**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios

Bruna Nicolosi Franzini Silva Travagin

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2010**

Bruna Nicolosi Franzini Silva Travagin
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios

Orientador:
Prof^o Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Travagin, Bruna Nicolosi Franzini Silva

Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios / Bruna Nicolosi Franzini Silva Travagin. - - Piracicaba, 2010.

98 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias patogênicas 2. Biofilmes 3. Laticínios 4. Listeria I. Título

CDD 637.1277
T779e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

**À minha mãe Rosana e ao meu irmão Luiz
Gustavo, pelo amor e confiança.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas conquistas e por sempre iluminar meu caminho.

À minha mãe Rosana, pelo exemplo de vida, por todo o amor e dedicação, por sempre acreditar e apoiar as minhas decisões.

Ao meu irmão Luiz Gustavo, pelo companheirismo e carinho.

À minha avó Maria Luiza e à minha tia Luciana, por todo o apoio.

À Sarah, pelos momentos de descontração e alegria proporcionados durante esta fase.

À toda a minha família pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao Professor Dr. Ernani Porto pela orientação, apoio e amizade.

À técnica do Laboratório de Higiene e Laticínios, Denise, pela paciência, ajuda, disponibilidade, carinho e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Higiene e Laticínios, em especial às estagiárias Nicolle Ferraz de Arruda, Natália Sérgio Xavier, Natália Salaro Grigol, Maira Oliveira Silva, Leilane de Bernardini e Paula Bortolotto Mendes Ramos pela ajuda na execução deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado Bruno S. Rodriguez, Marina Marquezi, José Guilherme Prado Martin, Cristina Bani, Milla Santos e Tarsila Mendes.

Aos amigos Danielle Thomazoni, Gabriela Alves Masserani, Bernardo Santos da Costa, José Otávio Matias, Felipe Pasquotto, Rodrigo Araújo, Henrique Rossitti, e Luiz Fernando Ruy Sachett Dias pela amizade sincera.

Às amigas Luciana Kimie Savay da Silva, Maria Fernanda Calil Angelini, Vanessa Cristina Nogueira e Bárbara Belodi dos Santos por vibrarem por cada resultado obtido e ajuda nos momentos difíceis, minha eterna amizade e gratidão.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelo aprendizado de todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pelo apoio, que de alguma forma colaboração para a execução deste trabalho, em especial à Regina e Fábio.

À BIOSAN pelo fornecimento do sanificante para a realização deste trabalho.

À empresa SANI QUÍMICA pelo fornecimento dos detergentes para a realização deste trabalho.

À empresa GEA WESTFALIASURGE do Brasil, na pessoa de Dennys Pereira, pelo fornecimento das teteiras de borracha e silicone para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Professor Edwin M. Ortega pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Professora Gilma Lucazechi Sturion por todas as oportunidades, orientação e amizade durante esses anos.

Ao Professor Francisco André Ossamu Tanaka, por disponibilizar o Laboratório e todo o material necessário para a realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos demais colegas que não foram citados, mas que merecem igual respeito e agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Biofilmes	17
2.2 Fatores que influenciam a adesão microbiana	18
2.3 Adesão microbiana e formação de biofilmes	19
2.4 Os biofilmes e as indústrias de alimentos	21
2.4.1 Biofilmes na indústria de laticínios	22
2.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.5.1 Formação de biofilmes por <i>Listeria monocytogenes</i>	25
2.6 Biofilmes formados por espécies mistas de bactérias.....	26
2.7 Processos de higiene e sanificação	28
2.7.1 Compostos quaternários de amônio (CQAs)	29
2.8 Adaptação de microrganismos aos agentes antimicrobianos	32
2.9 Avaliação de biofilmes.....	33
2.9.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Ensaio preliminar para a determinação do tempo ideal de adesão de <i>L. monocytogenes</i>	35
3.1.1 Obtenção da cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> e preparo da suspensão	35
3.1.2 Preparo da Solução Padrão McFarland 0,5	36
3.1.3 Preparo dos cupons de aço inoxidável.....	36

3.1.4 Condicionamento dos cupons de aço inoxidável.....	37
3.1.5 Determinação do melhor tempo de adesão do biofilme de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.1.6 Contagem de células de <i>L. monocytogenes</i> aderidas aos cupons	38
3.2 Avaliação da influência do tempo, temperatura, substratos e superfícies na formação de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i>	39
3.2.1 Condicionamento das superfícies dos cupons de borracha e silicone e aço inoxidável.....	39
3.2.2 Avaliação da temperatura e do tempo na maturação de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i>	40
3.2.3 Avaliação da superfície de aço inoxidável, silicone e borracha pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
3.3 Avaliação da formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em co-cultura com <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
3.4 Avaliação da formação de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> sobre aço inoxidável na presença de resíduos de leite UHT integral e desnatado, e sua resistência frente ao processo de higienização CIP (Clean-in-Place)	43
3.4.1 Higienização dos cupons	43
3.4.3 Avaliação da eficiência do processo CIP na remoção de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
3.5 Análise estatística	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Determinação do tempo ideal de adesão de <i>L. monocytogenes</i> em cupons de aço inoxidável condicionados com diferentes substratos a 35º C	47
4.2 Estudo da formação de biofilmes: influência do tempo, substrato e superfície	48
4.2.1 Evolução da população de células planctônicas de <i>Listeria monocytogenes</i> nos substratos: leite integral, desnatado e creme de leite.....	48
4.2.2 Adesão de <i>L. monocytogenes</i> a 5º e 35º C nas superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone observadas pela MEV	50
4.2.3 Formação de biofilmes de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone, a 5º e 35º C, na presença de diferentes resíduos lácteos	52

4.3	Formação de biofilmes por <i>Listeria monocytogenes</i> em co-cultura com <i>Lactobacillus plantarum</i>	75
4.3.1	Comportamento da população de células planctônicas de <i>L. monocytogenes</i> em leite integral na presença do competidor <i>L. plantarum</i>	75
4.3.2	Formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i> em aço inoxidável com resíduo de leite integral UHT na presença de <i>Lactobacillus plantarum</i>	78
4.4	Eficiência do processo CIP na remoção de biofilmes de <i>Listeria monocytogenes</i> sobre a superfície de aço inoxidável na presença de resíduos de leite UHT integral e desnatado	79
4.4.1	Avaliação do processo CIP sobre os biofilmes formados com resíduos de leite integral e desnatado na superfície de aço inoxidável	83
5	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88

RESUMO

Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios

Os biofilmes, especialmente de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, têm chamado a atenção nos laticínios pelos riscos que implicam ao consumidor, devido aos repetidos surtos causados por ingestão de lácteos contaminados. A legislação brasileira apenas especifica *L. monocytogenes* em queijos. Além disso, os biofilmes geram problemas econômicos para a indústria e diminuem a eficiência dos agentes sanificantes empregados. O objetivo do trabalho foi avaliar a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em diferentes tempos, temperaturas, superfícies e resíduos lácteos, bem como a presença de *Lactobacillus plantarum* como competidor, assim como analisar a eficiência do processo CIP (*Clean In Place*) de um pasteurizador de leite com quaternário de amônia. As populações bacterianas dos biofilmes foram avaliadas através da técnica do suabe e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O modelo experimental foi baseado na formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável 304, silicone e borracha. Os cupons permaneceram imersos por 10 horas, a 5°C e 35°C, em leite UHT integral, desnatado e creme de leite UHT, seguido da incubação em diferentes tempos (0, 18 e 114 horas) e temperaturas (5°C e 35°C) para a formação do biofilme. A competição foi realizada em aço inoxidável a 35°C, nos tempos 0 e 18 horas. O processo CIP teve sua eficiência avaliada na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* na presença de leite integral e desnatado, simulando a limpeza e sanificação de um pasteurizador de leite. A formação de biofilmes por *L. monocytogenes* foi influenciada pela baixa temperatura (5°C), podendo ocorrer em áreas de refrigeração dos laticínios. O microrganismo é capaz de sobreviver e formar biofilmes por longos períodos nas superfícies de aço inoxidável, silicone e borracha na presença de resíduos de leite integral, desnatado e creme de leite. O crescimento em competição por *Lactobacillus plantarum* não inibiu a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* e crescimento de células planctônicas. O processo CIP foi eficiente em todas as condições estudadas, eliminando as células de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Biofilmes, *L. monocytogenes*, Laticínios, MEV, CIP

ABSTRACT

Study os biofilm formation of *Listeria monocytogenes* to different conditions encountered in dairy industries

The biofilm, especially of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, have been getting the attention in the dairy products for the risks that implicate the consumer, due to the repeated outbreaks caused by ingestion of milky polluted. The Brazilian legislation just specifies *L. monocytogenes* in cheeses. Besides, the biofilm generate economical problems for the industry and they reduce the agents used sanitizers efficiency. The objective of the work was to evaluate the formation of biofilms of *L. monocytogenes* in different times, temperatures, surfaces and milky residues, as well as the presence of *Lactobacillus plantarum* as competitor, as well as analyzing the efficiency of the process CIP (*Clean In Place*) of a milk pasteurize whit quaternary of ammonium. The bacterial populations of the biofilms were appraised through the technique of the swab and Scanning Electron Microscopy (SEM). The experimental model was based on the formation of biofilms of *L. monocytogenes* in coupons of stainless steel 304, silicon and rubber. The coupons stayed immersed by 10 hours, to 5°C and 35°C, in skim milk UHT, skimmed and cream of milk UHT, following by the incubation in different times (0, 18 and 114 hours) and temperatures (5°C and 35°C) for the formation of the biofilm. The competition was accomplished in stainless steel to 35°C, in the times 0 and 18 hours. The process CIP had his efficiency appraised in the removal of biofilms of *L. monocytogenes* in presence of skim milk and skimmed, simulating the cleaning and sanitation of a milk pasteurizer. The biofilmes formation for *L. monocytogenes* was influenced by the low temperature (5°C), could happen in areas of cooling of the dairy products. The microorganism is capable of to survive and to form biofilmes for long periods in the surfaces of stainless steel, silicon and eraser in the presence of residues of integral milk, skimmed and cream of milk. The growth in competition for *Lactobacillus plantarum* didn't inhibit the biofilms formation for *L. monocytogenes* and growth of cells. The process CIP it was efficient in all of the studied conditions, eliminating the cells of *L. monocytogenes*.

Keywords: Biofilm, *L. monocytogenes*, Dairy industries, SEM, CIP

1. INTRODUÇÃO

Zobell em 1943 formulou o problema dos biofilmes, mas foi na década de 1970 que se verificou que biofilmes são um fenômeno comum na natureza (CRIADO et al., 1994). Contudo, somente na década de 1980 os biofilmes começaram a ser estudados na indústria de alimentos (ZOTTOLA, 1994). Zoltai et al. (1981) foram os primeiros a publicar pesquisa sobre a aderência de bactérias patogênicas em superfícies de indústrias de alimentos.

Os biofilmes formados por microrganismos patogênicos ou deteriorantes são indesejáveis em superfícies que mantêm contato com alimentos (ZOTTOLA, 1994), os quais podem ser formados em todos os tipos de superfícies, em diferentes ecossistemas onde nutrientes são abundantes (POULSEN, 1999).

Formações de biofilmes podem causar bloqueios nos sistemas mecânico, em sistemas de manipulação de fluidos, impedir a transferência de calor e promover a corrosão das superfícies de metal (KUMAR; ANAND, 1998; CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

As bactérias podem se aderir e colonizar várias superfícies (MAFU et al., 1990) formando biofilmes na forma tridimensional sobre superfícies como aço inoxidável (CHAVANT et al., 2002), amplamente utilizado na indústria de alimentos, pela facilidade de higienização e resistência à corrosão.

Os biofilmes são responsáveis por significantes perdas de eficiência de processos tecnológicos e danos em equipamentos. Durante o processamento de alimentos, a contaminação do produto pode ser consequência de biofilmes formados nas superfícies de equipamentos (CONSTERTON, 1987; GILBERT et al., 2003). As superfícies dos equipamentos empregados para a manipulação de alimentos, armazenamento ou processamento são reconhecidas como a maior fonte de contaminação microbiana (WONG, 1998).

No biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos (MOSTELER; BISHOP, 1993; CHAE et al., 2006) do que as bactérias planctônicas (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Assim, sob a forma de biofilmes, os microrganismos sobrevivem por períodos extensos, devido a sua natureza estrutural e aos atributos fisiológicos (DONLAN; COSTERTON, 2002), resistem também à dessecação, luz UV, e tratamentos com agentes antimicrobianos e sanificantes (COSTERTON 1987; BORUCKI et al, 2003), aumentando a

persistência bacteriana em indústria de alimentos e conseqüentemente aumentando as chances de uma pós-contaminação (BARNES et al., 1999; CHAE et al., 2006; PAP; KISKÓ, 2008).

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em diferentes superfícies: aço inoxidável, borracha e silicone encontradas em laticínios, na presença de resíduo de leite ultra pasteurizado (UHT) integral, desnatado e creme de leite;
- b) Determinar a habilidade de cepas de *L. monocytogenes* em sobreviver e formar biofilme na presença do competidor *Lactobacillus plantarum*;
- c) Determinar a eficiência do processo CIP com sanificante quaternário de amônio QUATERCP DM-50 (BIOSAN[®]), que possui Cloreto de Benzalcônio como princípio ativo na remoção de biofilmes formados por *L. monocytogenes* em aço inoxidável com resíduos de leite integral e desnatado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biofilmes

Na indústria de alimentos os microrganismos podem aderir a superfícies sólidas condicionadas com nutrientes; tal condição é suficiente para sua viabilidade e crescimento. Esses microrganismos inicialmente depositam-se na superfície e aderem sobre essa, multiplicando-se pra formar colônias (KUMAR; ANAND, 1998; MACÊDO, 2007).

Biofilmes são freqüentemente formados por diferentes espécies e gêneros microbianos, os quais estão associados à superfície e envolvidos dentro da matriz polimérica de origem microbiana (GILBERT; ALLISON; McBAIN, 2002).

Uma vez formados, os biofilmes são de difícil remoção das superfícies de indústrias de alimentos pela produção de substâncias poliméricas extracelulares e as dificuldades associadas com a limpeza de complexos equipamentos e ambiente de processamento (WONG, 1998; CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

A adesão da bactéria com subsequente desenvolvimento de biofilmes em ambientes processadores de alimentos é uma fonte potencial de contaminação, podendo conduzir a deterioração de alimentos ou transmissão de doenças (WONG, 1998; REIJ; AANTREKKER, 2004). Por isso, a formação de biofilmes microbianos em superfícies de contato com alimentos é assunto de grande preocupação nas indústrias de alimentos. A aderência a um substrato sólido é usualmente seguida pela formação de microcolônias circundadas com polissacarídeos extracelulares ou glicocálix (JEYASEKARAN; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR, 2000).

Na maioria dos casos, a formação de biofilme ocorre em ambientes onde a diversidade microbiana é alta, como ralos, mas outros biofilmes são formados em ambientes que são dominados por uma única ou poucas espécies microbianas, como placas de trocadores de calor (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Áreas que são mais propensas ao desenvolvimento de biofilmes incluem tubulações não operantes, juntas, válvulas e gaxetas (MAFU et al., 1990; MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992; BLACKMAN; FRANK, 1996; WONG, 1998).

As superfícies comumente usadas para processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, teflon e vidro, permitem o

crescimento microbiano, podendo originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes (ANDRADE, 2008).

2.2.Fatores que influenciam a adesão microbiana

Muitos fatores afetam o desenvolvimento do biofilme incluindo a superfície e propriedades de interface, disponibilidade de nutrientes, composição da comunidade microbiana, hidrodinâmica, interação entre as espécies, e o transporte celular (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Dentre os fatores que podem influenciar a adesão de microrganismos nas superfícies encontram-se a fase metabólica da célula, o tipo e propriedades do material, a presença de matéria orgânica, o pH e a temperatura do meio que envolve o microrganismo (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992; REINEMANN; WONG; RABOTSKI, 1993; WONG, 1998; POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; PALMER et al., 2007).

A hidrofobicidade está relacionada a componentes presentes na membrana externa do microrganismo e são relevantes na sua adesão em superfícies. Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultura (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Essas diferenças, inclusive entre espécies e sorotipos, influenciam a adesão (CHAE et al., 2006).

A presença de flagelo, pili ou glicocálix podem aumentar a taxa de fixação de microrganismos. Isto se deve ao fato da célula microbiana, uma vez aderida à superfície, ter a capacidade de superar a força repulsiva comum a todos os materiais, assim, apêndices habilitam a célula a permanecer fixa (DONLAN, 2001). As propriedades aderentes da célula são influenciadas pelo envelope celular cuja química se altera de acordo com estímulos ambientais. Estudos com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* demonstram que os genes responsáveis pela proteína de expressão da superfície são ativadas, fixando e produzindo exopolissacarídeos (EPS) em resposta aos estímulos externos como densidade de população, tensão ou limite de nutrientes (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

A superfície celular é considerada um significant fator na ligação bacteriana à superfícies. Muitos estudos sugerem que a carga da superfície celular e a hidrofobicidade têm um

importante papel nos estágios iniciais de adesão microbiana. Numerosos métodos têm sido desenvolvidos com a tentativa de determinar as propriedades físico-químicas da superfície celular microbiana e o substrato (CHAE et al., 2006).

A disponibilidade de nutriente tem grande influência na estrutura do biofilme e na composição da comunidade microbiana (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). A aderência em superfícies durante a limitação de nutrientes pode ser uma técnica de sobrevivência da célula microbiana (HOOD; ZOTTOLA, 1995). A limitação de nutrientes e água, o *design* do equipamento, e as temperaturas de controle são importantes na formação dos biofilmes (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

A microtopografia da superfície é importante, pois pode favorecer a retenção bacteriana, particularmente, se a superfície for constituída de canais fundos e fendas (KUMAR; ANAD, 1998).

2.3. Adesão microbiana e formação de biofilmes

Sob determinadas condições, os microrganismos aderem e interagem com as superfícies, iniciando a reprodução celular (COSTERTON; MARRIE; CHENG, 1985). A adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam sua reprodução. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, estabelece-se o biofilme (ZOTOLLA; SASAHARA, 1994). O biofilme forma-se a partir da produção de uma matriz de polímeros orgânicos, denominados glicocálix ou exopolissacarídeos (EPS), que adere às células (CRIADO et al., 1994).

Os EPS são compostos de carboidratos e proteínas (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). São altamente hidratados (POULSEN, 1999) (98% de água), consistem principalmente de polissacarídeos, tendendo a ser a principal substância que permite a fixação do microrganismo à superfície e podem ser vistos por microscopia eletrônica (DONLAN, 2001). Segundo Costerton et al. (1985) esses EPS expõe-se após à membrana externa das células Gram-negativas e ao peptídeoglicano das Gram-positivas.

Provêem proteção aos habitantes do biofilme através da concentração de nutrientes, prevenindo o acesso de biocidas e dessecação (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Esses

polímeros envolvidos na aderência das células dentro dos biofilmes podem agir como receptores para interações de coagregações, sendo importantes na adesão de colônias secundárias (RICKARD et al., 2003).

A produção de EPS por biofilmes bacterianos possui muitas funções, como facilitar a adesão inicial da bactéria na superfície; formação e manutenção de microcolônias e estrutura do biofilme; aumento da resistência do biofilme a ambientes de estresse e agentes microbianos (POULSEN, 1999) e retenção de enzimas e outros compostos extracelulares (GILBERT; ALLISON; McBAIN, 2002). A matriz do biofilme tem potencial de modificar a resposta das células envolvidas ao tratamento antimicrobiano por sua ação como uma barreira de difusão (MITTELMAN, 1998; GILBERT; ALLISON; McBAIN, 2002).

O desenvolvimento de uma extensiva matriz extracelular e o crescimento em comunidades pode ser importante para manter uma ótima condição ambiental do biofilme. As fibras poliméricas formam uma ponte entre a célula bacteriana e o substrato o que habilita a associação irreversível com a superfície, sendo os polissacarídeos extracelulares do biofilme críticos para a persistência e sobrevivência em ambientes hostis, onde agem retendo nutrientes para o crescimento da comunidade microbiana. (KUMAR; ANAND, 1998).

De acordo com Costerton et al. (1995), em ambientes naturais ou industriais, a adesão bacteriana é mediada pelo glicocálix, que é uma matriz hidratada, produzida por polimerases, ligada aos componentes lipopolissacarídeos das células bacterianas. Seu papel é constituir uma barreira de proteção parcial ao biofilme contra, agentes antibacterianos (MORTON et al., 1998). Assim, as bactérias resistem aos procedimentos de higienização e continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos (MOSTELER; BISHOP, 1993; RICHARD et al, 2003).

Marshall et al., (1971), descrevem a formação do biofilme em duas fases: na primeira ocorre adesão do microrganismo na superfície por forças de Van der Waals e atração eletrostática, onde o processo é ainda reversível; 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 (ZOTTOLA, 1994). Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando à formação da matriz do biofilme, dentro da qual substâncias orgânicas e inorgânicas coexistem com microrganismos. Caso as células do biofilme sejam

reinoculadas, como células planctônicas, haverá redução na produção de exopolissacarídeos (KUMAR; ANAND, 1998).

O biofilme se desenvolve como resultado posterior da adsorção e aderência de células planctônicas novas, combinado com o crescimento continuado das que já se encontram aderidas sobre uma superfície (KALMOKOFF et al., 2001). A aderência bacteriana é baseada nas forças de atração físico-química entre as células e o substrato. Quando os microrganismos se tornam firmemente fixados a uma superfície com a ajuda do material extracelular, a aderência está concluída, de acordo com Hood e Zottola (1995). Nessa situação são de difícil remoção e requerem aplicação de força mecânica forte ou ação química como detergentes e sanitizantes (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Outra teoria propõe a divisão do processo de adesão em três etapas, sendo a primeira a fixação da bactéria, seguida da consolidação da bactéria na superfície e, por último, a colonização da bactéria (NORTEMANS et al., 1991).

Células em crescimento em biofilmes mostram diferenças em seus metabolismos e fisiologia quando comparadas com células planctônicas. Essas células podem expressar diferentes fenótipos dependendo da sua localização dentro biofilme (McLANDSBOROUGH et al., 2006).

Segundo os mesmo autores, o biofilme maduro possui uma estruturada matriz composta de canais verticais e horizontais, os quais permitem o fluxo de líquidos que irão garantir o suprimento de nutrientes para as células bacterianas e eliminação de resíduos gerados como parte dessa atividade celular.

2.4. Os biofilmes e as indústrias de alimentos

Biofilmes na indústria de alimentos podem apresentar grande quantidade de resíduos alimentares e minerais que são originados durante o processamento. Esses constituintes fornecem proteção aos microrganismos dentro do biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Bloqueios mecânicos, impedância de processos de transferência de calor, biodeterioração de componentes de sistemas metálicos e poliméricos resultam em bilhões de dólares de perdas a cada ano. Deterioração de produtos e possíveis riscos à saúde da população são também consequências de contaminação por biofilmes (MITTELMAN, 1998).

A aderência de bactérias na superfície de contato de alimentos, com o subsequente desenvolvimento de biofilmes, é uma fonte potencial de contaminação em produtos processados com microbiota deteriorante e patogênica (ZOTTOLA, 1994; SHARMA; ANAND, 1998).

Indústrias de alimentos frequentemente encontram problemas de biofilmes bacterianos persistentes em tubulações e equipamentos de processamento (JANG et al, 2006). Um dos fatores agravantes é a corrosão dos equipamentos pela idade, que acumulam sujidades (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992; WONG, 1998).

O aço inoxidável é um dos materiais ideais para indústria de alimentos por ser inerte e resistente em uma variedade de temperaturas de processamento, de fácil limpeza, e apresenta elevada resistência à corrosão. A microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, completamente ao contrário de sua aparência macroscópica (STONE; ZOTTOLA, 1985; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Aço inoxidável é o material mais frequentemente usado em equipamentos de processamento de alimentos, porém o polipropileno está se tornando mais popular na indústria para a construção de tanques e acessórios (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; OULAHAL et al., 2008).

2.4.1. Biofilmes na indústria de laticínios

Biofilmes em laticínios invariavelmente contêm resíduos de leite, particularmente proteínas e minerais como o fosfato e cálcio. Com tendências atuais para turnos de produção mais longos, uso de equipamentos complexos, automação das plantas, e crescente aumento da microbiota, a contaminação de produtos lácteos devido à presença de biofilmes bacterianos se tornou de grande interesse para os laticínios (BREMER et al., 2006).

Flach, Karnopp e Corção (2005), estudaram a relação entre a produção de fatores virulência de 101 isolados bacterianos, 46 pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e os demais pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, relacionados à colonização de superfícies de polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão com resíduos de leite e observaram uma relação direta entre formação de biofilmes e produção de fatores relacionados à adesão, pelos

microrganismos, principalmente produção de cápsula e hidrofobicidade celular, assim como atividade citotóxica e proteolítica, a última, relacionada à degradação do leite.

Na indústria de laticínios a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e pode originar contaminações por patógenos nas linhas de produção, o que se torna bastante preocupante uma vez que o desprendimento de uma pequena quantidade de microrganismo pode colocar em risco a saúde do consumidor (ZOTTOLA, 1994).

Outro problema de presença de biofilmes está relacionado com a contaminação por *Enterobacter sakazakii* durante a produção de fórmulas de leite infantis. Scheepe-Leberkühne e Wagner (1986) relataram que este microrganismo produz um material capsular viscoso, e conseqüentemente, gera biofilme em superfícies de contato com alimentos, além de crescer sob refrigeração. Infecções neonatais estão associadas com a colonização do *E. sakazakii* de equipamentos da preparação deste alimento tal como escovas, *blenders* e colheres (BAR-OZ et al. 2001).

Biofilmes de bactérias termodúricas, como *Streptococcus thermophilus*, por exemplo, são capazes de sobreviver à pasteurização do leite e formam biofilmes resistentes nas placas dos trocadores de calor utilizados neste processo (KNIGHT, 1993).

Além do desprendimento de células bacterianas, durante a formação dos biofilmes, outro problema nas linhas de produção é a sobrevivência de alguns desses microrganismos mesmo após o processo conhecido como CIP (*Cleaning in Place*). Sharma e Anand, 2002, demonstraram em seus estudos, a presença de diversos microrganismos em equipamentos da linha de pasteurização de laticínio comercial e experimental, como gênero *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus*, *Micrococcus* sp. e os Gram negativos como *Shigella*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e espécies de *Citrobacter*, *Flavobacterium* e *Proteus*.

2.5. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, medindo de 1,0 a 2,0 μ por 0,5 μ , não formador de esporos, anaeróbio facultativo. Por apresentar crescimento na faixa de 2,5°C a 44°C (FRANCO; LANDGRAF, 2002; GANDHI; CHIKINDAS, 2007), pH ótimo de 6,0 a 8,0 (JAY, 2005) e tolerar altas concentrações de sal (CHAE; SCHRAFT, 2001) torna-se de difícil controle na indústria de alimentos. Tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por

alimentos na década de 1980, devido à eclosão de diversos surtos de listeriose humana (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Ao contrário de outras infecções alimentares, a listeriose não causa sintomas gastrointestinais. Depois de ingeridas, as células colonizam o intestino, são fagocitadas por macrófagos, onde se multiplicam, e espalham-se pelo organismo. O quadro resultante é grave, afetando o sistema nervoso central, causando meningite, abortos, septicemia e diversas manifestações (JAY, 1992).

Apesar de ser um microrganismo ambiental, os alimentos envolvidos em surtos de listeriose sempre foram os industrializados. Segundo Fenlon; Wilson e Donachie (1996), a fonte primária de *L. monocytogenes* é o ambiente e, através da matéria-prima (animal e vegetal), a bactéria é introduzida na indústria, onde certas cepas se adaptam. Tal microrganismo tem sido isolado de laticínios e frigoríficos (WONG, 1998).

Está bem estabelecido que qualquer alimento fresco de origem animal ou vegetal pode apresentar números variados de *L. monocytogenes*. Em geral, o microrganismo tem sido encontrado em leite cru, queijo mole, carnes frescas ou congeladas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais. A prevalência em leite e laticínios tem recebido maior atenção devido aos primeiros surtos (JAY, 2005).

L. monocytogenes pode ser isolada de indústria de alimentos, especialmente nas áreas nas quais são inacessíveis os processos de limpeza usuais (NELSON, 1990). Ao contrário de outros patógenos alimentares, *L. monocytogenes* cresce em ambiente de refrigeração (BORUCKI et al., 2003; GANDHI; CHIKINDAS, 2007; LEMON et al., 2007). A ampla distribuição na natureza (solo, água, vegetais, insetos, seres humanos), combinado com sua resistência à desidratação sobre superfícies sólidas, sua persistência em biofilmes, ampla faixa de temperatura e de pH para desenvolvimento, além de ser uma das células vegetativas de maior resistência térmica (FRANCO; LANDGRAF, 2002), explica porque da dificuldade de eliminar este patógeno do ambiente de indústrias de alimentos.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g para queijos de média, alta e muito alta umidade. Este é o único alimento que contempla a determinação deste microrganismo (BRASIL, 2001).

2.5.1. Formação de biofilmes por *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é capaz de aderir a superfícies de contato de alimentos e formar biofilmes que impedem a eficiência do processo de sanificação (NORWOOD; GILMOUR, 2000; 2001), o que irá aumentar a persistência bacteriana na indústria de alimentos, e conseqüentemente aumentar as chances da contribuição de contaminação pós-processo (CHAE et al., 2006). Este microrganismo é capaz de se ligar em aço inoxidável e produzir EPS, formando biofilmes (BLACKMAN; FRANK, 1996).

A ameaça desta bactéria na indústria é baseada na sua habilidade em crescer a largas faixas de temperatura, principalmente sob refrigeração. Os trabalhos sobre aderência de *L. monocytogenes* em superfícies são realizados com um pequeno número de materiais, tipicamente aço inoxidável e a borracha, e não há grandes estudos comparativos reportados de sua adesão para uma gama mais larga de materiais presentes no processamento de alimentos (BERESFORD et al., 2001). Além da borracha, Mafu et al. (1990) verificaram a aderência de *L. monocytogenes* em vidro e polipropileno.

A presença de altos níveis de nutrientes, depósitos macroscópicos e microscópicos de resíduos de alimentos, e o freqüente estresse de processos de limpeza e sanificação irão influenciar na estrutura de biofilmes de *Listeria monocytogenes*, que é um patógeno com capacidade de proliferação em temperaturas de refrigeração em ambientes úmidos que são ideais para a formação de biofilmes (CHMIELEWSK; FRANK, 2003). Áreas de refrigeração na indústria de alimentos, em particular, fornecem condições que permitem a sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* na forma de biofilmes (AL-MAKHLAFI et al., 1994; NORWOOD; GILMOUR, 2001).

A habilidade de *L. monocytogenes* em aderir e colonizar superfícies durante o processamento e estocagem de alimentos é importante na contaminação do produto antes do consumo. Vários estudos têm demonstrado que cepas dominantes ou persistentes de *L. monocytogenes* isoladas de indústrias de alimentos têm uma maior taxa de aderência em superfícies do que cepas esporádicas ou não persistentes (PALMER et al., 2007). Borucki et al. (2003) concluíram que cepas persistentes de *L. monocytogenes* em laticínios, demonstraram alta taxa inicial de aderência e aumento na formação de biofilme. Palmer et al (2007) atribuíram essa persistência de cepas de *L. monocytogenes* à seleção natural dentro da indústria de alimentos,

com maior habilidade de aderir a superfícies sólidas, resistir a sanificantes e formar extensos biofilmes

Segundo Robbins et al. (2005), *Listeria monocytogenes* tem sido isolada em pisos, freezers, salas de processamento e lubrificantes utilizados na indústria de laticínios. Já Barancelli e colaboradores (2009) isolaram *L. monocytogenes* na salmoura, piso e estrado de câmaras frias de laticínios, além das mãos enluvadas dos manipuladores.

Muitos trabalhos têm descrito os efeitos de vários parâmetros ambientais sobre biofilmes de *L. monocytogenes*, como sobrevivência, patogenicidade e adesão. Os parâmetros mais freqüentemente estudados que influenciam a formação de biofilmes são: temperatura de crescimento (JEONG; FRANK, 1994; NORWOOD; GILMOUR, 2001; CHAVANT et al., 2002; MOLTZ; MARTIN, 2005; MAI; CONNER, 2007), acidificação do meio com ácidos orgânicos (BREMER et al., 2002; TRESSE et al., 2006; CATALDO et al., 2007), meio de crescimento (MOLTZ; MARTIN, 2005; MAI; CONNER, 2007).

2.6. Biofilmes formados por espécies mistas de bactérias

Em um ambiente de processamento de alimentos existe uma ampla variedade de microrganismos, os quais podem influenciar a formação de biofilmes puros ou biofilmes mistos (MOSTELER; BISHOP, 1993; HOOD; ZOTTOLA, 1995). Sendo heterogêneos, os requerimentos nutricionais das células desses biofilmes serão diferentes (KUMAR; ANAND, 1998). Biofilmes dessa natureza são mais espessos e mais estáveis ao estresse ambiental que biofilmes de uma única espécie (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

L.monocytogenes é capaz de sobreviver e crescer em biofilmes mistos (FRANK et al., 1990; JEONG; FRANK, 1994). Segundo Chmielewski e Frank (2003), bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes* podem co-existir dentro do biofilme com outra microflora ambiental, um exemplo é a *Pseudomonas* (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Espécies iniciadoras de colonização podem potencialmente favorecer a colonização de espécies que são fisiologicamente compatíveis, enquanto inibem a aderência de outras. O biofilme formado por comunidades microbianas diferentes são freqüentemente mais espessos e mais estáveis que biofilmes de uma única espécie (KUMAR; ANAD, 1998).

L. monocytogenes é frequentemente isolada de superfícies úmidas de equipamentos de indústria de alimentos (NELSON, 1990) e, nessas superfícies, existe uma variedade de microbiota competidora presente (FRANK et al., 1990), geralmente estando associadas com outros microrganismos, como *Pseudomonas spp.* (CHAVANT et al., 2002).

Alguns autores sugerem que *L. monocytogenes* em biofilmes cresce mais lentamente na presença de uma microbiota competidora do que em monocultura (JEONG; FRANK, 1994, ZHAO et al., 2004).

Wong (1998) e Farrag e Marth (1991) verificaram que *L. monocytogenes* era capaz de formar biofilmes, sobre cupons de aço inoxidável, na presença da microbiota natural do leite cru e de bactérias psicrófilas.

Segundo Carpentier e Chassaing (2004) o gênero *Pseudomonas* favorece a colonização de superfícies por *L. monocytogenes* e *Listeria innocua*. Em contraste, Norwood e Gilmour (2001) mostraram que *L. monocytogenes* apresenta contagem de células mais altas em biofilmes de monocultura do que em biofilmes que também contêm *Staphylococcus xylosus* e *Pseudomonas fragi*.

Bactérias lácticas são comuns no leite e produzem metabólitos tais como ácido láctico, acético, propiônico e fórmico, diacetil, peróxido de hidrogênio, pH baixo, condições anaeróbias e produção de bacteriocinas como nisina, pediocina, diplococina e plantacina, que impedem a colonização por outras espécies patogênicas. Assim, as bactérias lácticas criam ambientes adversos à sobrevivência de patógenos em alimentos (MASSAGUER, 2005).

Bactérias ácido-láticas têm sido utilizadas no controle de *L. monocytogenes* em alimentos, na forma de culturas probióticas e de proteção (MORETRO; LANGSRUD, 2004).

Lactobacillus plantarum é uma bactéria láctica frequentemente usada como cultura *starter* em alimentos (JOHANSON et al., 1995), na produção de vegetais fermentados, produtos de salsicharia e silagem animal (DAESCHEL et al., 1990). Estudos revelam que cepas do tal microrganismo são produtoras de bacteriocinas, como a plantaricina A (DAESCHEL, et al., 1990) e a plantaricina C (GONZÁLEZ et al., 1994).

Bacteriocinas fazem parte de um grupo heterogêneo de proteínas e peptídeos antibacterianos que podem variar no espectro de atividade, modo de ação, massa molecular,

origem genética e propriedades bioquímicas. Apresentam efeito inibitório no desenvolvimento de algumas espécies de bactérias Gram-positivas (NIKU-PAAVOLA et al., 1999).

2.7. Processos de higiene e sanificação

Limpeza e sanificação são etapas essenciais na prevenção de contaminação de alimentos por bactérias patogênicas e deteriorantes. A eficácia de produtos de limpeza e desinfecção depende do microrganismo e tipo de sujidade (GRAM et al., 2007).

A redução do número de microrganismos é fundamental em indústrias de alimentos, onde superfícies úmidas favorecem o crescimento de microrganismos (MASSAGUER, 2005).

O controle de biofilmes representa um dos desafios mais persistentes dentro de ambientes industriais onde comunidades microbianas são problemáticas. Os biofilmes na indústria de alimentos podem ser eliminados pela adoção de diferentes estratégias como métodos físicos e químicos (KUMAR; ANAND, 1998).

O processo de higienização deve ser escolhido de acordo com os equipamentos, utensílios e condições da indústria de alimentos. A escolha do processo é importante para se obter um resultado eficiente dentro do sistema de higienização disponível (ANDRADE; MACEDO, 1996).

A higienização divide-se em duas etapas muito bem definidas: a limpeza e a sanificação. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies. A sanificação, objetiva eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de deteriorantes a níveis considerados seguros. A limpeza consegue reduzir a carga de microrganismos das superfícies, mas não a níveis considerados satisfatórios, o que transforma a sanificação em etapa indispensável (MACÊDO, 2007).

Limpeza e sanificação de superfícies de contato com alimentos são realizadas pela combinação de processos físicos, térmicos e químicos. A circulação de volume suficiente de solução de limpeza em concentração, temperatura e velocidade adequadas são requeridas para uma limpeza adequada de superfícies de contato com leite. Fracassos de sistemas *clean-in-place* (CIP) frequentemente resultam de uma inadequada velocidade ou tempo de contato de solução de limpeza. Uma pequena quantidade de resíduo alimentar é suficiente para facilitar a adesão bacteriana, sobrevivência e crescimento. Caso estes resíduos não sejam inativados ou removidos

durante a limpeza, o microrganismo pode eventualmente aderir e contaminar o leite, afetando a qualidade, e se patógenos estão presentes, segurança do leite (REINEMANN, 1993).

O sistema, *clean-in-place* (CIP) é a prática mais comum de limpeza e sanificação utilizado em equipamentos de processamento da indústria de laticínios (SHARMA; ANAND, 2002). Ele é utilizado no controle de biofilme nos laticínios, segundo DUFOUR, et al, 2004, que o qual o definem como o processo de limpeza completa de itens da indústria como tubulações sem, dismantelar ou provocar a abertura do equipamento, e com pouco ou nenhum envolvimento manual por parte do operador (BREMER et al., 2006). O sistema CIP envolve soluções químicas selecionadas por sua habilidade de remover material orgânico (proteínas e gorduras) e inorgânico (fosfato de cálcio e outros minerais), presentes em laticínios. Para aumentar o controle da contaminação microbiana, sistemas CIP podem ser complementados com sanificantes, como iodóforos, compostos quaternários de amônio, ácidos aniônicos, e cloro (DUFOUR et al., 2004). A efetiva limpeza depende também do produto e das variáveis específicas da indústria, como a otimização do regime CIP, que varia entre laticínios e, com o passar do tempo, mesmo dentro de um mesmo laticínio (BREMER et al., 2006). Mesmo com sistemas eficientes de higienização como o CIP, as bactérias podem permanecer nas superfícies (AUSTIN; BERFERON, 1995).

Muitos agentes desinfetantes ou sanificantes frequentemente usados na indústria de alimentos, como compostos de amônia quaternária (CQAs), cloro e iodóforos, têm tido sua efetividade demonstrada contra células em suspensão de *L. monocytogenes* (AARNISALO et al, 2000; 2007).

A ação dos sanificantes é afetada pelas características da superfície; pelo tempo e pela temperatura de contato, pela concentração de uso e pelos tipos de resíduos presentes na superfície, pelo pH, pela propriedades físico-químicas da água e por substâncias inativadoras (ANDRADE, 2008).

2.7.1. Compostos quaternários de amônio (CQAs)

Compostos quaternários de amônio (CQA) são inodoros, incolores, não corrosivos (ANDRADE, 2008), não tóxicos e são frequentemente usados na indústria de alimentos como

parte do protocolo de limpeza (McLANDSBOROUGH et al. 2006; CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

São substâncias tensoativas catiônicas que contêm em sua estrutura um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos alquil ou aril (ANDRADE, 2008). Por serem catiônicos são incompatíveis com sanificantes à base de cloro e por causa de sua carga positiva podem não combinar com detergentes carregados negativamente (McLANDSBOROUGH et al., 2003).

Segundo Massaguer (2005), estes compostos são mais efetivos em Gram-positivos do que em Gram-negativos. Não são esporicidas; são efetivos contra vírus lipofílicos, mas não contra os hidrofílicos que possuem alta resistência, sendo mais efetivos a altas temperaturas. Sobre fagos de bactérias lácticas são ativos, e são mais eficientes em pH alcalino. (MASSAGUER, 2005). São pouco eficientes contra coliformes e psicrotróficos e ineficientes contra esporos (ANDRADE, 2008).

Compostos quaternários de amônio são bacteriostáticos em baixas concentrações, bactericidas em altas concentrações e baixas concentrações desse agente podem favorecer o desenvolvimento de resistência adaptativa (MANGALAPPALLI-ILLATHU; KORBER, 2006).

Por ter atividade antimicrobiana, CQAs são utilizados para limpeza e desodorização de superfícies (McDONNELL; RUSSELL, 1999), sanitização de pisos, paredes e no controle microbiológico do ar de ambientes de processamento de alimentos (ANDRADE, 2008).

A estrutura de um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a 4 grupos alquil ou aril, resulta na formação de uma carga positiva no átomo de nitrogênio. Independente do pH o quaternário de amônio mantém a carga positiva, o que diferencia dos tensoativos anfotéricos (MACÊDO, 2007). A fórmula geral dos quaternários de amônio se encontra a seguir:

R1= radicais alquil, alquilaril ou derivados (cadeia longa)

R2, R3 e R4 = hidrogênio, alquil, aril, ou radicais heterocíclicos

X= ânion inorgânico, usualmente cloreto ou brometo

FONTE: MACÊDO, 2007.

A modificação desses radicais dá origem a um grande número de derivados que possuem atividade germicida. Estes derivados se dividem em quatro classes: sais de alquilbenzildimetilamônio, de heterocíclicos alifáticos ou compostos aromáticos; de tetraalquilamônio e alquil betaínas, cujos principais representantes são mais utilizados em cosméticos (RIEGER, 1993).

Os sais alquilbenzildimetilamônio são formados da alquilação entre alquilmetilaminas com cloreto de benzila. Embora sejam substâncias sólidas, são encontradas comercialmente na forma de soluções aquosas. O principal germicida dessa classe é o cloreto de belzalcônio (MACÊDO, 2007).

A ação bactericida de um CQA está associada a vários mecanismos de ação, como: inibição enzimática, desnaturação protéica e lesão da membrana citoplasmática, com vazamento dos constituintes celulares (MASSAGUER, 2005; MACÊDO, 2007).

Um dos compostos mais utilizados nas indústrias de alimentos é o cloreto de benzalcônio, um CQA comumente usado como surfactante e desinfetante catiônico para linhas de processamento e superfícies da indústria de alimentos (MANGALAPPALLI-IILLATHU; KORBER, 2006). São usados extensivamente nas indústrias processadoras de alimentos para prevenir a persistência de patógenos como *Listeria monocytogenes* na microflora ambiental (GILBERT; MOORE, 2005).

A diferença de ação dos CQA's para os compostos iodados e clorados está na formação de um filme bacteriostático sobre as superfícies que sofreram a aplicação de um quaternário de amônio. Ressalta-se que, em concentrações menores que 50mg/L de CQA e em baixas temperaturas, sua ação bactericida é alterada e se torna mais seletiva (MACÊDO, 2007).

2.8. Adaptação de microrganismos aos agentes antimicrobianos

Apesar da base da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a antissépticos, sanificantes e preservativos de alimentos, é menos conhecida (CLOETE, 2003).

O uso de determinados sanificantes exerce uma pressão seletiva e contribuem para a emergência de microrganismos resistentes a estes compostos em ambientes onde se processam alimentos. A resistência combinada a sanificantes e a outros tipos de agentes antimicrobianos pode se tornar um grande desafio no futuro, para as indústrias processadoras de alimentos (LANGSRUD et al., 2003).

Em muitos casos, *L. monocytogenes* provavelmente encontra concentrações subletais de sanificantes em locais de difícil acesso para higienização nas indústrias de alimentos. Nessas condições é possível que a resistência do organismo para o agente antimicrobiano aumente (AARNISALO et al., 2007). Outro fator que gera resistência é a adesão microbiana, a pesquisa de Hood e Zottola (1995) sugeriu que microrganismos aderidos podem ser mais resistentes que células livres aos compostos de sanificação .

Frank e Koffi (1990) relataram que *L. monocytogenes* é capaz de produzir biofilmes resistentes aos sanificantes como cloro, iodo, ácido aniônico e quaternário de amônio nas superfícies de vidro, aço inoxidável e borracha.

O uso de sanificantes pode levar à seleção de linhagens de bactérias resistentes ao agente antibacteriano aplicado. Inúmeros relatos indicam que a exposição bacteriana a concentrações subletais de sanificantes pode ter como consequência um aumento de resistência (LANGSRUD et al., 2003).

É possível que a resistência dos microrganismos de um biofilme a sanificantes possa ser consequência da exposição a doses subletais destes compostos (JOSEPH et al., 2001; DAVIDSON; HARRISON, 2002). Consequentemente, biofilmes podem representar um

reservatório para a disseminação de genes resistentes a agentes antimicrobianos (LINDSAY; VON HOLY, 2006). Não há evidências que o uso apropriado de sanificantes nos equipamentos utilizados no processamento de alimentos irá desencadear o desenvolvimento de microrganismos resistentes. No entanto, com o aumento do uso de sanificantes nos equipamentos, nos ambientes de processamento de alimentos e em produtos crus, o potencial de surgimento de tais microrganismos resistentes existe de fato. Portanto, o potencial de desenvolvimento de linhagens resistentes deve continuar a ser investigado (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

2.9. Avaliação de biofilmes

Os biofilmes bacterianos podem ser avaliados por métodos não visuais como o suabe e por métodos visuais, como a microscopia de contraste, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (MACÊDO, 2007).

A microscopia de contraste de fase é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, numa superfície transparente. A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa excelente na quantificação de células aderidas às superfícies. Para visualizar a adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para colaração direta das células, ou anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação (COSTA, 1999).

Já a microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é realizada utilizando agentes químicos, como glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (COSTA, 1999).

2.9.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O desenvolvimento e aperfeiçoamento da microscopia eletrônica estão intimamente associados ao progresso alcançado pela Biologia, nos últimos 100 anos. O microscópio eletrônico possibilitou a observação direta de aspectos ultraestruturais das células até então desconhecidos (ZOLTAI et al., 1981; GALLETI, 2003).

Na microscopia eletrônica a radiação empregada é a de feixe de elétrons, sendo ele refratado por meio de lentes eletrônicas. O microscópio eletrônico produz aumentos úteis de

200.000 a 400.000X, sendo seu poder resolvente cerca de 100 vezes maior que o do microscópio óptico

O MEV tem grande profundidade de foco. Como consequência, a topografia superficial de objetos sólidos pode ser examinada com grande facilidade, e as micrografias têm aspecto tridimensional (GALLETI, 2003).

Deve-se considerar que, apesar de técnicas microscópicas terem levado a uma grande quantidade de informações sobre os processos de adesão microbiana e a formação de biofilme, elas apresentam alguns problemas que devem ser considerados. Por exemplo, os exopolissacarídeos, que geralmente envolvem as comunidades microbianas, podem secar, aparecendo cordões finos que podem ser interpretados como estruturas fibrosas que prendem os microrganismos a si mesmos (ANDRADE, 2008).

Microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada para mostrar que bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos aderem igualmente sobre aço inoxidável, alumínio, vidro, borracha e teflon, superfícies encontradas em ambientes processadores de alimentos (MAFU et al., 1990; BLACKMAN; FRANK, 1996).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Higiene e Laticínios, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba-SP. Todas as etapas do experimento e análises microbiológicas foram conduzidas em Cabine de Segurança Biológica (PACHANE®), Classe II tipo A1 com 70% de recirculação e 30% de renovação de ar servido através de um filtro HEPA para o ambiente. Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata, utilizando-se amostras em triplicata. O estudo consistiu de 3 fases:

- a) Avaliação da capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilme em diferentes condições de temperaturas, tempo, substratos e superfícies, encontradas em laticínios;
- b) Capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilmes sobre aço inoxidável em co-cultura com *Lactobacillus plantarum*;
- c) Estudo da eficiência do processo simulado CIP de um pasteurizador de leite na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* formados sobre aço inoxidável na presença de resíduo de Leite UHT integral e desnatado;

3.1. Ensaio preliminar para a determinação do tempo ideal de adesão de *L. monocytogenes*

3.1.1 Obtenção da cepa de *Listeria monocytogenes* e preparo da suspensão

A cepa de *L. monocytogenes* utilizada no experimento foi obtida da coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Laticínios, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP. Foram preparadas culturas estoques do microrganismo, as quais foram mantidas sob refrigeração a 4°C em tubos inclinados com Ágar Triptona Soja (TSA) + 0,6% Extrato de Levedura (YE) e cobertas de vaselina estéril, até o momento de uso. Para o uso nos experimentos, a cultura foi reativada com duas transferências sucessivas, sendo a primeira para tubos contendo Caldo Triptona Soja (TSB) + 0,6% de YE, com incubação a 35°C/24 horas e a segunda transferência para tubos inclinados contendo TSA+0,6% de YE, também com incubação a

35°C/24 horas com o uso de alças microbiológicas descartáveis calibradas (10µL). Durante estas etapas foram realizados teste de coloração de Gram e teste de catalase para controle das culturas.

Para a preparação da suspensão bacteriana, o inóculo foi suspenso em solução salina 0,85%, agitado em vórtex (Phoenix Modelo AP56) e a turbidez obtida foi comparada e ajustada a um tubo de Padrão McFarland 0,5. Para a comparação da turbidez foi utilizado um cartão de fundo branco e linhas pretas, em um ambiente de luz intensa (SILVA et al., 2007; ROSSI, 2008; SANTOS, 2009). Desta forma foi obtida uma suspensão bacteriana com cerca de 10^8 UFC de *L. monocytogenes* por mL. Para aferir a contagem real das células em suspensão, foi realizado o a contagem por plaqueamento em profundidade em TSA+0,6% de YE, com incubação a 35°C/48 horas (DOWNES; ITO, 2001).

3.1.2. Preparo da Solução Padrão McFarland 0,5

Foi preparada uma Solução de Sulfato de Bário (BaSO_4), equivalente a um Padrão McFarland 0,5. Através do uso de um espectrofotômetro (SCHIMADZU UV mini 1240) foi medida a absorbância da solução, com comprimento de onda ajustado a 625nm; a leitura deveria estar no intervalo de 0,08 a 0,10. Em seguida, foram transferidos cerca de 5 mL para tubos com rosca, protegidos da luz com auxílio de papel alumínio e armazenados em local escuro. Antes do uso, os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex (Phoenix Modelo AP56) até obtenção de uma solução túrbida uniforme (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS/NCCLS, 2003; ROSSI, 2008; SANTOS, 2009).

3.1.3. Preparo dos cupons de aço inoxidável

No estudo preliminar o modelo escolhido foi a formação de biofilmes sobre aço inoxidável tipo 304, com dimensões de 5,0 x 2,0 cm e com polimento sanitário. A superfície amostrada para a análise da formação de biofilme foi aquela que apresentava polimento sanitário.

Na extremidade de cada cupom foram feitos um orifício para a passagem de um anzol unido a um arame, ambos sendo de aço inoxidável, os quais foram pendurados em uma lingueta de aço inoxidável unida em forma de cruz, que sustentava os cupons imersos no béquer com o líquido a ser testado.

Os materiais utilizados (cupons, lingueta, arames e anzóis) foram previamente higienizados da seguinte maneira: imersão em solução de hidróxido de sódio a 1% durante 30 minutos; enxágue em água destilada; imersão em álcool 70%; enxágue em água destilada. A secagem foi realizada em estufa a 35°C e cada cupom e cada conjunto arame e anzol, esterilizados em embalagem de papel individual, a 121 °C por 15 minutos em autoclave (ROSSI, 2008; RIBEIRO-FURTINI, 2005; SANTOS, 2009).

3.1.4. Condicionamento dos cupons de aço inoxidável

Com o objetivo de obter uma superfície coberta por um filme de condicionamento semelhante ao encontrado no ambiente industrial, cupons de aço inoxidável foram imersos durante uma hora em béqueres contendo 1.800mL de leite UHT integral (3% de gordura), 1.800mL de leite UHT desnatado (0,5% de gordura) e 1.800mL de creme de leite UHT (20% de gordura), mantidos a 35°C sob agitação constante em Cabine de Segurança Biológica (PACHANE®). O leite integral, desnatado e creme de leite foram incubados a 35°/24 horas para verificar a esterilidade comercial.

Para a agitação e manutenção da temperatura dos leites foi utilizado agitador magnético (VEP CIENTIFICA®) dotado de aquecimento, enquanto que para o creme de leite, por ser mais denso, utilizou-se o aparelho Turrax, com o auxílio de um agitador magnético com aquecimento (VEP CIENTIFICA®).

Em seguida, os cupons foram acondicionados em placas de Petri estéreis forradas com papel filtro, levados à estufa para secagem a 35°C por 24 horas, com a superfície de polimento sanitário voltadas para cima.

3.1.5. Determinação do melhor tempo de adesão do biofilme de *Listeria monocytogenes*

Esse ensaio preliminar foi feito com cupons de aço inoxidável e o inóculo obtido conforme o descrito em 3.1.1. Foram testados diferentes substratos na formação de biofilmes: leite UHT integral e desnatado assim como creme de leite UHT. Nove cupons condicionados com cada substrato descrito no item 3.1.4. foram imersos em 3 béqueres distintos, cada um contendo 1.800 mL do substrato em questão. Em cada béquer foi adicionado 10 mL do inóculo padrão para

a realização da adesão microbiana. O processo de adesão ocorreu por 6, 10 e 12 horas a 35°C, em Cabine de Segurança Biológica (PACHANE®), com três cupons sendo retirados de cada béquer para análise nos tempos de 6, 10 e 12 horas de adesão, incubados em estufa a 35°C por 18 horas em placas de Petri estéreis forradas com papel filtro e realizada a contagem das células bacterianas.

3.1.6. Contagem de células de *L. monocytogenes* aderidas aos cupons

Para a contagem de células aderidas aos cupons, após o tempo de adesão e incubação por 18h/35°C, os cupons foram lavados com Tampão Fosfato pH 7,2 (PB) para a remoção de células não aderidas, a superfície foi amostrada por suabes umedecidos com Água Salina Peptonada Tween 80 (H₂Osp-TWEEN). Os suabes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL do mesmo diluente e o conteúdo homogeneizado em vórtex (Phoenix Modelo AP56) durante 1 minuto. Destas suspensões contendo os suabes (10⁰), foram retiradas alíquotas para preparo das diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁸) em tubos contendo 9 mL de Água Salina Peptonada (H₂Osp). Para avaliar a contagem de *L. monocytogenes* dos cupons, foi empregada a técnica de plaqueamento em profundidade em Ágar TSA+0,6% YE, em triplicata, sendo as placas foram incubadas invertidas a 35°C/48 horas (DOWNES; ITO, 2001; RIBEIRO-FURTINI, 2005; ROSSI, 2008; SANTOS, 2009).

Foi determinado o número de UFC/cm² através da seguinte fórmula (1):

$$\text{UFC/cm}^2 = \text{UFC/mL da suspensão} \times \frac{\text{Área amostrada}}{\text{Volume de diluente da coleta}} \quad (1)$$

Fonte: SILVA et al., 2007.

Após a realização deste teste preliminar, determinou-se que o tempo de adesão para todos os substratos e superfícies utilizadas seria de 10 horas.

3.2. Avaliação da influência do tempo, temperatura, substratos e superfícies na formação de biofilmes de *L. monocytogenes*

Uma vez estabelecidos os parâmetros de tempo ideal sobre a superfície de aço inoxidável, outras variáveis foram estudadas. Para este experimento foram utilizadas como superfícies de contato o aço inoxidável 304, borracha e silicone. Os cupons de borracha e silicone foram confeccionados a partir de teteiras (GEA Farm Technologies®) desses materiais, possuindo as mesmas dimensões dos cupons de aço inoxidável (5,0 x 2,0 cm).

Os cupons passaram pelo mesmo tratamento de higienização prévio descrito no item 3.1.3.

Os substratos estudados foram leite integral UHT, leite desnatado UHT e creme de leite UHT.

O preparo do inóculo e contaminação com *L. monocytogenes* foi feito conforme item 3.1.1, apenas que nesse caso os béqueres foram mantidos a 5°C e 35°C para o estudo da adesão em diferentes temperaturas. Os conjuntos permaneceram por 10 horas sob agitação constante para que ocorresse o processo de adesão bacteriana, conforme previamente determinado em 3.2

3.2.1. Condicionamento das superfícies dos cupons de borracha e silicone e aço inoxidável

O condicionamento das superfícies dos cupons de aço inoxidável, borracha e silicone com leite UHT integral, desnatado e creme de leite foi realizado da mesma maneira descrita no item 3.1.4.

Após o processo de condicionamento, os cupons foram acondicionados em placas de Petri estéreis forradas com papel filtro, levados à estufa para secagem a 35°C por 24 horas, com a superfície de polimento sanitário (aço) ou superfícies de contato com o leite durante a ordenha (borracha e silicone), voltadas para cima; conforme a Figura 1.

Figura 1 - Processo de condicionamento dos cupons de aço inoxidável, borracha e silicone (a); Cupom de silicone (b); Cupom de borracha (c); Cupom de aço inoxidável (d)

3.2.2. Avaliação da temperatura e do tempo na maturação de biofilmes de *L. monocytogenes*

Foram avaliadas as temperaturas de 5° e 35° C na maturação de biofilmes, contemplando variações encontradas em laticínios. Os cupons obtidos no item 3.2.1., foram incubados por 0, 18 e 114 horas a 5°C e 35°C, em placas de Petri estéreis forradas com papel de filtro, com a finalidade de verificar a influência dessas temperaturas na maturação do biofilme. A contagem de células de *L. monocytogenes* foi feita conforme 3.1.6.

3.2.3. Avaliação da superfície de aço inoxidável, silicone e borracha pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O preparo dos cupons foi conforme o descrito no item 3.1.3. para as superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone. Foram realizadas análises para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme.

Sendo assim, o condicionamento e o processo de adesão se deram em meio TSB-YE a 35°C/10 horas e a 5°C/10 horas, e as análises realizadas nos tempos de 18h, 42h, 66h, 90h e 114 horas (SANTOS, 2009).

Os cupons em processo de adesão e, após os tratamentos foram fixados em solução Karnovsky modificada, por uma semana, sob refrigeração; submetidos a lavagem com três passagens de 10 minutos em tampão cacodilato 0,05M e à desidratação com acetona em concentrações crescentes (25%, 50%, 75%, 90%, 100%) permanecendo 10 minutos em cada e, na última concentração, por três vezes. Para retirar a acetona foi feita a secagem ao ponto crítico com CO₂, depois, os cupons foram montados em *stub* (suportes) e identificados antes de serem colocados no metalizador para o banho de ouro. Após este procedimento as amostras estavam prontas para serem levadas ao microscópio eletrônico de varredura (RIBEIRO-FURTINI, 2005; SANTOS, 2009).

3.3. Avaliação da formação de biofilme de *L. monocytogenes* em co-cultura com *Lactobacillus plantarum*

3.3.1 Estudo do comportamento das células em leite integral UHT

Este estudo foi conduzido com a finalidade de avaliar o comportamento de células planctônicas de *L. monocytogenes* na presença do competidor *Lactobacillus plantarum*, cepa produtora de bacteriocina.

A cepa de *Lactobacillus plantarum* foi fornecida pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL/Tecnolat, ATCC 8014). O preparo da cultura desse microrganismo seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.1.1., porém foi utilizado o Ágar e Caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ao invés do TSA+0,6% YE.

Em um béquer contendo 1.800mL de leite UHT integral foram inoculados 10 mL da suspensão padrão de *L. monocytogenes* e 10 mL de *Lactobacillus plantarum*, conforme descrito em 3.1.1. O conjunto experimental permaneceu sob agitação pelo período de 10 horas a 35°C. Curvas de crescimento de culturas puras de cada microrganismo foram feitas em paralelo, nas mesmas condições de tempo e temperatura descritas acima, para dar o referencial de crescimento.

Foram coletados 1 mL de leite de cada bquer no tempo inicial (0 horas) e final (10 horas) e feitas as diluies decimais em gua salina peptonada para a contagem da populao bacteriana. Para tanto foi realizada a tcnica de inoculao em profundidade em gar TSA+YE para *L. monocytogenes* e gar MRSA com sobrecamada para *Lactobacillus plantarum*, quando em culturas puras. No caso de culturas mistas a contagem de *L. monocytogenes* foi feita em superfcie de *Listeria* Selective gar (OXFORD). As placas foram incubadas a 35C/48 horas (DOWNES; ITO, 2001).

Como a produo de cido no leite caracterstica comum de bactrias lticas como o *L. plantarum*, nesses ensaios foi acompanhado o desenvolvimento e evoluo da acidez no leite por titulao com NaOH 0,1N (PREGNOLATO, 1985).

3.3.2. Formao de biofilmes por *L. monocytogenes* em co-cultura com *Lactobacillus plantarum*

Esse estudo foi conduzido somente sobre superfcie de o inoxidvel e na presena de leite integral UHT. As culturas e o condicionamento dos cupons foram realizados como descrito nos itens 3.1.1 e 3.1.4.. Seguiu-se o processo de adeso onde os cupons foram imersos nos bqueres preparados conforme o item acima (3.3.1.), permanecendo sob agitao constante a 35C por 10 horas. Em seguida, os cupons foram incubados em estufa a 35C e realizadas anlises no tempo de 0 e 18 horas de formao do biofilme.

A estimativa da populao de *L. monocytogenes* nos cupons foi feita atravs da tcnica de plaqueamento em superfcie em meio Oxford, onde as placas foram incubadas em estufa regulada a 35C/48h, conforme o item 3.3.1.

Tambm de acordo com o mesmo item (3.3.1.), para a contagem de *L. plantarum*, utilizou-se a tcnica de inoculao em profundidade, em gar MRS. Para garantir condies microaerfilas, as placas receberam uma sobrecamada do mesmo meio e foram incubadas invertidas em estufa a 35C/ 48h.

A contagem das colnias foi expressa em UFC/cm (DOWNES; ITO, 2001).

3.4. Avaliação da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável na presença de resíduos de leite UHT integral e desnatado, e sua resistência frente ao processo de higienização CIP (*Clean-in-Place*)

Neste ensaio foi avaliada a eficiência do processo CIP sobre biofilmes de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável. A formação dos biofilmes ocorreu conforme o descrito nos itens 3.1.3. e 3.2.1.. O processo foi aplicado sobre biofilmes formados a 5°C e 35°C, conforme 3.2.2.

3.4.1. Higienização dos cupons

O processo de higienização dos cupons simulou o processo CIP realizado na limpeza de pasteurizador de leite. Todo o processo foi realizado inteiramente na Cabine de Segurança Biológica (PACHANE®). Os detergentes foram os utilizados normalmente em laticínios (NaOH e ácido fosfórico) e o sanificante empregado foi um composto a base de quaternário de amônio, com 50% de substância ativa (QUATERCAP DM-50 - cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio - BIOSAN®).

Foram preparados sete béqueres contendo as soluções de detergentes, sanificantes e água de enxágüe. Os cupons foram divididos em grupos: (a) Controle, (b) Limpeza e (c) Limpeza+Sanificação. Com o auxílio de uma grade de aço inoxidável, os cupons (b) e (c) foram transferidos de béquer para béquer, respeitando os tempos e temperaturas de um processo simulado CIP. Após a passagem pelo béquer nº5 (água de enxágüe), os cupons do grupo (b) foram retirados para a análise e o grupo (c) continuou no processo, passando pela etapa de sanificação. Todas as soluções permaneceram sob agitação durante a realização do experimento e aquelas que necessitavam de controle de temperatura foram monitoradas com auxílio de termômetros. Foi utilizada água destilada estéril para o preparo de todas as soluções e água de enxágüe, as quais foram preparadas com o auxílio de vidraria volumétrica (ROSSI, 2008; SANTOS, 2009).

O esquema do processo simulado CIP foi o seguinte:

- **Béquer nº1:** água destilada a 30°C. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto para realização da pré-lavagem, sob agitação.

▪ **Béquer nº2:** solução de detergente alcalino (ALCA CF – SANI QUÍMICA[®]) à base de agente alcalinizante com concentração determinada pelo fabricante a 70°C. A grade permaneceu acoplada a este béquer por sete minutos, sob agitação.

▪ **Béquer nº3:** água destilada a temperatura ambiente para enxágue. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto, sob agitação.

▪ **Béquer nº4:** solução de detergente ácido (ACID CF – SANI QUÍMICA[®]) à base de ácido inorgânico com concentração determinada pelo fabricante à temperatura ambiente. A grade permaneceu acoplada a este béquer por três minutos, sob agitação.

▪ **Béquer nº5:** água destilada a temperatura ambiente para enxágue. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto, sob agitação.

▪ **Béquer nº6:** solução de sanificante quaternário de amônio (QUATERCAP DM-50 - cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio - BIOSAN[®]), com concentração de 0,1% (477µg/ml), por 10 minutos à temperatura ambiente.

▪ **Béquer nº7:** água destilada a temperatura ambiente para enxágue. A grade permaneceu acoplada a este béquer por um minuto, sob agitação.

Para análise dos cupons foram seguidos os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.6., utilizando-se do Àgar TSA+0,6% de YE na técnica do plaqueamento em profundidade.

3.4.2. Contagem de células de *L. monocytogenes* nos cupons de aço inoxidável após o processo de higienização

Os cupons submetidos ao processo de limpeza + sanificação tiveram sua superfície amostrada por suabes, porém, os suabes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de solução neutralizante, composta por 2% de lecitina, 2% de Tween 80 e 0,5% de tiosulfato de sódio, dissolvidos em água destilada (OKAZAKI, 2003; ROSSI, 2008). A contagem de células viáveis seguiu o procedimento descrito no item 3.1.6.

3.4.3. Avaliação da eficiência do processo CIP na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O preparo dos cupons de aço inoxidável ocorreu como descrito no item 3.1.3.

Foram avaliados os cupons de aço inoxidável controle, aqueles que passaram somente pelo processo de limpeza por detergentes e aqueles que passaram por todo o processo CIP, contendo resíduos de leite UHT integral e desnatado.

A etapa de fixação do material seguiu a mesma do item 3.2.5.

3.5. Análise estatística

A análise estatística, média aritmética e o desvio padrão, foi determinada através de uma análise de variância (ANOVA) com o SAS software (2002-2003). Diferenças no número de bactérias em cada tratamento de cada um dos experimentos foram analisadas estatisticamente pelo Teste t-LSD com significância expressa ao nível de 95% de confiança ou maior ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do tempo ideal de adesão de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável condicionados com diferentes substratos a 35° C

Um teste preliminar inicial foi feito para a determinação do tempo ideal de adesão de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável a 35°C, com os substratos leite UHT integral e desnatado e creme de leite UHT, a fim de padronizar os ensaios subsequentes, cujos resultados podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2 - Adesão a 35° C de *L. monocytogenes* sobre cupons de aço inoxidável: efeito dos diferentes substratos

Como pode ser observada na Figura 2, após 6 horas a menor taxa de adesão foi obtida na presença de leite integral (4,64 log UFC/cm²) e a maior taxa de adesão proporcionada pelo creme de leite (6,39 log UFC/cm²), apresentando uma diferença significativa de 1,75 log UFC/cm² ($p < 0,005$) entre ambos. No tempo de 10 horas, não houve diferença significativa na taxa de adesão entre leite desnatado e integral (0,06 log UFC/cm²), mas sim entre esses e o creme de leite com um aumento de 1,10 log UFC/cm².

Em relação ao tempo de adesão, para o leite integral houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente entre 6h para 10h e 12 horas de adesão. Para o leite desnatado, não houve

diferença significativa ($p < 0,05$) entre os mesmos tempos de adesão avaliados. Já com o creme de leite, a diferença foi significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de 6h e 10 horas para o período de 12 horas.

Em todos os tempos de adesão estudados (6, 10 e 12h), a maior taxa de adesão sobre o aço inoxidável foi obtida na presença de creme de leite, seguida pelo leite desnatado e integral, independente do tempo de adesão.

Assim, em função dos resultados do ensaio preliminar, o tempo de adesão de 10 horas foi padronizado para os demais experimentos, por estar mais próximo do tempo empregado em laticínios, onde corresponde ao maior período de trabalho sem interrupção para processo de limpeza e sanificação.

Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Santos (2009), onde nos mesmos períodos de adesão (6h, 10h e 12 horas) na presença de leite UHT integral, a população de *L. monocytogenes* sobre os cupons de aço inoxidável apresentou como contagem 4 log UFC/cm², 5 log UFC/cm² e 5 log UFC/cm²; respectivamente, mostrando que após o período de 10 horas de adesão há uma estabilização na população do biofilme formado, na presença de leite desnatado e integral. Foi observada uma influência do substrato no presente trabalho, pois para o resíduo de creme de leite, esta diferença é significativa ($p < 0,05$) em relação aos substratos leite integral e desnatado.

Rossi (2008) avaliou a adesão de *Bacillus cereus* na superfície de aço inoxidável e verificou que após 6 horas a contagem foi de 3 log UFC/cm², aumentando para 5 log UFC/cm² em 10 horas, comprovando mais uma vez que quanto maior o tempo de adesão, maior é a população microbiana presente na superfície.

4.2. Estudo da formação de biofilmes: influência do tempo, substrato e superfície

4.2.1. Evolução da população de células planctônicas de *Listeria monocytogenes* nos substratos: leite integral, desnatado e creme de leite

A evolução da população de células planctônicas, a 35°C e 5°C nos substratos, foi também acompanhada no presente estudo, cujos resultados são apresentados na Figura 3. As temperaturas foram as mesmas empregadas para a adesão nas diferentes superfícies.

Conforme o esperado, após 10h a 35°C, houve em todos os substratos um aumento da contagem da ordem de 2 log UFC/mL. Já a 5°C, em leite integral e desnatado, a contagem obtida foi de 6 log UFC/mL e de 7,21 log UFC/mL em creme de leite, conforme Figura 3.

Figura 3 - Evolução da população de *L. monocytogenes* nos substratos: leite integral, desnatado e creme de leite nas temperaturas de 35°C e 5°C

Avaliando o crescimento de *L. monocytogenes* em leite integral e TSB-YE, Santos (2009) verificou que a 35°C, a população deste microrganismo atingiu 8 log UFC/mL após 10 horas de incubação e a 5°C a contagem microbiana manteve-se constante em 6 log UFC/mL no mesmo período de tempo, mostrando o mesmo comportamento que o presente estudo com leite integral.

Poimenidou et al (2009) verificaram que a 5°C em 7 dias, células planctônicas de *L. monocytogenes* apresentam maior contagem no substrato leite integral e creme (8 log UFC/mL) do que em iogurte (4 log UFC/mL). A 20°C, a população obtida no leite manteve-se a mesma, enquanto que no creme houve um aumento de 1 log UFC/mL, mostrando que o creme de leite suporta uma maior população microbiana com o aumento da temperatura.

4.2.2. Adesão de *L. monocytogenes* a 5° e 35° C nas superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone observadas pela MEV

Os biofilmes formados por *L. monocytogenes* em diferentes superfícies foram observados por Microscopia Eletrônica de Varredura. Com o intuito de se obter uma melhor visualização das células, o processo de adesão se deu em meio TSB-YE, por 1h, 5h e 10 horas de adesão sob agitação constante.

Não foram observadas células em aço inoxidável, borracha e silicone em 1h e 5 horas de adesão, tanto a 5°C quanto a 35°C e após 10 horas a 5°C.

Como pode ser observado na Figura 4, após 10 horas de adesão, são visíveis células nas superfícies analisadas. Embora na borracha o número de células observadas seja maior, deve-se lembrar que as análises MEV são qualitativas.

Figura 4 - Cupom de aço inoxidável (a), silicone (b) e borracha (c) após 10 horas de adesão da *L. monocytogenes* a 35°C. Magnitude: 5.000x; 2 cm=2µm

Segundo Hood e Zottola (1995), o processo de adesão bacteriana em superfícies ocorre durante a limitação de nutrientes, por se tratar de uma técnica de sobrevivência.

Wong (1998) afirma que a aderência bacteriana na presença de leite ou em superfícies pré-condicionadas possa ser reduzida, resíduos de leite podem abrigar bactérias em áreas que não são adequadamente limpas ou de difícil limpeza, como juntas e fendas.

O trabalho realizado por Mai e Conner (2007), apresentou que após 3 horas de adesão em meio BHI, foi possível notar células aderidas a superfície de aço inoxidável, porém sem a presença de polímeros extracelulares nas temperaturas de 4°C, 20°C, 30°C, 37°C e 42°C.

Gianotti et al. (2008) verificaram que a adesão de *L. monocytogenes* acontecia no intervalo entre 2 h e 20 horas, dependendo da natureza das cepas e composição dos meios de cultura utilizados.

Já em um estudo realizado por Folsom et al. (2006), o tempo de adesão de 4 horas foi suficiente para as cepas de *L. monocytogenes* testadas. De acordo com Beresford et al. (2001), *L. monocytogenes* é capaz de aderir a diferentes superfícies em apenas 2 horas.

Segundo Flach (2006), biofilmes formados por bactérias Gram-positivas e negativas presentes no leite são capazes de aderir em superfícies em apenas 2 horas a 10°C e 25°C.

A cepa de *L. monocytogenes* utilizada no presente estudo não apresentou adesão em 1h e 5 horas em meio TSB-YE, não estando em concordância com os autores acima citados, mas a adesão ocorreu no período de 10 horas com esse substrato nos meios estudados.

Oulahal et al. (2008) mostraram que *L. innocua* e *S. aureus* aderiram em aço inoxidável e polipropileno após 5 horas de adesão em contato com resíduos lácteos.

4.2.3. Formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone, a 5° e 35° C, na presença de diferentes resíduos lácteos

4.2.3.1. Estudo 1: substrato leite integral na adesão e formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em diferentes superfícies.

Tabela 1- Formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas e superfícies, na presença de resíduos de leite UHT integral

	¹ Contagem de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)		
	0 Horas	18 Horas	114 Horas
Aço inoxidável 35°C	4,39 ^{Aa}	5,32 ^{Aa}	4,11 ^{Aa}
Borracha 35°C	5,15 ^{Aa}	5,60 ^{Aa}	4,12 ^{Aa}
Silicone 35°C	4,80 ^{Aa}	5,28 ^{Aa}	4,10 ^{Aa}
Aço inoxidável 5°C	2,57 ^{Ab}	3,67 ^{Ab}	4,71 ^{Ab}
Borracha 5°C	2,20 ^{Ab}	4,11 ^{Ab}	4,30 ^{Ab}
Silicone 5°C	3,16 ^{Ab}	3,11 ^{A b}	4,18 ^{Ab}

(¹) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

De acordo com a Tabela 1, nas três superfícies estudadas, as maiores taxas de adesão inicial foram sempre obtidas na temperatura de 35°C. Em relação às superfícies, a borracha teve

uma maior taxa de adesão a 35°C e o silicone a 5°C. Contudo, as diferenças de adesão entre temperaturas iguais não foram significativas ($p < 0,05$), não havendo influência entre superfícies, somente entre temperaturas nas taxas de adesão. Porém, do ponto de vista microbiológico, o silicone a 5°C apresentou uma diferença importante em relação às demais superfícies, pois apresentou uma contagem de células aderidas sensivelmente maior do que as outras superfícies.

A 35°C, a evolução dos biofilmes nas três superfícies foi semelhante: um aumento da contagem nas primeiras 18h, seguida de um declínio após 114h. Após 18 horas, a contagem obtida nas três superfícies estudadas foi de cerca de 5 log UFC/cm² e em 114 horas houve uma redução na população de 1 log UFC/cm², não apresentando diferença significativa, conforme mostra a Tabela 1.

Na temperatura de 5°C, ao contrário do ocorrido a 35°C, a população dos biofilmes aumentou continuamente após as 18 e 114h, em todas as superfícies estudadas, tendo uma diferença significativa ($p < 0,05$). Assim como na adesão inicial, o fator temperatura foi a principal variável, sendo que na adesão inicial, a temperatura de 5°C influenciou negativamente, mas na maturação dos biofilmes (tempo), foi um fator positivo. Isso tem repercussões importantes em laticínios, pois a refrigeração favoreceu a sobrevivência de *L. monocytogenes* nos biofilmes.

4.2.3.2. Estudo 2: substrato leite desnatado

Tabela 2- Formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas e superfícies, na presença de resíduos de leite UHT desnatado

	¹ Contagem de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)		
	0 Horas	18 Horas	114 Horas
Aço inoxidável 35°C	3,44 ^{Aa}	4,91 ^{Aa}	4,48 ^{Aa}
Borracha 35°C	4,19 ^{ABa}	5,20 ^{ABa}	5,20 ^{ABa}
Silicone 35°C	4,17 ^{Ba}	5,18 ^{Ba}	4,19 ^{Ba}
Aço inoxidável 5°C	2,48 ^{Ab}	3,54 ^{Ab}	4,48 ^{Ab}
Borracha 5°C	3,16 ^{ABb}	3,51 ^{ABb}	4,17 ^{ABb}
Silicone 5°C	2,76 ^{Bb}	2,82 ^{Bb}	5,10 ^{Bb}

(¹) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

De acordo com a Tabela 2, as maiores taxas de adesão ocorreram a 35°C nas três superfícies, o mesmo encontrado no experimento com leite integral. Borracha e silicone tiveram uma maior taxa de adesão a 35°C e borracha a 5°C. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$)

entre as mesmas temperaturas, porém do ponto de vista microbiológico, houve diferença na taxa de adesão a 35°C na superfície de aço inoxidável e a 5°C em borracha, quando comparados com as demais superfícies.

Em uma mesma temperatura houve influência significativa entre as superfícies estudadas ($p < 0,05$), onde silicone e aço inoxidável apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) tanto a 35°C, quanto a 5°C.

Na temperatura de 35°C, a evolução dos biofilmes nas três superfícies foi semelhante após 18 horas, mostrando um aumento da contagem nessas horas iniciais, onde a população evoluiu cerca de 1 log UFC/cm² nas superfícies de borracha e silicone e 1,47 log UFC/cm² na superfície de aço inoxidável. Tais resultados não apresentaram uma diferença estatística ($p < 0,05$) em todas as superfícies estudadas, porém, uma diferença da ordem de 1 log entre as contagens é importante do ponto de vista microbiológico. Já em 114 horas, houve uma redução na população nas superfícies de aço inoxidável e silicone, enquanto que a contagem em borracha manteve-se estável.

A 5°C, a contagem de *L. monocytogenes* aumentou significativamente ($p < 0,05$) em todas as superfícies estudadas, entre 18h e 114 horas, sendo uma diferença significativa. A superfície de silicone merece um destaque, uma vez que a população aumentou 2,28 log UFC/cm² após 114 horas, sendo a maior evolução encontrada quando se compara as três superfícies estudadas.

Embora a temperatura de 5°C tenha inicialmente influenciado negativamente na adesão sobre as superfícies, posteriormente, na fase de maturação esta variável mostrou-se como fator positivo na formação dos biofilmes, indicando que a temperatura de refrigeração é um fator importante na formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, assim como no ensaio anterior com leite integral.

4.2.3.3. Estudo 3: substrato creme de leite

Tabela 3- Formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas e superfícies, na presença de resíduos de creme de leite UHT

	¹ Contagem de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)		
	0 Horas	18 Horas	114 Horas
Aço inoxidável 35°C	5,16 ^{Aa}	7,20 ^{Aa}	6,31 ^{Aa}
Borracha 35°C	5,70 ^{Aa}	8,21 ^{Aa}	7,17 ^{Aa}
Silicone 35°C	5,85 ^{Aa}	8,21 ^{Aa}	6,14 ^{Aa}
Aço inoxidável 5°C	3,75 ^{Ab}	5,76 ^{Ab}	5,77 ^{Ab}
Borracha 5°C	3,81 ^{Ab}	5,03 ^{Ab}	5,78 ^{Ab}
Silicone 5°C	3,74 ^{Ab}	5,21 ^{Ab}	5,55 ^{Ab}

(¹) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

Os resultados do ensaio com creme de leite são apresentados na Tabela 3. Novamente a 35°C ocorreram as maiores taxas de adesão em todas as superfícies estudadas, assim como nos experimentos anteriores com leite integral e desnatado. Sobre o silicone houve uma maior taxa de adesão a 35°C e borracha a 5°C. Houve diferença significativa na adesão ($p < 0,05$) entre as temperaturas estudadas, assim como ocorrido no experimento com leite integral.

A 35°C, a evolução dos biofilmes nas superfícies estudadas foi semelhante aos ensaios anteriores, com um aumento das contagens dos biofilmes de *L. monocytogenes* nas primeiras 18h seguido de declínio após 114h. Nas superfícies de borracha e silicone as contagens atingiram 8,21 log UFC/cm², enquanto que o aço inoxidável 7,20 log UFC/cm². Embora não seja uma diferença significativa ($p < 0,05$), há uma diferença de 1 log UFC/cm² entre a população das superfícies de borracha e silicone, contra a superfície de aço inoxidável. Em 114 horas, houve uma redução na população das três superfícies estudadas, na ordem de cerca de 1 log UFC/cm³ para aço inoxidável e borracha e de 2 log UFC/cm² para silicone, não sendo uma diferença significativa ($p < 0,05$), mas sim microbiológica.

Na temperatura de 5°C, conforme os ensaios anteriores houve uma menor adesão do que a 35°C, ocorrendo, contudo, uma evolução constante dos biofilmes nas superfícies analisadas nos períodos de 18h e 114 horas, tendo uma diferença significativa ($p < 0,05$).

Mais uma vez, como demonstrado nos estudos anteriores, a temperatura de 5°C influencia negativamente na adesão dos biofilmes sobre as superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone, porém na fase de maturação mostra-se como influência positiva na formação de

biofilmes por *L. monocytogenes*, confirmando que temperaturas de refrigeração são de extrema importância na formação de biofilmes por este microrganismo.

Avaliando os mesmos parâmetros de temperatura, tempos de 18h e 114 horas e tendo como substrato leite integral, Santos (2009) verificou que a população de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável a 35°C passou de 4 log UFC/cm² para 3 log UFC/cm². Na temperatura de 5°C, houve um aumento da população de 3 log UFC/cm² nos biofilmes formados, concordando com os resultados do presente estudo.

DiBonaventura et al. (2008), mostraram que a 4°C *L. monocytogenes* forma um biofilme com maior população sobre vidro, seguido daquele formado por aço inoxidável e poliestireno, o mesmo ocorrendo para 12°C e 22°C. Porém, a 37°C, o biofilme formado em vidro e aço inoxidável apresentou a mesma contagem, quando comparado com poliestireno. Ao contrário deste, no presente estudo não houve diferença significativa entre materiais.

Com o intuito de avaliar as temperaturas de 4°C e 10°C, Somers e Wong (2004) verificaram que a contagem de células de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável 304, borracha e silicone, apresentaram uma redução com o aumento da temperatura. Sendo que a superfície de silicone apresentou maior contagem microbiana com o aumento da temperatura.

Resultados obtidos por Poimenidou et al. (2009), revelaram que biofilmes podem ser formados por *L. monocytogenes* em aço inoxidável a 5°C, na presença de resíduos de leite e creme de leite (3 log ufc/cm²). A contagem obtida no biofilme formado a 20°C com resíduos de creme de leite e leite foram de 5 log UFC/cm² e 4 log UFC/cm², respectivamente, revelando que a temperatura de 20°C favoreceu a formação de biofilmes quando comparado com 5°C, ao contrário do que pode ser observado neste estudo.

Moltz e Martin (2005) verificaram que a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, sobre a superfície de PVC a 32°C, foi maior em 48 horas do que a 24 horas em meio TSB-YE ou caldo Welshimer modificado (MWB). O mesmo estudo revelou que a 20°C e 37°C ocorreu um aumento na população do biofilme sobre a superfície de aço inoxidável com o decorrer do tempo, num período de 96 horas. Nesse caso, ao contrário dos resultados do presente estudo, temperaturas elevadas exerceram um fator positivo sobre a população dos biofilmes.

Segundo Mai e Conner (2007), o aumento da população de *L. monocytogenes* em aço inoxidável em meio BHI é dependente do aumento da temperatura, ao contrário dos biofilmes

formados em meio com pouca concentração de nutrientes, com 90% de água destilada esterilizada e 10% de BHI.

Folsom et al. (2006) verificaram que em diferentes concentrações de nutrientes (TSB e TSB diluído em água), *L. monocytogenes* foi capaz de formar biofilmes em aço inoxidável a 32°C. Da mesma maneira, no presente trabalho, as diferentes concentrações de nutrientes encontradas nos resíduos de leite integral, desnatado e creme de leite acabaram proporcionando diferentes taxas de formação de biofilme.

Blackman e Frank (1996) observaram que *L. monocytogenes* sobrevive por até 7 dias em aço inoxidável, teflon, nylon e poliéster a 21°C em TSB, e a 10°C nas mesmas superfícies a sobrevivência foi menor, ocorrendo uma redução da população no mesmo tempo de estudo. Tais resultados não estão de acordo com o encontrado no presente estudo, onde a população de *L. monocytogenes* é maior em temperaturas baixas como 5°C do que a 35°C, com o decorrer do tempo.

Segundo Beresford et al. (2001), cepas de *L. monocytogenes* podem aderir e formar biofilme em diferentes superfícies, como aço inoxidável, silicone, alumínio, polipropileno, borracha, poliuretano e policarbonato. Tais dados são confirmados no presente trabalho, uma vez que a cepa de *L. monocytogenes* utilizada foi capaz de formar biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone.

De acordo com Chavant et al. (2003), a taxa adesão de *L. monocytogenes* em aço inoxidável e plástico diminuiu com o aumento da temperatura. Tal resultado discorda do presente estudo, onde a adesão de *L. monocytogenes* foi maior em altas temperaturas (35°C), reduzindo com a diminuição da temperatura (5°C).

Flach (2006) avaliou a formação de biofilmes na presença de leite integral na superfície de pano, polipropileno, vidro e aço inoxidável a 10°C e 25°C, mostrando que tais temperaturas são favoráveis para a formação de biofilmes.

Através dos dados obtidos no presente trabalho é possível afirmar que *L. monocytogenes* tem maior habilidade em sobreviver e formar biofilmes a 5°C do que a 35°C, por ser uma bactéria psicrotrófica, e que o teor de gordura influenciou a adesão e sobrevivência de *L. monocytogenes* em biofilmes, uma vez que sobre resíduos de creme de leite houve uma maior evolução da população do patógeno.

4.2.3.4. Análise do envelhecimento dos biofilmes sobre diferentes superfícies por MEV

Com a finalidade de verificar a estrutura celular e a formação de exopolissacarídeos nos biofilmes formados por *L. monocytogenes*, nas superfícies de aço inoxidável, borracha e silicone, nas temperaturas de 35°C e 5°C foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Essa parte do experimento foi conduzida utilizando-se do meio de cultura TSB-YE para a formação dos biofilmes, uma vez que os resíduos lácteos impedem a visualização das estruturas extracelulares. As análises foram feitas nos seguintes tempos de maturação: 18h, 42h, 66h, 90h e 114horas.

Figura 5 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 5°C sobre a superfície de aço inoxidável, magnitude: 2.000x; 2cm=5µm

Figura 6 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 35°C sobre a superfície de aço inoxidável, magnitude: 2.000x; 2cm=5µm

Figura 7 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 5°C sobre a superfície de silicone com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm

Figura 8 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 35°C sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 9 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 5°C sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 10 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 18 horas de formação a 35°C sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm

As imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelam que após 18 horas de formação de biofilmes, não foi possível observar células de *L. monocytogenes* sobre a superfície de aço inoxidável a 5°C (Figura 5), apenas a presença de estruturas com aspecto que lembram algodão, provavelmente sendo substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Já nos cupons de silicone e borracha (Figura 7 e 9), ao contrário, foram observadas células aderidas, porém sem a presença de EPS. Em todas as superfícies analisadas, a 35°C, no mesmo tempo de formação, 18h, (Figuras 6, 8, 10), são visualizadas células de *L. monocytogenes*, com maior quantidade em aço inoxidável.

Segundo Andrade (2008), os exopolissacarídeos, que geralmente envolvem as comunidades microbianas, podem secar durante o preparo da amostra, aparecendo cordões finos que podem ser interpretados como estruturas fibrosas que prendem os microrganismos a si mesmos.

Santos (2009) também verificou a presença de EPS nos biofilmes de 18 horas formados por *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável a 5°C, enquanto que a 35°C somente células foram visualizadas nesta superfície.

O estudo realizado por DiBonaventura et al. (2008) demonstrou que biofilmes formados em 24 horas por *L. monocytogenes* sobre a superfície de vidro, poliestireno e aço inoxidável apresentaram poucas células aderidas e EPS produzidos a 4°C e a 12°C. Já a 22°C e 37°C, houve um aumento na produção de EPS na superfície de vidro, enquanto nas mesmas condições houve um aumento de células aderidas sobre os cupons de aço inoxidável e poliestireno.

Figura 11 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 5°C sobre a superfície de aço inoxidável, magnitude: 2.000x; 2 cm=5µm

Figura 12 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 35°C sobre a superfície de aço inoxidável, magnitude: 2.000x; 2 cm=5µm

Figura 13 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 5°C sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 14 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 35°C, sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 15 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 5°C, sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 16 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 42 horas de formação a 35°C sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Após 42 horas de formação, é visível uma maior presença de polímeros extracelulares na superfície de aço inoxidável (Figura 11) e um início da formação dessas substâncias sob silicone e borracha (Figura 13 e 15, respectivamente), na temperatura de 5°C. As Figuras 12 e 14 revelam que a 35°C células de *L. monocytogenes* não produzem EPS nestas mesmas superfícies. Na

Figura 16, a presença de pequenos fragmentos é observada, podendo ser o início da formação de polímeros.

Borucki et al. (2003) observaram que biofilmes de *L. monocytogenes* com 40 horas de incubação a 30°C apresentaram grande número de células aderidas, porém não foi detectado EPS. Nas mesmas condições descritas, os biofilmes formados em PVC apresentaram a formação de EPS interligando as células.

Figura 17 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 66 horas de formação a 5°C sobre aço inoxidável, com magnitude de 4.100x; 1,5 cm=2µm

Figura 18 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 66 horas de formação a 35°C sobre aço inoxidável, com magnitude: 4.100x; 1,5 cm=2µm

Figura 19 – Biofilmes de *L.monocytogenes* após 66 horas de formação a 5°C sobre superfície de silicone, com magnitude 3.000 X

Figura 20 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 66 horas de formação a 35°C sobre superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm

Figura 21 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 66 horas de formação a 5°C sobre superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm

Figura 22 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 66 horas de formação a 35°C sobre superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm

Na Figura 17 é possível observar a presença da célula de *L. monocytogenes* em meio aos EPS produzidos em aço inoxidável a 5°C. A presença de fragmentos pode ser vista nas Figuras 19 e 21, de acordo com as marcações. A 35°C, na superfície de borracha (Figura 22), nota-se um grande número de células presentes, porém a nitidez de todas as imagens feitas na mesma

superfície e temperatura revela uma substância viscosa, com aspecto de gel, envolvendo essas células.

Segundo McLandsborough et al. (2006), abundante formação de exopolímeros, os biofilmes microbianos começam a exibir características de gel. Dessa forma, pode-se concluir que *L. monocytogenes* formando biofilmes sobre borracha pode produzir grandes quantidades de EPS, dando aspecto de gel, como na Figura 22.

Floresta (2006) observou que células de *Salmonella* sp. produzem filamentos viscosos em altas concentrações de sais. Essa filamentação não está somente ligada à adição de sal, mas pode ocorrer com a variação na temperatura de incubação.

Figura 23 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 5°C sobre a superfície de aço inoxidável, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 24 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 35°C sobre a superfície de aço inoxidável, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 25 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 5°C sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm.

Figura 26 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 35°C sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 27 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 5°C sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 28 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 90 horas de formação a 35°C (b) sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Nas Figuras 23 e 25, observa-se nos biofilmes, que após, o tempo de incubação de 90 h a 5° C, a massa de polímeros continua dominando a superfície de aço inoxidável e silicone nos cupons. Já na superfície de borracha, o biofilme formado, apresenta células de *L. monocytogenes* com estrutura celular alterada, bem alongada (Figura 27), em 90 horas.

Moltz e Martin (2005) observaram a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável a 20°C em 96 horas de incubação e constataram um grande número de células

sobre a superfície com formação de polímeros extracelulares, como observado no presente estudo nas Figuras 23 e 25.

Segundo Floresta (2006), mudanças morfológicas podem ocorrer devido a condições adversas em que os microrganismos se encontram e as células que entram no estado fisiológico viável não cultivável também podem apresentar mudanças em sua morfologia.

Figura 29 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 5°C sobre a superfície de aço inoxidável, com magnitude: 3.000x; 3 cm=5µm

Figura 30 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 35°C sobre a superfície de aço inoxidável, com magnitude: 3.000x; 3 cm= 5µm

Figura 31 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 5°C sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm

Figura 32 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 35°C sobre a superfície de silicone, com magnitude: 3.000x; 3cm=5µm.

Figura 33 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 5°C sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Figura 34 - Biofilmes de *L. monocytogenes* após 114 horas de formação a 35°C sobre a superfície de borracha, com magnitude: 3.000x; 3cm=5μm

Após o tempo de maturação de 114h, observa-se que as formações de EPS sobre aço inoxidável a 5°C, tornaram-se maior e em forma de blocos (Figura 29). Nesta mesma temperatura, ainda não foi possível visualizar células bacterianas no biofilme sobre o silicone (Figura 31), ocultos pelos EPS. Já sobre a borracha (Figura 33) as células permaneceram com a forma alongada, como já tinha sido observado nos períodos anteriores.

No mesmo tempo de maturação, a 35°C, o número de células observadas nos biofilmes formados sobre o aço inoxidável (Figura 30) ainda é elevado, com a presença de fragmentos, mas não há redes poliméricas estruturadas presentes como mostra a Figura 29, cuja temperatura de maturação foi de 5°C. Fragmentos também continuam presentes no silicone (Figura 32) e ainda há presença de gel em borracha (Figura 34).

Nos biofilmes maturados a 5°C em silicone, células não são visíveis, mas há a formação de blocos compactos, provavelmente originários da produção de EPS. Já na superfície de borracha, no mesmo período de tempo e na mesma temperatura, há a presença de células de *L. monocytogenes*, porém a formação de estruturas fibrosas ou compactas não está muito presente, evidenciando assim que a estrutura dos biofilmes é diferente nas diferentes superfícies. Formações semelhantes também foram observadas por Santos (2009) em biofilmes formados por *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável a 35°C, mas o autor não pôde afirmar com certeza se esses fragmentos eram partes de células ou início da formação de EPS.

Blackman e Frank (1996) observaram que células de *L. monocytogenes*, podem sobreviver na superfície de nylon a 21°C por 10 dias, sem a presença de EPS, da mesma forma que o presente estudo mostrou que o mesmo microrganismo pode sobreviver na superfície de borracha e silicone por 114 horas sem a produção de EPS.

4.3. Formação de biofilmes por *Listeria monocytogenes* em co-cultura com *Lactobacillus plantarum*

4.3.1. Comportamento da população de células planctônicas de *L. monocytogenes* em leite integral na presença do competidor *L. plantarum*

A Figura 35 mostra a curva de crescimento de *L. monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum*, como cultura pura e co-cultura em leite integral. A população de *L. monocytogenes* partiu de uma contagem inicial de 6,25 log UFC/mL como cultura pura e 6,33 log UFC/mL em co-cultura, atingindo 8,27 log UFC/mL (cultura pura) e 8,16 log UFC/mL (co-cultura), não sendo, portanto, afetada pela presença do *L. plantarum*. Por sua vez, também o *Lactobacillus plantarum*, não foi afetado pela presença de *L. monocytogenes*, partindo de 6,26 log UFC/mL (cultura pura) e 6,40 log UFC/mL (co-cultura), atingindo, respectivamente, 6,55 log UFC/mL e

7,47 log UFC/mL após 10 horas de crescimento, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$). Os resultados numéricos encontram-se na Tabela 4.

Figura 35 - Curva de crescimento de *L. monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum* em cultura pura e co-cultura em leite UHT integral

Tabela 4- Desenvolvimento da população de células planctônicas de *L. monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum* em co-cultura e em culturas puras

Culturas	¹ log UFC/mL	
	0 horas	10 horas
<i>L. monocytogenes</i> cultura pura	6,27 ^a	8,27 ^a
<i>L. monocytogenes</i> co-cultura	6,33 ^a	8,16 ^a
<i>Lactobacillus plantarum</i> cultura pura	6,26 ^a	7,55 ^b
<i>Lactobacillus plantarum</i> co-cultura	6,40 ^a	7,62 ^b

(¹) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

Diferentemente dos resultados do presente estudo, Santos (2009) verificou a inibição de *L. monocytogenes* por *E. coli* em co-cultura no leite integral a 35° C, de 1 log UFC/mL, enquanto que neste estudo onde não houve inibição de *L. monocytogenes* pelo *Lactobacillus plantarum*.

Por se tratar de uma bactéria lática, o *Lactobacillus plantarum* fermenta a lactose, produzindo ácido láctico, aumentando a acidez do meio. A Figura 36 apresenta a curva de acidificação do leite em °Dornic, durante o crescimento deste microrganismo em monocultura, assim como em co-cultura com *L. monocytogenes*.

Figura 36 - Curva de acidificação do leite por *Lactobacillus plantarum* em cultura pura e co-cultura com *L. monocytogenes*

A acidez do leite antes da inoculação do microrganismo foi de 16,2 °D, após 10 horas atingiu o valor de 21,6 °D em cultura pura de *L. plantarum* e 20,7°D em co-cultura. Observa-se na Figura 36 que a curva de acidez em condição de co-cultura foi mais linear do que a da cultura pura de *L. plantarum*, onde ocorreu um aumento repentino da acidez, entre 8 e 10 horas de crescimento, tendo uma diferença estatística ($p < 0,05$) neste período. Porém não há uma razão aparente que justifique isso.

4.3.2. Formação de biofilme por *L. monocytogenes* em aço inoxidável com resíduo de leite integral UHT na presença de *Lactobacillus plantarum*

Figura 37 - Contagens da população nos biofilmes formados sobre aço inoxidável na presença de resíduo de leite integral UHT nas diferentes culturas

A Figura 37 apresenta os resultados desse ensaio de competição na formação de biofilmes. Nota-se que após 18 horas de maturação, as populações finais de *L. monocytogenes* tanto em cultura pura quanto em co-cultura, foram muito semelhantes: aumentando 0,93 log UFC/cm² e 0,86 log UFC/cm², respectivamente. A população de *Lactobacillus plantarum*, no mesmo período, apresentou evolução de 1,5 log UFC/cm² e 1,17 log UFC/cm² em cultura pura e co-cultura, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as culturas puras e mistas de cada um dos microrganismos estudados nos biofilmes formados na presença de resíduos de leite integral sobre a superfície de aço inoxidável.

Neste experimento, não houve inibição ou favorecimento na formação de biofilmes de *L. monocytogenes* na presença de *Lactobacillus plantarum*, embora a cepa competidora seja produtora de bacteriocina.

Diferente do presente estudo, Santos (2009) verificou que a formação de biofilmes sobre aço inoxidável com resíduo de leite integral UHT por *L. monocytogenes* foi favorecida, quando em co-cultura por *E. coli*.

Esperanza et al. (2009) avaliaram o efeito inibitório de uma mistura de bactérias lácticas como, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. curvatus* e *L. paracasei* na formação de biofilmes de

L.monocytogenes na cuba de fabricação de queijos macios, verificando uma redução na população do patógeno no queijo. Tal efeito foi atribuído ao efeito sinérgico entre as culturas de bactérias lácticas em co-cultura quando comparados com as culturas puras.

No trabalho de Almendárez-García (2008), os biofilmes formados por *L. monocytogenes* na presença de *Lactococcus lactis*, produtor de nisina, sofreram uma redução de 5 ciclos logarítmicos da população do patógeno a 37°C em relação ao biofilme formado apenas pela cultura de *L. monocytogenes*.

Segundo Norwood e Gilmour (2001) cepa Scott A de *L. monocytogenes* apresentou menor formação em biofilmes em co-cultura com *Staphylococcus xylosus* e *Pseudomonas fragi* do que em monocultura, nas temperaturas de 4°C, 18°C e 30°C em aço inoxidável.

Embora o estudo em questão de competição tenha sido realizado com uma bactéria láctica produtora de bacteriocina, a plantaricina, talvez a produção destes metabólitos pela bactéria láctica em questão não tenha sido suficiente para que ocorresse a inibição do patógeno *L. monocytogenes*, ou ainda, o substrato utilizado no presente estudo pode não ser o ideal para a produção destes compostos. O fator temperatura deve ser importante também na produção de metabólitos, como as bacteriocinas (MASSAGUER, 2005).

4.4. Eficiência do processo CIP na remoção de biofilmes de *Listeria monocytogenes* sobre a superfície de aço inoxidável na presença de resíduos de leite UHT integral e desnatado

As Tabelas 6 e 7 mostram os resultados do processo CIP sobre biofilmes de *L. monocytogenes* formados em resíduo de leite UHT integral e desnatado, respectivamente.

Tabela 6- Processo CIP com sanificante CQA 0,1% e sua eficiência na remoção de biofilme sobre aço inoxidável de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite integral

Etapas	¹ log UFC/cm ²			
	Biofilme de 18 horas		Biofilme de 114 horas	
	35°C	5°C	35°C	5°C
Controle	5,32 ^a	5,22 ^a	4,11 ^b	5,19 ^a
Após limpeza	0,31 ^a	0,35 ^a	0,66 ^b	0,60 ^b
Após sanificação	<1	<1	<1	<1

(¹) Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

A etapa de limpeza do processo CIP foi eficiente, em todas as situações estudadas. Nos biofilmes formados a 35° C, ocorreu uma redução de 5,31 log UFC/cm² (18 h) e 3,45 log UFC/cm² (114 h). A 5°C, o mesmo processo reduziu 4,87 log UFC/cm² (18 h) e 4,59 log UFC/cm² (114 h). Embora tenha ocorrido diferença significativa (p<0,05) na etapa de limpeza dos biofilmes formados em 18h e 114 horas, essa diferença é irrelevante do ponto de vista prático, sendo o processo de limpeza eficiente na remoção dos biofilmes de ambas as idades. Exatamente por isso que, embora a população remanescente tenha sido mínima, a etapa de sanificação é essencial no processo de higienização, atuando sobre essa população. Conforme Andrade (2008), o processo de limpeza não assegura a inocuidade do alimento, tal processo deve ser obrigatoriamente seguido pela etapa complementar de sanificação.

Tabela 7- Processo CIP com sanificante CQA 0,1% e sua eficiência na remoção de biofilme sobre aço inoxidável de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite desnatado

Etapas	¹ log UFC/cm ²			
	Biofilme de 18 horas		Biofilme de 114 horas	
	35°C	5°C	35°C	5°C
Controle	4,88 ^a	4,82 ^a	4,5 ^a	4,63 ^a
Após limpeza	0,71 ^a	0,79 ^a	0,2 ^b	0,99 ^a
Após sanificação	<1	<1	<1	<1

(¹) Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de significância.

Assim como no estudo anterior, após passar pelas etapas de limpeza, os cupons mantidos a 35°C por 18h e 114 horas apresentaram uma redução de 4,17 log UFC/cm² e 4,3 log UFC/cm², respectivamente, sendo que a 5°C a redução foi maior a 18h (4,03 log UFC/cm²) do que a 114 horas de maturação (3,64 log UFC/cm²). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os biofilmes formados a 18h e 144 horas, mas como no estudo anterior, irrelevante do ponto de vista prático, após o processo de limpeza, sendo que a redução mostrou a eficiência do processo do ponto de vista microbiológico.

Em ambas as temperaturas (35°C e 5°C) e resíduos analisados (leite integral e desnatado), a concentração de 0,1% do sanificante, à base de quaternário de amônio, utilizado foi eficiente para eliminar as células de *L. monocytogenes* a níveis não detectáveis nos cupons.

Os resultados atestam que o processo de limpeza é de extrema importância em laticínios, promovendo a remoção de matéria orgânica e microrganismos, mas a sanificação deve ser realizada logo em seguida para garantir a completa higienização dos equipamentos e evitar uma possível contaminação dos produtos durante o processamento, de acordo com Macêdo (2007). No presente estudo, a remoção na etapa de limpeza sempre deixou algumas células de *L. monocytogenes* aderidas, o que numa situação real serviria de fonte de contaminação.

Em ambos os estudos realizados, tanto na presença de resíduos de leite integral e desnatado, foram encontradas células remanescentes de *L. monocytogenes* nos cupons que passaram pelo processo de limpeza. Em seu trabalho realizado sob as mesmas condições de temperatura, superfície, tempo e na presença de resíduos de leite integral, Santos (2009) não obteve contagem de *L. monocytogenes* após o processo de detergentização (limpeza) nos biofilmes formados. Tal diferença pode ser explicada pela variabilidade da metodologia do suabe e do método de recuperação das células de *L. monocytogenes*, estando dentro da margem de erro da metodologia.

Macêdo (2007) atesta que a etapa de limpeza consegue reduzir o número de microrganismos presentes na superfície de equipamentos a níveis satisfatórios, porém deve ser complementada com a sanificação para assegurar a inocuidade do alimento. Já Rossi (2008) realizou um estudo com biofilmes de células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus* sobre a superfície de aço inoxidável com leite integral e demonstrou que o processo de limpeza reduziu a contagem para poucas células (cerca de 0,50 log UFC/cm²), quando em células vegetativas e de

1 a 2 log UFC/cm² com biofilmes formados por esporos. Esses dados, quando comparados com o estudo em questão com *L. monocytogenes*, indicam que o processo de limpeza por si só não é eficiente na remoção completa de biofilmes microbianos em geral. Porém, nesse estudo de Rossi (2008), mesmo após o processo de sanificação com CQA a 0,1%, contagens indicaram a presença de 1,3 UFC/cm² de células vegetativas e de 4 UFC/cm² de esporos de *Bacillus cereus*, indicando que diferentes microrganismos se comportam de diferentes maneiras na presença de um mesmo sanificante, e que as condições em que a célula se encontra (forma vegetativa ou esporo) são de extrema importância na escolha do sanificante ideal para a indústria alimentícia, ocasionando uma sanificação eficiente (MASSAGUER, 2005).

Esses resultados são endossados por Bremer et al. (2006), cujo estudo revelou que o processo de detergentia, aplicado pelo sistema CIP em escala laboratorial, na superfície de aço inoxidável na presença de leite foi responsável por uma redução significativa na população do biofilme de microrganismos originários do leite, porém, mesmo após a sanificação com composto a base de ácido peracético (0,35%) , notou-se a sobrevivência da população do biofilme. Portanto, mais uma vez fica claro que o processo de detergentia por si só não é suficiente na remoção de biofilmes bacterianos, sendo necessária a aplicação do processo de sanificação para garantir a produção de alimentos seguros.

Segundo Dufour et al. (2004), a sanificação com 200 mg/L de cloro nem sempre se mostrou eficiente na remoção de biofilmes bacterianos formados por espécies de *Bacillus* e *Streptococcus*, em teste realizado em laboratório com tubulações de laticínios. Já Santos (2009), em estudo laboratorial, demonstrou que 25mg/L de hipoclorito de sódio foi capaz de remover os biofilmes formados por *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável que entra em contato com leite.

Segundo Wong (1998), a água de enxágüe remove cerca de 45% do total de resíduos sólidos do leite, os detergentes removem 27% do adicional, e o enxágüe após a detergentia, reduz outros 22%. O sanificante foi importante para reduzir o número de células bacterianas remanescentes, o que também ocorreu no presente estudo.

4.4.1. Avaliação do processo CIP sobre os biofilmes formados com resíduos de leite integral e desnatado na superfície de aço inoxidável

Para visualizar o efeito do processo CIP na remoção dos biofilmes de *L. monocytogenes* utilizou-se a observação por microscopia eletrônica de varredura, conforme pode ser visto nas Figuras a seguir.

Figura 38 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite desnatado, sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, antes de passar pelo processo CIP. Magnitude: 5.000x; 2 cm=2 μ m

Figura 39 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite desnatado, sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, após passar pelos detergentes do processo CIP. Magnitude: 5.000x; 2 cm=2 μ m

Figura 40 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite desnatado, sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, após passar pelo processo CIP completo, detergentes e sanificante. Magnitude: 5.000x; 2 cm=2 μ m

O cupom controle, que teve o biofilme formado na presença de leite desnatado possui uma estrutura diferente da encontrada pelo leite integral, obtida pela imagens de MEV por Santos 2008. Conforme visualizado na Figura 38, na ausência da gordura, a estrutura do biofilme é mais plana, sem relevos, enquanto que o biofilme de resíduo de leite integral apresenta uma estrutura muito mais acidentada, oferecendo abrigo às células de *L. monocytogenes*, conforme pode ser visto na Figura 41. Essa diferença de estrutura pode ser uma das explicações para a maior contagem de *L. monocytogenes* durante o período de maturação de 114h a 5°C (item 4.2.3.1.), sobre a superfície de aço inoxidável na presença de leite integral, quando comparado com a população do biofilme formado com leite desnatado.

Da mesma forma que ocorrido com os biofilmes de leite integral, que passaram pelo processo de limpeza, células remanescente são detectadas, porém os fragmentos de matéria orgânica observados estão em menor quantidade (Figura 39). Neste caso, células de *L. monocytogenes* também foram detectadas após o processo de sanificação (Figura 40).

Figura 41 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite integral, sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, antes de passar pelo processo CIP. Magnitude: 5.000x; 2 cm=2 μ m. Foto não publicada do acervo pertencente ao trabalho de dissertação de Santos, M. G. (2009)

Figura 42 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite integral, sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, após passar pelos detergentes. Magnitude: 2.000x; 2 cm=2 μ m. Foto não publicada do acervo pertencente ao trabalho de dissertação de Santos, M. G. (2009)

Figura 43 - Formação do Biofilme de *L. monocytogenes* na presença de resíduos de leite integral, sobre aço inoxidável avaliada através do MEV, após passar pelo processo CIP completo, detergentes e sanificante. Magnitude: 5.000x; 2 cm=2 μ m. Foto não publicada do acervo pertencente ao trabalho de dissertação de Santos, M. G. (2009)

A observação dos cupons de aço inoxidável pela MEV, revelam que o resíduo de leite integral forma uma estrutura porosa sobre a superfície de aço inoxidável, em cupons controle, dificultando a visualização de células de *L. monocytogenes* (Figura 41). Quando realizada a etapa de limpeza, ainda restam células na superfície e fragmentos de matéria orgânica (Figura 42), confirmando os resultados obtidos pela técnica do suabe. Ao realizar o sistema CIP completo, células podem ser observadas (Figura 43). Tais imagens revelam que células podem continuar aderidas à superfície mesmo após a realização do processo CIP completo, passando pela etapa final de sanificação, podendo não ser detectadas na contagem por plaqueamento, através da remoção pela técnica do suabe. A célula em questão poderia estar na forma não cultivável.

Bremer et al. (2006) verificaram que após a realização do processo CIP completo em laticínios, não foi detectada a presença de células remanescentes nos cupons de aço inoxidável avaliados por microscopia eletrônica de varredura.

5. CONCLUSÃO

A adesão de biofilme por *L. monocytogenes*, nas superfícies analisadas, foi influenciada pela temperatura de 35°C. Porém, sobre a formação e maturação dos biofilmes a temperatura de 5°C teve maior influência. Tal fato pode ser atribuído a produção de polímeros extracelulares como mostram as imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A superfície de silicone foi a mais propícia para a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, seguida pela borracha e aço inoxidável. Quando comparados os substratos, o creme de leite apresentou maior proteção aos biofilmes formados, seguido do leite integral e desnatado, mostrando que a gordura exerce um papel de proteção ao microrganismo.

A cepa utilizada de *Lactobacillus plantarum* não foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* na forma planctônica e em biofilmes, não sendo um bom competidor.

O processo CIP completo foi eficiente na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS

AARNISALO, K., SALO, S., MIETTINEN, H., SUIHKO, M.-L., WIETANEN, G., AUTIO, T. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. **Journal of Food Safety**, Westport, v.20, n.4, p. 237–250, 2000.

AARNISALO, K.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H.; WIRTANEN, G. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **LWT**, London, v. 40, p. 1041-1048, 2007.

AL-MAKHLAFI, H.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.60, n.10, p. 3560-3565, Oct. 1994.

ALMENDÁREZ-GARCÍA, B.E.; CANN, I.K.O.; MARTIN, S.E.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; REGALADO, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, Guildford, v.19, p. 670–680, 2008.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 412p., 2008.

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

AUSTIN, J. W.; BERFERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, London, v. 62, p. 509–519, 1995.

BARANCELLI, G.V.; ARRUDA, N.F.; CAMARGO, T.M.; BARBOSA, A.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F.; HOFER, E. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de produção e ambiente de processamento de queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas. **Anais..** Porto de Galinhas: CBM, 2009. 1 CD-ROM.

BARNES, L.M.; LO, M.F.; ADAMS, M.R.; CHAMBERLAIN, A.H.L. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.65, n.10, p.4543-4548, Oct. 1999.

BAR-OZ, B. Clinical observation *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Paediatrica**, Madrid, v. 90, p. 336–358, 2001.

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

BLACKMAN, I.C.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.8, p. 827-831, 1996.

BORUCKI, M.K; PEPPIN, J.D.; WHITE, D.; LOGE, F.; CALL, D.R. Variation in biofilm formation among strains of *L. monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, n.12, p. 7336-7342, Dec.2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

BREMER, P.J.; MONK, I; BUTLER, R. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.321-325, 2002.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; McQUILLAN, A.J. Laboratory scale Clean-in-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, p. 254-262, 2006.

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

CATALDO, G.; CONTE, M.P.; CHIARINI, F.; SEGANTI, L.; AMMENDOLIA, M.G.; SUPERTI, F.; LONGHI, C. Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.103, p.185-193, 2007.

CHAE, M.C.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 103-112, 2001.

CHAE, M.C.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v.23, n.3, p.250-259, May, 2006.

CHAPMAN, J.S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.51, n.4, p. 271-273, 2003.

CHAVANT, P.; FOLIO, P.; HEBRAUD, M. Growth of *Listeria monocytogenes* in biofilm according to the surface and the temperature and effects of different treatments on its survival. **Sciences-des-Aliments**, Madrid, v.23, n.1, p. 116-119, 2003.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.; HEBRAUD, M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.2, p.729-737, Feb., 2002.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Oxford, v. 2, p.22-32, 2003.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, n.4, p. 277-282, 2003.

COSTA, E.T.R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. 1999.81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

COSTERTON, J.W.. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.41, p.440-442, 1987.

COSTERTON, J. W; LEWANDOWSKI, Z. Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v.49, p.711-45, 1995.

COSTERTON, J. W., MARRIE, T. J., CHENG, K.J., Phenomena of bacterial adhesion. In: . SAVAGE, D.C., FLETCHER, M (Ed.) **Bacterial Adhesion**. London: Plenum Press, 1985. p.3-43,

CRIADO, M.T.; SUAREZ, B.; FERREROS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Champaign, v.48, p.123-126, 1994.

DAESCHEL, M.A.; McKENNEY, M.C.; McDONALD, L.C. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. **Food Microbiology**, London, v.7, p.91-98, 1990.

DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. Scientific Status Summary. **Food Technology**, Champaign, Chicago, v.56, n. 11, p. 69-78, 2002.

DiBONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 1552-1561, 2008.

- DONLAN, R.M. Biofilm Formation: A Clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.33, p.1387-1392. 2001.
- DONLAN, M.R; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n.2, p. 167-193, Apr, 2002.
- DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.
- DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a laboratory scale Clean-in-Place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 7, p. 1438-1443, 2004.
- ESPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R. Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 1063–1067, 2009.
- FARRAG, S.A.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the Presence of *Flavobacteria* in Skim Milk at 7 or 13°C. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.9, p.677-680, Sep., 1991.
- FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.6, p.641-650, 1996.
- FLACH, J. **Formação de biofilmes em diferentes materiais utilizados na indústria de processamento de leite**. 2006. 114p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com o leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 291-296, 2005.
- FLORESTA, F.A. **Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. 2006. 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 182p.
- FRANK, J.F.; KOFFI, R.A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p. 550-554, 1990.

FRANK, J.F.; GILLET, R.A.N.; WARE, G.O. Association of *Listeria* spp. Contamination in the dairy processing plant environment with the presence of staphylococci. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.928-932, 1990.

FOLSOM, J.P.; SIRAGUSA, G.R.; FRANK, J.F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, n.4, p. 826–834, 2006.

GALLETI, S.R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, jan./dez., 2003

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 1-15, 2007.

GIANOTTI, A.; SERRAZANETTI, D.; KAMDEM, S.S.; GUERZONI, M.E. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.123, p. 9–17, 2008.

GILBERT, P.; MOORE, L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, p. 703-715, 2005.

GILBERT, P.; ALLISON, D.G.; McBAIN, A.J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, cidade, v.92, p.985-1105, 2002.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, p. 245 – 248. 2003.

GONZÁLEZ, B.; ARCA, P.; MAYO, B.; SUÁREZ, J.E. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.60, n.6, p. 2158-2163, 1994.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y.Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B.F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 1165-1171, 2007.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Guildford, v.6, n. 1, p. 9-18. 1995.

JANG, A.; SZABO, J.; HOSNI, A.A.; COUGHLIN, M.; BISHOP, P.L. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.72, p. 368-376, 2006.

JAY, J.M. Foodborne Listerioses. In: _____ **Modern food microbiology**. New York: AVI Book, 1992. cap 21. p.510-540.

JAY, J.K. Listerioses de origem alimentar. In: **Microbiologia de alimentos**.. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.25 p.517-542.

JEONG, D.K.; FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, p.576–586, 1994.

JEYASEKARAN, G.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Effect of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surfaces. **Asian Fisheries Science**, Manila, v.13, p. 209-213, 2000.

JOHANSSON, M.L.; QUEDNAU, M.; MOLIN, G.; AHRNÉ, S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, p.155-159, 1995.

JOSEPH, B. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 367–372, 2001.

KALMOKOFF, L.M; 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**, Oxford, v.91, p. 725-734, 2001.

KNIGHT, P. Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. **ASM News, Ann Arbor, cidade**, v.59, n.5, p.247-250,1993.

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

KURBANOGU, E.B.; ALGUR, O.F. Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 3, p.238-242, 2006.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M.S.; HEIR, E.; HOLCK, A.L. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.51, n.4, p. 283-290, 2003.

LEMON, K.P.; HIGGINS, D.E.; KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 189, n. 12, p. 4418-4424, Jun. 2007.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, Bradford, v.108, n.1, p. 27-37, 2006.

MACÊDO, J.A.B. **Águas & Águas**. 3.ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2007. 1027 p.

MAFU, A. A.; DENIS, R.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p.742-746, 1990.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-179, Jan. 1999.

McLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, Nova York, v.1, p.94-114, 2006.

MAI, T.L.; CONNER, D.E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120 , p. 282-286, 2007.

MANGALAPPALLI-ILLATHU, A.K.; KORBER, D.R. Adaptative resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3588-3596, Nov. 2006.

MARSHALL, K.C., STOUT, R., MITCHELL, R., Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**, Reading, v.68, p.337-348, 1971.

MASSAGUER, R.P. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela. 2005. 258p.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm formation in the industry: A Review. **Food Reviews International**, New York, v. 8, n. 4, p. 573-603, 1992.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.10, p.2760-2764, 1998.

MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Formation of Biofilms by *Listeria monocytogenes* under Various Growth Conditions. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n. 1, p. 92-97, 2005.

MORTON, L.H.G.; GREENWAY, D.L.A.; GAYLARD, C.C.; SURMAN, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.41, p. 247-259.1998.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v.1, p. 107-121, 2004.

MOSTELLER, T.M., BISHOP, J.R., Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**. 6 th ed. Villanova: NCCLS, 2003. 81p.

NELSON, J.H. Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.10, p.344-345, 1990.

NIKU-PAAVOLA, M.L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, p.29-35, 1999.

NORTEMANS, S.; DORMANS, J.A.M.A., MEAD, G.C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, Chur, v.5, p.21-36, 1991.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multi-species biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 512-520, 2000.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford v.33, p. 320-324, 2001.

OKAZAKI, M.M. **Adaptação do método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio em concentrações acima de 200mg/L**. 2003. 85p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Guildford, v.19, p. 178-185, 2008.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v.34, p.577-588, 2007.

PAP, K.; KISKÓ, G. Efficacy of disinfectants against static biofilms on stainless steel surface. **Acta Alimentaria**, Budapest, v.37, p. 1-7, 2008.

POIMENIDOU, S.; BELESSI, C.A.; GIAOURIS, E.D.; GOUNADAKI, A.S.; NYCHAS, G.J.E.; SKANDAMIS, P.N. *Listeria monocytogenes* Attachment to and Detachment from Stainless Steel Surfaces in a Simulated Dairy Processing Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.75, n.22, p. 7182–7188, Nov. 2009.

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**, London, v.17, p. 361-365, 2000.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **LWT-Food Science and Technology**, London, v.32, p.321-326, 1999.

PREGNOLATO, W. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1. 533p.

REIJ, M.W.; DEN AANTREKKER, E.D., Recontamination as a source of pathogens in processed foods. LSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 1–11, 2004.

REINEMANN, D.J.; WONG, A.L.C.; RABOTSKI, E. Interaction of chemical, thermal and physical actions on the removal of bacteria from milk contact surfaces. In: INTERNATIONAL WINTER MEETING THE AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS, 1993, Chicago. **Anais...** Chicago: ASAE, 1993. (Paper, 933536).

RIBEIRO-FURTINI, L.L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência**. 2005. 80p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v.11, n.2, p.94-100, Feb.2003.

RIEGER, M.M. **Surfactant Encyclopedia**. Wheaton: Cosmetics & Toiletries Magazine;Allured Publishing, 1993. 34p.

ROBBINS, J.B.; FISHER, C.W.; MOLTZ, A. G.; MARTIN, S.E. Elimination os *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine and hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n.3, p. 494-498, 2005.

ROSSI, A.C.R. **Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios.** 2008. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.** 2 th ed. London: Blackwell Scientific, 1992. 639 p.

SANTOS, M.G. **Eficiência do processo Clean in Place (CIP) na remoção de biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* simulando diferentes condições encontradas em laticínios.** 2009. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SCHEEPE-LEBERKÜHNE, M.; WAGNER, F. Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 8, p. 695–700, 1986.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 627-636, 2002.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F. S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos.** 3 ed. São Paulo: Varela, 2007. 552p.

SOMERS, E.B.; WONG, A.C.L. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 10, p. 2218–2229, 2004.

STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopy of stainless-steel finishes used in food processing equipment. **Food Technology**, Champaign, v. 39, p. 110-114, 1985.

TRESSE, O.; LEBRET, V.; BENEZECH, T.; FAILLE, C. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.101, p.53-62, 2006.

WONG, A.C.L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.10, p.2765–2770, Oct., 1998.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, n.7, p.3996-4003, July, 2004.

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

ZOLTAI, P.T.; ZOTTOLA, E.A. McKay, L.L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.44, p.204-208, 1981.

ZOTTOLA, E. A., Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, Champaign, v.48, n.7, p.107-114, 1994.

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