser obtida por biofilmes microbianos submersos. Um outro exemplo, são os biofilmes existentes em reatores para a produção de fermentados (MACEDO, 2006).

Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos é essencial o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2006). Segundo Lemos (2002), são necessárias duas a quatro semanas para formação de um biofilme, portanto esses se formariam apenas em sistemas onde a limpeza e a sanitização forem deficientes.

Uma tendência futura é o uso de desinfecção "*ecologicamente correta*" através de ozônio on line, irradiação ultra-violeta e água aquecida para prevenção de contaminação da rede de distribuição de água tratada (MEDONLINE, 2008).

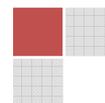


A adsorção de biossurfactantes em superfícies sólidas pode se constituir em uma nova e efetiva maneira de combater a adesão de microrganismos patogênicos em plantas de processamento de alimentos. Estes consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras que exibem propriedades surfatantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante. As aplicações no ambiente industrial são promissoras pois apresentam diversidade estrutural, possibilidade de produção em larga escala e a partir de fontes renováveis, são biodegradáveis e de baixa toxicidade. Na área de alimentos os biossurfactantes podem ser utilizados não apenas para o condicionamento de superfícies, mas também como agentes antimicrobianos e emulsificantes, ou seja como aditivos de múltipla função (NITSCHKE, 2006; ARAÚJO, 2006).

MÉTODOS DE VALIDAÇÃO DE HIGIENIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES

De acordo com Jay (2005), o método do “swab” ou suabe em superfície também conhecido como técnica de esfregação em superfície e consiste na aplicação de um suabe umedecido em uma área ou superfície para posterior contagem dos microrganismos presentes. Pode-se utilizar moldes que determinem uma área (por exemplo 10 cm²). O molde esterilizado é colocado sobre a superfície e a área exposta é esfregada com suabe umedecido. Este é colocado no tubo teste contendo um diluente apropriado e estocado em refrigeração até ser analisado. O resultado será dado em número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pela área do molde, neste caso, o resultado é igual a n° UFC/10cm². Também pode ser realizado para avaliar a higienização das mãos de manipuladores de alimentos, sendo que o resultado será expresso em UFC/mão.

A técnica de bioluminescência do Adenosina Trifosfato (ATP), de acordo com Contreras (2003) é também conhecida como validação de limpeza de superfícies ou sistema “Lightning”. Através desta técnica é possível saber se a limpeza foi bem feita antes de iniciar a produção. O resultado é instantâneo. O ATP é a fonte de energia de



todas as células animais, vegetais, leveduras e fungos. É muito estável se mantendo por longo tempo, mesmo depois da morte da célula (por até 2 horas). Uma superfície completamente limpa, onde não há resíduos de alimentos e mos, não terá níveis detectáveis de ATP.

Consiste em um “swab” aplicado a superfície a ser checada, sendo depois introduzido em um tubo com os reagentes necessários e colocado no luminômetro que mede a intensidade da luz (SILVEIRA, 2006).

A quantidade de ATP é detectada a partir de células metabolicamente ativas (resíduos orgânicos, inclusive microrganismos). O ATP reage com a enzima luciferase, extraída de vaga-lume, produzindo luz, medida em um luminômetro em Unidades Relativas de Luz (URL). A quantidade de luz produzida é diretamente proporcional à quantidade de ATP no local. Através de software, o luminômetro transforma URL em uma escala logarítmica de base dez, tendo uma escala variando de 0 a 7,5. Valores menores que 2,5 significam ausência de ATP detectável no local (ausência de material orgânico e microrganismos). Um esquema de um luminômetro e os possíveis resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 3. (CONTRERAS, 2003; SILVEIRA, 2006).

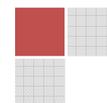
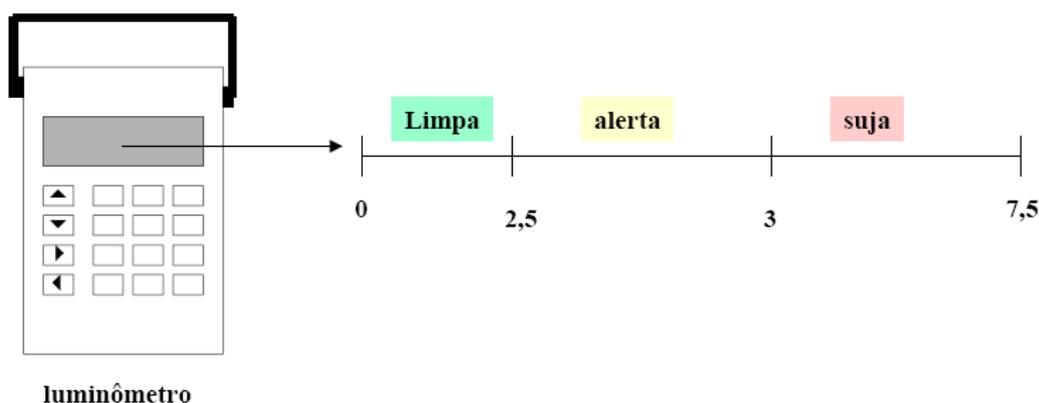


Figura 3- Luminômetro

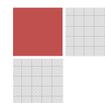
Fonte: SILVEIRA (2006)

Como este método detecta todo o ATP presente na superfície, não prediz a quantidade de microrganismo. Para isso, seria necessário remover todo o ATP não microbiano antes de iniciar o teste. Mas, pode ser utilizado para avaliar a limpeza da superfície, e deve-se levar em consideração que os níveis microbianos de ATP são maiores que os do próprio alimento (CONTRERAS, 2003).

Segundo Contreras (2003), a contagem em placas pelo método tradicional do “swab” mede somente a contaminação microbiológica viável e o resultado é dado após 48 horas. Em contrapartida a técnica de bioluminência mede resíduos de alimentos, bactérias, leveduras e fungos e os Resultados não são afetados por presença de sanitizantes, sendo obtidos em cinco minutos.

CONCLUSÃO

Os microrganismos formam o biofilme como estratégia para otimizar a sobrevivência, uma vez que são consideravelmente mais resistentes às substâncias antimicrobianas e à remoção por agentes comumente utilizados para limpeza e sanificação. Deste modo, constituem alvo de preocupação para indústria de produtos de origem animal por serem constituídos por patógenos ou deteriorantes, podendo ocasionar enfermidades aos consumidores e prejuízos econômicos devido à depreciação do produto final por alterações físico-químicas e sensoriais. Sendo assim, é imprescindível o estabelecimento em indústrias de alimentos de programas e procedimentos de higienização corretos, como o Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além disso, é de fundamental importância a utilização de métodos de validação de superfícies para um



controle do processo de higienização do local de produção de alimentos, contribuindo para prevenção da formação de biofilmes nas indústrias alimentícias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

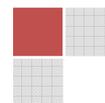
ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

ARAÚJO, L.V. **Biossurfatantes como agentes inibidores de adesão de *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inox.** Monografia. Medicina Veterinária. Universidade Estácio de Sá. R.J. 45p.2006.

BRABES, K.C.S.; *et al.* Avaliação de Processos de Adesão e Formação de Biofilmes por *Staphylococcus* spp. Produtores e Pauciprodutores de Enterotoxinas em Superfícies Utilizadas em uma Indústria de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios.** Juiz de Fora. MG: EPAMIG. v.59, n. 339, p. 190-194, jul/ago 2004.

CAMILLOTO, G.P.; *et al.* Desenvolvimento e avaliação de filme incorporado com triclosan para inibição de *Staphylococcus* spp. em queijo mussarela fatiado. *Instituto de Laticínios Cândido Tostes.* **Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios.** Juiz de Fora. MG: EPAMIG. V62, n.357. 2007.

CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B; MIYAGUSKU, L. **Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados** . São Paulo: Varela. 1. ed. 210 p., 2003.



COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável.** Seropédica, RJ. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

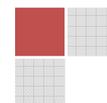
CRIADO, M. T., SUÁREZ, B., FERRERÓS, C. M., The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em materia-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33(3), 291-296, 2005.

HAUN, M.A.D.; CRISTIANINI, M. **Avaliação da Eficiência de um Esterilizador a Plasma na Inativação de *Pseudomonas fluorescens*.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos. UNICAMP, 2004.

INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. **Biofilme de bactérias agora pode ser quebrado.** Disponível em <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010160061031> em <<http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010160061031>>. Acesso em 6 de outubro de 2008.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes.** Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008. Disponível em < <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>>. Acesso em 8 de outubro de 2005.



JAY, J.M. Biofilmes. In: _____ **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 6ed. , p.673-674, 711p. 2005.

KYAW, C.M. **Biofilmes Microbianos**. Disponível em <www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm>. Acesso em 12 de outubro de 2008.

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

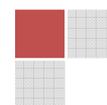
LEMOS, A.L.S.C. Biofilmes. **CTC- TecnoCarnes. Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de Carnes do Ital**. Vol XII, n.1, jan/fev. 2002.

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

LINO, A. R. L.; MEIRELES, M. **Biocorrosão**. Disponível em <cqb.fc.ul.pt/biocorrosion/biocorrosao.htm>. Acesso em 2 de outubro de 2008.

MACEDO, Jorge Antônio Barros. MILKNET. **Biofilmes Bacterianos: Uma Preocupação Para a Indústria de Alimentos**. 18 de julho de 2006. Disponível em <www.milknet.com.br>. Acesso em 4 de setembro de 2006.

MEDONLINE. Medicina on Line.. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. **Revista Virtual de Medicina**. Disponível em <www.medonline.com.br>. Acesso em 6 de setembro de 2008.



MORELLI, A.M.F. Adesão de *E. coli* O157:H7 em diferentes superfícies adotadas em unidades de processamento de alimentos. Inst. de Laticínios Cândido Tostes. **Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora. MG: EPAMIG. v62, n.357. 2007.**

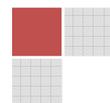
NITSCHKE, M. **Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos.** Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

PARIZZI, S. Q. F., *et al.* Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology.** Mar. 2004, vol.47, no.1, p.77-83. ISSN 1516-8913. 2004.

RONNER, A. B., WONG, A. C. L., Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

ROSADO, M.S., *et al.* Modelagem do processo de formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável, granito e mármore e avaliação das microtopografias dessas superfícies por microscopia eletrônica de varredura. **Higiene Alimentar.** v21, n150, p. 119-120. 2006.

SILVEIRA, N. F. A. Aplicação de métodos rápidos para controle microbiológico **Seminário Food Design: Tendências em HACCP, 28 de setembro de 2006.** Disponível em www.fooddesign.com.br/arquivos/academia/neliansilveira.pdf. Acesso em outubro de 2008.



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

ZOTTOLA, E.A. Reflections on *Salmonella* and other “wee beasties” in foods. **Food Technology**, v.55(9), p.60-67.2001.

WIRTANEN, G., HUSMARK, U., MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

