

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
URI – ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**JULIANA BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM  
FACAS DE DESOSSA E RESISTÊNCIA A DIFERENTES FORMAS DE  
DESINFECÇÃO**

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**OUTUBRO DE 2012**



UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS  
MISSÕES  
URI – ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM  
FACAS DE DESOSSA E RESISTÊNCIA A DIFERENTES FORMAS DE  
DESINFECÇÃO**

**JULIANA BARBOSA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL  
OUTUBRO DE 2012**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM  
FACAS DE DESOSSA E RESISTÊNCIA A DIFERENTES FORMAS DE  
DESINFECÇÃO**

Juliana Barbosa

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Dra. Geciane Toniazzo  
Orientadora

---

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian  
Orientador

---

Prof. Dra. Laura Beatriz Rodrigues  
UPF – Passo Fundo

---

Prof. Dra. Eunice Valduga  
URI - Erechim

Erechim, Outubro de 2012.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI ERECHIM.

A **Nossa Senhora Aparecida**, que me deu a chance de um recomeço e uma vida nova me renovando a saúde, me dando um amor verdadeiro e força para buscar novos objetivos e refazer meus projetos de vida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permite jamais perder a fé e a esperança.

Aos meus pais Catarina e João, fonte de inesgotável amor, aos quais devo todas as minhas conquistas, pois me ensinaram a jamais desistir e manter sempre a dedicação em tudo que me propor a fazer.

Ao grande amor da minha vida, meu marido Evandro, pelo grande companheiro que é, pela compreensão em todos os momentos e por ser o grande incentivador do meu sucesso e por vibrar junto comigo a cada conquista.

Aos meus sogros, Ivone e Altair, grandes apoiadores da minha carreira e sempre acolhedores para que eu não sinta tanto a distância dos meus pais.

Aos meus antigos colegas de trabalho e donos da empresa, de quem sinto imensa saudade, pelos quais fiz este trabalho, que me permitiram estar aqui hoje e ser a profissional que os ajudou na conquista de habilitações nacionais e internacionais.

Aos fornecedores e grandes amigos conquistados ao longo da carreira industrial que se tornaram parceiros agora na vida acadêmica.

Aos fornecedores da Pluron e Mundial, na pessoa do Sr. Jaime e do Sr. Celso, que me atenderam de pronto e não pensaram duas vezes em abraçar este projeto, juntamente com suas empresas.

Aos meus grandes MESTRES e orientadores professores Cansian e Geciane, que tão brilhantemente me guiaram na pesquisa e na didática acadêmica, que incansavelmente corrigiram e orientaram meus primeiros rabiscos até o “produto final”.

A Mônica, meu braço direito no laboratório, que me auxiliou nas pesquisas e com quem dividi as pequenas vitórias do dia a dia e as aflições dos resultados das pesquisas.

A Todos os colaboradores dos laboratórios da URI que nunca mediram esforços para me ajudar durante todas as fases de pesquisa, demonstrando companheirismo, amizade e trabalho em equipe. Aos demais funcionários sem os quais seria impossível o trabalho de todos nós nas instalações, afinal em dias frios nada como um café “quentinho” e um bate-papo com o orientador para surgirem novas ideias e propostas para a pesquisa...

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## **AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM FACAS DE DESOSSA E RESISTÊNCIA A DIFERENTES FORMAS DE DESINFECÇÃO**

Juliana Barbosa

Outubro/2012

Orientadores: Rogério Luis Cansian

Geciane Toniazzo

Facas de desossa de bovinos, novas e usadas, foram utilizadas para avaliar a adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e a resistência destes frente a diversas formas de desinfecção. A adesão foi avaliada por swabs, nos cabos e lâminas de facas novas e usadas, imersas em cultivos previamente crescidos de *L. monocytogenes* ou *E. coli* e mantidas por diferentes tempos (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 6,0; 24 e 48 horas) a 35°C. Para avaliar a resistência à diferentes formas de desinfecção, após a exposição das facas ao micro-organismo em cada um dos tempos, as mesmas foram submetidas aos sanitizantes biguanida e ácido peracético nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0% (v/v) por 10 min; a água quente (82,2°C por 15 seg) e ao banho de ultrassom (40KHz, 155W e 20 e 50°C, por 10 e 60 min), além de uma etapa preliminar em ultrassom, com exposição de cultivos axênicos destes micro-organismos em diferentes contagens iniciais ( $10^4$  e  $10^9$  UFC/mL), nas mesmas condições. O número de micro-organismos sobreviventes foi obtido por plaqueamento de swabs e os valores de remoção pela diferença entre contagem inicial e final, feitos em triplicata. Observou-se uma curva logarítmica de adesão, tanto de *E. coli* como de *L. monocytogenes* indicando formação de biofilmes a partir de 6 horas de contato para *E. coli* e a partir de 1 hora para *L. monocytogenes*. Para *E. coli*, verificou-se também uma maior velocidade de adesão nas lâminas em relação aos cabos, principalmente nas lâminas usadas, diferentemente do comportamento de *L. monocytogenes*, onde não se observou diferenças entre os materiais novos e usados. A desinfecção com ácido peracético mostrou-se eficiente em todos os tempos de contato e concentrações avaliados para ambas as bactérias. Já a biguanida, mostrou comportamento diferenciado nos diferentes tempos de contato e com menor eficiência nos cabos e lâminas usadas, com aumento de eficiência nas maiores concentrações testadas (a partir de 1%). O tratamento com água quente, normalmente usado nas indústrias, também mostrou-se eficiente, com eliminação dos micro-organismos na maioria das condições de tempo de adesão e materiais usados. O tratamento com ultrassom apresentou reduções em torno de 1,5 ciclos logarítmicos para cultivos axênicos de *E. coli* com inóculo de  $10^4$  UFC/mL. Porém, quando testado diretamente nas facas os resultados não foram promissores, mostrando não haver influência do ultrassom na remoção da adesão em facas de desossa contendo *L. monocytogenes* ou *E. coli*.

Palavras chave: Desinfecção, ultrassom, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, água quente.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

**EVALUATION OF ADHESION OF *Listeria monocytogenes* AND *Escherichia coli* IN  
BONING KNIVES AND RESISTANCE TO DIFFERENT FORMS OF  
DISINFECTION**

Juliana Barbosa

October/2012

Orientadores: Rogério Luis Cansian

Geciane Toniazzo

Knives boning of cattle, new and used, were used to evaluate the adhesion of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* and their resistance against various forms of disinfection. The adhesion was assessed by swabs, in cables and blades of knives new and used, immersed in culture media previously grown of *L. monocytogenes* or *E. coli* and kept for different times (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 6.0, 24 and 48 hours) at 35°C. To evaluate the resistance to different forms of disinfecting, after exposure of the knives to the microorganism at each of the contact times, they were subjected to chemical disinfection with sanitizers biguanide and peracetic acid at concentrations of 0.2; 0.5, 1.0 and 2.0% V/V for 10 min; also with hot water (82.2°C for 15 sec) and ultrasonic bath (40kHz, 155W and 20 and 50°C for 10 and 60 min), plus a preliminary step in ultrasound with exposure of axenic cultures these micro-organisms at different initial counts ( $10^4$  and  $10^9$  CFU/mL), under the same conditions. The number of surviving microorganisms was obtained by plating swabs and the reduction values by the difference between initial and final count, done in triplicate. A logarithmic curve of adhesion was observed of both, *E. coli* and *L. monocytogenes*. For *E. coli*, there is a higher rate of adhesion on the blades in relation to the cables, especially in the used blades, unlike the behavior of *L. monocytogenes*, where differences were not observed between new and used materials. The disinfection with peracetic acid was effective at all contact times and concentrations evaluated, for both bacteria. Already, the biguanide showed different behavior in different contact times and with lower efficiency in used blades and cables, increasing efficiency at the highest concentrations tested (from 1%). The hot water treatment, typically used in industries, also proved to be efficient, with elimination of microorganisms in most of contact time of adhesion and materials used. The treatment with ultrasound bath showed small reductions around 1,5 log cycles to axenic cultures of *E. coli* with inoculum of  $10^4$  CFU/mL, but when tested directly on knives the results were not promising, showing no influence of ultrasound in removal of adhesion in knives boning containing *L. monocytogenes* and *E. coli*.

Keywords: disinfection, ultrasound, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, hot water.

## SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Qualidades da carne bovina.....	3
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	7
2.4. Adesão Bacteriana.....	8
2.4.1. Fases da aderência bacteriana.....	8
2.4.2. Aderência de micro-organismos a superfícies de materiais .....	9
2.4.3. Fatores que influenciam a aderência .....	10
2.5. Biofilmes bacterianos.....	11
2.5.1. Controle e Remoção do Biofilme.....	16
2.6. Superfícies utilizadas no processamento de alimentos.....	17
2.7. Processos de Higienização .....	20
2.8. Sanitizantes.....	21
2.9. Água Quente.....	26
2.10. Ultrassom .....	27
2.11. Considerações Finais a respeito do estudo.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Micro-organismos e meios de cultura utilizados.....	31
3.2. Avaliação da adesão dos micro-organismos <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> em facas de desossa.....	32
3.3. Avaliação da remoção dos micro-organismos.....	34
3.3.1. Remoção empregando sanitizantes.....	34
3.3.2. Remoção empregando água quente.....	34
3.3.3. Remoção ultrassom .....	35
3.4. Contagem padrão em placas.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1. Adesão de <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> em facas de desossa pela contagem	

padrão em placas .....	37
4.2. Avaliação da capacidade de desinfecção das facas de desossa previamente contaminadas com <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> com sanificantes químicos e água quente .....	44
4.3. Avaliação da capacidade de desinfecção das facas de desossa previamente contaminadas com <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> com aplicação de ultrassom .....	48
5. CONCLUSÕES.....	52
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Mecanismo teórico dos estágios de adesão e formação de biofilmes.....	13
<b>Figura 02:</b> Estrutura química da PHMB – Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (a) e da Clorexidina (b). .....	22
<b>Figura 03:</b> Esquema de realização das análises.....	31
<b>Figura 04:</b> Sistema de diluição das amostras (a) e plaqueamento em superfície em LB ágar (b).....	32
<b>Figura 05:</b> Facas em secagem na câmara de secagem de materiais do laboratório.....	32
<b>Figura 06:</b> Aparato experimental empregado para incubar as facas em caldo LB a 35-37°C/24 h. ..	33
<b>Figura 07:</b> Aparato empregado para a remoção dos micro-organismos em facas novas e usadas empregadas na indústria de alimentos (a) e detalhe da atuação do sanitizante na remoção dos biofilmes bacterianos (b), respectivamente.....	34
<b>Figura 08:</b> Facas submetidas à remoção dos micro-organismos em água quente (82,2°C/15seg).....	34
<b>Figura 09:</b> Aparelho de Ultra-Som utilizado nos experimentos de remoção de micro-organismos (a) e os tubo de ensaio contendo micro-organismo submetido ao banho de ultrassom (b), respectivamente.....	35
<b>Figura 10:</b> Facas novas e usadas em processo de remoção dos micro-organismos aderidos em banho de ultrassom.....	35
<b>Figura 11:</b> Cinética de adesão de <i>Escherichia coli</i> em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) (A) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas) (B). (Formação de Biofilme com 3,0 Log UFC/cm <sup>2</sup> ). .....	37
<b>Figura 12:</b> Cinética de adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) (A) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas) (B). (Formação de Biofilme com 3,0 Log UFC/cm <sup>2</sup> ). .....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividade antimicrobiana do PHMB sobre bactérias Gram negativas e concentrações recomendadas.....	23
<b>Tabela 2:</b> Atividade antimicrobiana do PHMB sobre bactérias Gram positivas e <i>Bacillus</i> (esporos). .....	23
<b>Tabela 3:</b> Atividade antimicrobiana do PHMB sobre bolores e leveduras.....	24
<b>Tabela 4:</b> Média de adesão de <i>Escherichia coli</i> (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas). ....	38
<b>Tabela 5:</b> Média de adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em Log UFC/cm <sup>2</sup> em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas). ....	41
<b>Tabela 6:</b> Redução na contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ). de <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> em facas de desossa após tratamento químico e água quente (tempo de contato das facas com a bactéria de 6 horas e concentrações do sanitizante recomendadas pelo fabricante - Biguanida 1% e Ácido Peracético 0,2% e temperatura da água quente de 82,2 <sup>0</sup> C). ....	44
<b>Tabela 7:</b> Redução na contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de <i>E. coli</i> , em função do tempo de contato (1, 2 e 6 horas) e as concentrações do sanitizante Biguanida (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0%). ....	47
<b>Tabela 8:</b> Redução na contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de <i>Listeria monocytogenes</i> , em função do tempo de contato (1, 2 e 6 horas) e as concentrações do sanitizante Biguanida (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0%). Resultados em Log UFC/cm <sup>2</sup> .....	48
<b>Tabela 9:</b> Efeito de diferentes tempos de exposição ao ultrassom (155W/40KHz) em meio de cultura LB sobre a contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	49
<b>Tabela 10:</b> Efeito de diferentes tempos de exposição ao ultrassom (155W/40KHz) de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> diluídas em água peptonada 0,1%,.....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

SSN – Aço inox novo

SSU – Aço inox usado

PPN – Polipropileno novo

PPU – Polipropileno Usado

APA – Ácido Peracético

EPS – Substância Polimérica Extracelular

PHMB – Cloridrato de Polihexametileno Biguanida

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados ainda são uma das principais causas de morbidade em diversos países e, em certas circunstâncias, podem ter sérias consequências. Essas enfermidades são denominadas doenças transmitidas por alimentos e a sua maioria é causada pelo consumo de alimentos contaminados com os denominados “perigos biológicos”, representados principalmente por bactérias patogênicas.

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

Com o aumento da população e do poder de compra dos consumidores, o consumo interno de carne bovina vem crescendo anualmente, sendo o consumo previsto para 2012 de 33,0 Kg/habitante/ano (ANUALPEC, 2012).

Durante o processo produtivo há diversas etapas que podem comprometer a qualidade sanitária do produto final, caso as operações não sejam realizadas conforme padrões higiênicos sanitários adequados. Na sala de desossa podem ocorrer contaminações que podem tornar a carne um veículo de doenças de origem alimentar.

Um dos pontos críticos do processo é a higiene das operações, que sempre foi alvo de verificações da Garantia de Qualidade e do Serviço de Inspeção Federal (SIF), e que passou a ser verificado de forma diferenciada pelo SIF a partir da Circular N° 175/2005/CGPE/DIPOA (Brasil, 2005). No intuito de atender as modernas legislações dirigidas ao controle sanitário de alimentos, tratam esses programas como requisitos básicos para a garantia da inocuidade dos produtos. No Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), estes Programas incluem entre outros, o Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional – PPHO (SSOP).

Equipamentos e utensílios com higienização inadequada participam isoladamente ou associados a outros fatores, de surtos de doenças de origem microbiana veiculadas por alimentos ou de alterações de alimentos processados (GERMANO et al., 2000). Os utensílios devem passar constantemente por uma avaliação microbiológica para controle da eficiência do procedimento

de higienização, evitando-se a contaminação dos alimentos produzidos (PINHEIRO et al., 2010). Caso os utensílios não sejam limpos adequadamente, possibilitarão a permanência de bactérias e fungos. Estes poderão entrar em contato com o alimento, vindo a tornar-se um problema grave. Desta forma, primeiro a superfície dos utensílios devem ser limpas e enxaguadas para posteriormente serem sanitizadas (LOPES, 2007).

Falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação, devido à adesão e a formação de biofilmes na superfície dos equipamentos. É possível ocorrer adesão bacteriana e formação de biofilmes em praticamente todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos, desde as rugosas que apresentam fissuras e fendas que podem alojar os micro-organismos até as consideradas mais lisas.

Considerando o exposto e a relevância do tema, propôs-se o presente estudo com o objetivo maior de avaliar a eficiência da remoção de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* de facas de desossa em cultivos axênicos, com diferentes métodos e simulando tempos de uso industriais. Para atingir este objetivo foram realizadas as seguintes etapas, caracterizando-se como objetivos específicos:

- ✓ Avaliação da adesão de *E. coli* e *L. monocytogenes* em cabos e lâminas de facas de desossa novas e usadas;
- ✓ Avaliação da remoção da adesão destas com ácido peracético e biguanida em diferentes concentrações e em diferentes tempos de contato prévio para adesão e formação de biofilmes;
- ✓ Avaliação da remoção da adesão com água quente (82,2°C), simulando o tratamento realizado pelas indústrias;
- ✓ Avaliação do efeito do ultrassom em cultivos axênicos e na remoção da adesão de *E. coli* e *L. monocytogenes* em facas de desossa novas e usadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Qualidades da carne bovina

Segundo dados epidemiológicos captados junto ao site da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), de 2000 a 2011 foram registrados apenas 358 casos de toxinfecções envolvendo carnes bovinas “in natura”, processados e miúdos. Sabe-se que estes dados nem sempre condizem com a realidade devido à falta de registros, portanto os dados acabam sendo subdimensionados. Entretanto, o consumo de carne no país vem aumentando ano a ano e ganhando bastante destaque no comércio interno, com dados bastante consistentes (ANUALPEC, 2012).

A carne deve corresponder às expectativas do consumidor no que se refere aos atributos de qualidade sanitária, nutritiva e sensorial. Ao adquirir esses produtos, o consumidor bem informado pressupõe que seja proveniente de animais saudáveis, abatidos e processados higienicamente (FELÍCIO, 1998). A carne apresenta alta susceptibilidade à contaminação microbiana, podendo ocasionar, uma vez estabelecida a contaminação, redução das propriedades nutritivas, alterações sensoriais indesejáveis, além de perigo à saúde do consumidor.

Kusaningrum et al. (2003) citam que patógenos expostos sobre superfícies de contato podem ser transferidos para outras superfícies de forma direta ou através de partículas no ar. Segundo os autores, estudos indicam que várias bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. sobrevivem nas mãos, panos e esponjas de limpeza e utensílios, por horas ou dias após contaminação inicial.

O tipo e o número de micro-organismos presentes nesse alimento refletem o grau de sanitização do abatedouro como também das condições de armazenamento após o abate, o que define naturalmente a sua qualidade (HUGAS, 1998; ALI et al., 1982; SILVA, 1995). Em todo ambiente que se desenvolvem os trabalhos chamados de matança, devem ser impostos cuidados para manter a rigorosa higiene, no sentido de evitar ao máximo a contaminação inicial, seja por germes que põem em risco a conservação da carne, seja pelos responsáveis por infecções e toxinfecções alimentares (PARDI et al., 2006). No processo de desossa, os vários cortes para o varejo são retirados da carcaça, colocados em mesas de aço inoxidável e manualmente aparados para remover o excesso de gordura. As carnes são então colocadas em esteiras que a transportam para outra sala onde são embaladas a vácuo e encaixotadas (NEL et al., 2004b).

A forma mais eficiente de reduzir a contaminação e o crescimento microbiano em carne

consiste em estabelecer programas de controle da qualidade, tais como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que podem ser pautados por micro-organismos indicadores que indicam a presença de agentes patogênicos e que causam deterioração (JAY, 2005).

A Resolução RDC nº 12/2001–ANVISA (BRASIL, 2001), que dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos exige apenas a ausência de *Salmonella* em carnes bovinas. Contudo, a presença de *Escherichia coli* nesse alimento em quantidades elevadas indica a possibilidade de contaminação fecal e a presença de outros micro-organismos enteropatogênicos, bem como a qualidade higiênico-sanitária do produto insatisfatória. A qualidade da carne bovina tem sido determinada pela natureza e pelo grau de contaminação inicial das superfícies das carcaças, sendo a prevenção da contaminação durante o abate e o processamento, o fator mais importante na garantia da qualidade microbiológica desse produto (SMULDERS e WOOLTHUIS, 1983; ROBERTS et al., 1984). Durante o abate, a carne pode ser contaminada a partir de várias fontes, incluindo-se os equipamentos com os quais entra em contato. Por isso, há necessidade do controle dos perigos microbiológicos, fator que constitui eixo dominante em todos os países, para a garantia da inocuidade do alimento para o consumidor e conseqüente diminuição dos prejuízos devido a produtos deteriorados e discriminados no comércio (ICMSF, 1991).

As análises microbiológicas dos equipamentos permitem uma avaliação objetiva do seu estado higiênico, das práticas sanitárias e procedimentos de limpeza adotados em indústrias de alimentos (FAVERO et al., 1984). Padrões microbiológicos atuais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) não fazem referência à quantidade de micro-organismos mesófilos, nem de coliformes, ou qualquer outro micro-organismo para superfície de equipamentos. Já o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2002), utilizam os padrões microbiológicos contidos na legislação do Mercado Comum Europeu, que estabelece um limite inaceitável acima de 10 UFC por cm<sup>2</sup> de bactérias mesófilas e acima de 1 UFC por cm<sup>2</sup> de *Enterobacteriaceae* nos testes de superfície de equipamentos, porém sem especificar os utensílios de operadores. Prendergast et al. (2004) relataram que o ar tem sido reconhecido como potencial fonte de contaminação microbiana em estabelecimentos de abate com grande repercussão na saúde pública e na qualidade do produto.

Surtos e enfermidades veiculadas por alimentos ou mesmo alterações degradativas dos mesmos, têm origem, em sua maioria, na má higienização de plantas processadoras. Superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato direto com alimentos durante o

processamento são importantes veículos de micro-organismos, tanto patogênicos quanto deteriorantes (ANDRADE e MACEDO, 1996). Salas climatizadas são locais de grande manipulação e processamento e, portanto, devem ser corretamente higienizadas antes e após a manipulação.

Com relação a *L. monocytogenes* o MAPA, passou a exigir através da CIRCULAR Nº354/2004/DCI/DIPOA (Brasil, 2004), procedimentos para a prevenção do micro-organismo apenas em produtos prontos, e através da CIRCULAR Nº 105/05/CGPE/DIPOA (Brasil, 2005), o controle passou a ser exigido não somente no produto final, como também em *swabs* e superfícies embora apenas para plantas exportadoras para os Estados Unidos. Carnes em especial moídas que, além de possuir maior área de superfície e de ser altamente manipuladas, possibilitando o crescimento bacteriano, permite o desenvolvimento de bactérias psicotróficas patogênicas como *L. monocytogenes*, por permanecerem estocadas sob temperatura de refrigeração até o consumo. A *L. monocytogenes* é um patógeno emergente capaz de ocasionar meningite e provocar abortos através da ingestão de alimentos contaminados, isto é aqueles que não foram submetidos ao tratamento térmico adequado (MANTILLA et al., 2007).

Segundo Jay et al. (2005), a carne é abundante nos nutrientes necessários para o crescimento de bactérias, levedura e bolores, e quantidades adequadas desses nutrientes estão presentes e disponíveis nas carnes frescas. As características intrínsecas das carnes, particularmente sua composição química, elevada atividade de água e pH próximo à neutralidade, são fatores que favorecem o desenvolvimento de uma microbiota extremamente variada (LEITÃO, 2003).

A maior parte da contaminação bacteriana da carcaça que ocorre durante as operações de abate é adquirida durante a esfolagem. A superfície da carcaça é contaminada principalmente pela pele. As primeiras incisões, bem como parte da esfolagem, são realizadas com faca que contaminam a superfície da carcaça (ROÇA e SERRANO, 1995a; VANDERLINDE, et al, 1998). Para Hansson (2001), a contaminação também procede de uma variedade de fontes, como couros, conteúdo intestinal, superfícies de contato e manipulação pelos trabalhadores. E contaminação fecal das carcaças não é somente responsável pela deterioração da carne, também envolve o risco de disseminar bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* e *E. coli*. Frazier e Westhoff (1998) e Nel (2004a), demonstraram também que humanos expelem aproximadamente  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  micro-organismos viáveis por minuto e eles acrescentaram que existe uma relação entre o número e tipos de tais organismos e o ambiente de trabalho.

Nel et al. (2004b), avaliando a contaminação bacteriana das carnes numa sala de desossa

em um matadouro-frigorífico de alta produção na África do Sul, verificaram alta incidência de micro-organismos patogênicos e salientaram que a fim de diminuir a incidência era recomendável que significativas melhorias fossem implementadas com respeito à sanitização, higiene no processo de abate dentro do matadouro e especialmente na sala de desossa, onde a carne é exposta a considerável manipulação.

## **2.2. *Escherichia coli***

*E. coli* está incluída no grupo dos coliformes totais e no grupo dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. A espécie *E. coli* pertence ao gênero *Escherichia*, classificado dentro da família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e gás (FRANCO e LANDGRAF, 2005; BRENNER e FARMER III, 2005).

As principais aplicações desses micro-organismos como indicadores, na verdade são: 1) indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha; 2) indicadores de falha do controle de contaminação pós processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico e 3) *E. coli* pode ser utilizada como indicador fecal em alimentos “in natura” (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

Entre os principais grupos de micro-organismos presentes no ar atmosférico a nível de matadouro-frigorífico encontram-se os micrococcos, coliformes, bacilos e estafilococos. Via de regra, há predomínio de *E. coli* no ar atmosférico de currais e sala de matança e baixas contagens deste micro-organismo nas câmaras de resfriamento, ocorrendo o inverso com *Pseudomonas* (ROÇA e SERRANO, 1995a).

Dados de Gill e McGinnis (2000) sugerem que as carcaças no início do processo de divisão podem ser esporadicamente contaminadas em locais específicos com grande número de *E. coli* as quais são distribuídas durante a divisão, além disso, os produtos são contaminados novamente em equipamentos indevidamente limpos.

### 2.3. *Listeria monocytogenes*

A *L. monocytogenes* é uma bactéria na maior parte transmitida ao homem através dos alimentos. Ela pode causar gastroenterite leve ou infecções graves no fluxo de sangue e/ou no sistema nervoso central, ou o aborto, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro. A letalidade (taxa de mortalidade) é grave com taxas entre 20-30% (BUCHANAN et al., 2004). Na década de 2000, a incidência de casos esporádicos ressurgiu na Europa (CAIRNS e PAYNE, 2009; GILLESPIE et al., 2006; GOULET et al., 2008; KOCH e STARK, 2006; KVISTHOLM JENSEN et al., 2010), um grande surto ocorreu em 2008, no Canadá (PHAC, 2008) e o número de casos em alimentos no Canadá e nos EUA está aumentando.

A *L. monocytogenes* é anaeróbica facultativa, não-formadores de endósporos, móveis por flagelos, psicrotrófica, capaz de multiplicar-se em baixas temperaturas por vezes abaixo de 0°C (BUCHANAN et al., 2004; GANDHI e CHIKINDAS, 2007; FORSYTHE, 2010). Encontra condições favoráveis de crescimento em pisos, drenos e equipamentos dentro das instalações da indústria alimentar, nomeadamente em ambientes frios e úmidos e atmosfera de salas refrigeradas onde só bactérias não psicrotóficas poderiam sobreviver. As estirpes de *L. monocytogenes* são recorrentemente encontradas nas superfícies da indústria alimentar, em especial em instalações frigoríficas, embora estes sejam rotineiramente limpos e desinfetados. Como um importante aspecto para a indústria de alimentos, cabe ressaltar que *Listeria* spp. podem colonizar várias superfícies inertes, sendo capazes de formar biofilmes em áreas de processamento de alimentos (ROBERTS e WIEDMANN, 2003).

Dentre as espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* é a única patogênica transmitida por alimentos, o que a torna um micro-organismo importante tratando-se das enfermidades causadas pela ingestão de produtos alimentícios contaminados (FORSYTHE, 2010). Além disso, do ponto de vista econômico, a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* é uma grande preocupação para as indústrias desta área (ALESSANDRIA et al., 2010).

Quanto a sua fisiologia, *L. monocytogenes* cresce em valores de pH baixos, em torno de 4,4, podendo ser inibida por ácidos orgânicos, como ácido acético, cítrico e láctico, na concentração de 0,1%. Seu crescimento é acentuado em valores de atividade de água (aw) maiores ou iguais a 0,97, podendo sobreviver em valores bem mais baixos, em torno de 0,83. Determinadas concentrações de sal, em torno de 6,5%, também permitem seu crescimento (MONTVILLE e MATTHEWS, 2008).

Diversos alimentos podem estar contaminados com *L. monocytogenes*, mas ela tem sido frequentemente encontrada em leite cru, queijos (principalmente os de pasta mole), carnes

frescas ou congeladas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais, tendo prevalência em leite e produtos lácteos, devido aos primeiros surtos notificados da doença (JAY, 2005). Mesmo sendo destruída durante a pasteurização e o cozimento dos produtos a *L. monocytogenes* pode contaminar alimentos prontos para o consumo, por exemplo, antes da sua embalagem (KHELEF et al., 2006).

## **2.4. Adesão Bacteriana**

Na natureza e nos alimentos, os micro-organismos aderem-se às superfícies e crescem como uma comunidade (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). A adesão microbiana ocorre em função da deposição de micro-organismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; ZOTTOLA, 1997).

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

Sabe-se que o tipo de superfície que entra em contato com o alimento e a sua topografia influencia a aderência bacteriana, pois superfícies abrasivas estão mais sujeitas ao acúmulo de sujidades e são mais difíceis de limpar do que superfícies lisas (HOLAH et al., 1990). Devido a essas imperfeições da superfície e ao acúmulo de sujidades, esses materiais propiciam a aderência bacteriana e a formação de biofilme, podendo resultar na contaminação cruzada (FRANK e CHMIELEWSKI, 2003).

### **2.4.1. Fases da aderência bacteriana**

A aderência de micro-organismos às superfícies pode ocorrer diretamente pelo contato com alimentos contaminados ou indiretamente por partículas bacterianas do ar, onde inicia-se o processo de adesão da bactéria ao substrato (KUSUMANINGRUM et al., 2003).

#### **a) Primeira fase - Interações físico-químicas entre a bactéria e a superfície**

Em muitos trabalhos relata-se que a adesão bacteriana consiste em uma atração da célula pela superfície, seguida da adsorção e, posteriormente, aderência da célula bacteriana (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004).

A adesão ocorre pela interação da bactéria com a superfície do material através de efeitos

físicos, como o movimento browniano, atração por forças de Van der Waalls, forças gravitacionais, efeito eletrostático da superfície, e interações hidrofóbicas (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004; GOTTENBOS et al., 2000).

As interações físicas são classificadas como “long-range” e “short-range” (GOTTENBOS et al., 2000). A interação “long-range” (não-específicas, mais de 50nm de distância) entre a célula e a superfície é descrita por forças mútuas em função da distância e a energia livre. As interações “short-range” tornam-se efetivas quando a célula e a superfície ficam a uma distância menor que 5nm, separadas apenas por pontes químicas (como as pontes de hidrogênio), interações iônicas e dipolo (SINDE e CARBALLO, 2000).

#### b) Segunda fase: Interações molecular e celular entre a bactéria e a superfície

Na segunda fase da aderência, as reações moleculares específicas entre a bactéria e o substrato tornam-se predominantes. Isso implica a adesão firme da bactéria à superfície através de estruturas poliméricas, como cápsulas, fímbrias ou pili. Uma vez que o micro-organismo se aproxima da superfície, a adesão é determinada pelas interações físico-químicas, que podem ser de atração ou repulsão, dependendo da bactéria e da superfície (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004).

A aderência pode ser reversível quando há uma interação entre a bactéria e o substrato, envolvendo forças eletrostáticas e de Van der Waalls e interações hidrofóbicas. A aderência torna-se irreversível quando o micro-organismo está ancorado por apêndices ou por produção de polímeros extracelulares (SINDE e CARBALLO, 2000).

#### **2.4.2. Aderência de micro-organismos a superfícies de materiais**

A interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzida pela bactéria, suporta a formação de biofilmes (CARPENTIER, 1997). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais, vitaminas e água que formam uma espécie de crosta sobre a superfície. Dessa forma, os micro-organismos continuam a crescer, gerando um substrato altamente propício para a aderência de outras bactérias, inclusive as patogênicas (COSTERTON, 1987; KREFT et al., 2001). Isso faz com que as superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na produção de alimentos possam ser focos de contaminação bacteriana (HOLA e THORPE, 1990).

### **2.4.3. Fatores que influenciam a aderência**

A aderência bacteriana às superfícies depende de muitos fatores, como a natureza e energia livre, hidrofobicidade, aspereza, a composição química e a presença de proteínas na superfície (CARBALLO et al., 1992; HOOD e ZOTOLLA, 1997; SINDE e CARBALLO, 2000).

Sabe-se que a composição química da superfície influencia a adesão e a proliferação bacteriana. Nos materiais dotados de diferentes grupos funcionais em sua composição química, ocorre uma diferença do número de células aderidas devido ao fato da interação bactéria-superfície depender da hidrofobicidade e carga do material (KATSIKOGIANNI e MISSIRLIS, 2004).

O aço inoxidável e o vidro são considerados materiais hidrofílicos. Essas superfícies geralmente permitem uma menor aderência bacteriana quando comparados com superfícies hidrofóbicas como o teflon, náilon e a ampla variedade de polímeros, dentre eles o polietileno (SINDE e CARBALLO, 2000).

Tem sido constatado que irregularidades em superfícies poliméricas também influenciam a adesão bacteriana, enquanto que superfícies lisas não favorecem tanto a adesão bacteriana (KATSIKOGIANNI e MISSIRLIS, 2004). Vários tipos de superfícies que são utilizadas no processamento do alimento, como o aço inoxidável e os polímeros, sofrem desgastes com o uso repetido e aumentam a possibilidade do acúmulo de sujidades e bactérias (HOLAH e THORPE, 1990).

O aço inoxidável AISI (American Iron and Steel Institute) 304 é composto por aproximadamente 18 a 20% de cromo, 5% de níquel, no máximo 2% de molibdênio, 0,08% de carbono, 0,045% de fósforo, 1% de silício, 0,03% de enxofre e o restante de ferro. Enquanto que no aço AISI 316, a sua composição varia ao redor de 17 a 20% de cromo, 10 a 15% de níquel, 2 a 3% de molibdênio, 0,03 a 0,08% de carbono, 0,03% de fósforo, 0,75% de silício, 2,0% de manganês e 0,03 de enxofre (BRASIL et al., 2001).

O aço inoxidável AISI 304 é o mais utilizado para acabamentos e equipamentos de cozinhas profissionais, enquanto o tipo AISI 316 é o mais recomendado para contato direto com o alimento (MONTEIRO, 2004).

## 2.5. Biofilmes bacterianos

O desenvolvimento de biofilmes microbianos ocorre frequentemente nas indústrias de alimentos, onde grande quantidade de nutrientes está disponível aos micro-organismos, como por exemplo, quando válvulas, gaxetas de borracha e as partes internas de tubulações de aço inoxidável são colonizadas por micro-organismos (BERESFORD et al., 2001; LEREBOUR et al., 2004). Nesses pontos, se não houver higienização completa, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento de micro-organismos (ALLISON et al., 2000).

Os biofilmes que ocorrem na natureza consistem primeiramente de células, viáveis ou não, embebidas em substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ancoradas à superfície (CARPENTIER, 1993). Esses EPS podem conter polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácidos nucleicos e teicóicos e outras substâncias, contendo de 85 a 95% de água (COSTERTON, 1981). Os EPS promovem proteção do biofilme, dificultando o acesso de agentes biocidas, concentrando nutrientes, sequestrando metais e toxinas e prevenindo a desidratação do biofilme (CARPENTIER e CERF, 1993).

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

Não há consenso a respeito do número de células que é necessário para formar os biofilmes. Ronner e Wong (1993) consideraram como biofilme um número de  $10^3$  células aderidas por  $\text{cm}^2$ , enquanto Wirtanen et al. (1996) e Andrade et al. (1998b) afirmaram ser necessária, além da produção de exopolissacarídeos, uma população de células de  $10^5$  e  $10^7$  células por  $\text{cm}^2$ , respectivamente, para que um biofilme possa ser considerado estável.

A maioria dos micro-organismos em seus habitats naturais está aderida a superfícies (DAVEY e O'TOOLE, 2000), indicando a grande vantagem seletiva do crescimento dos micro-organismos no biofilme (COSTERTON, 1987; CARPENTIER, 1993).

Os biofilmes têm importância em várias atividades humanas. Por exemplo, em estações de tratamento de águas ou de efluentes eles removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica. Numerosos bioprocessos também utilizam biofilmes (XAVIER

et al., 2005), alguns exemplos podem ser citados, como a produção de vinagre (BOLETTI, 1921), ácido cítrico e vinho, no qual as bactérias produtoras de ácido acético crescem em biofilmes sobre camadas finas dos tonéis de madeira ou de concreto apresentando como função a conversão do substrato em produto final (SAKURAI et al., 1997). Nas indústrias de alimentos, a formação de biofilmes tem grande importância, uma vez que pode dificultar a higienização das superfícies que entram em contato com o alimento, possibilitando a ocorrência de surtos. A formação de biofilmes devido à aderência de *Salmonella* a superfícies que entram em contato com os alimentos tem sido reconhecida como um fator que pode contribuir com os surtos de infecções alimentares (FRANK e CHMIELEWSKI, 2003).

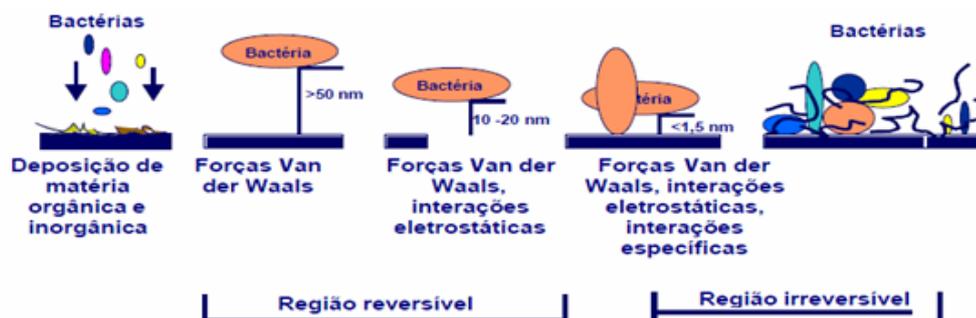
A adesão e a formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis, sob diversos aspectos, uma vez que eles podem tornar menos eficiente o processo de cloração da água (BEER et al., 1994), reduzir a eficiência de transferência de calor em trocadores de calor, reduzir o escoamento em tubulações (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994), desencadear processos corrosivos (BEECH e GAYLARD, 1989) e, principalmente, tornarem-se fontes de contaminação microbiana (BEER et al., 1994). Sob o aspecto microbiológico, a adesão pode constituir-se de micro-organismos alteradores e, ou, patogênicos, que resultam em graves problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica (CRIADO et al., 1994).

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

Estudos têm mostrado que a população no biofilme apresenta diferenças entre células planctônicas e células aderidas (LEJEUNE, 2003). Os biofilmes diferem em seu metabolismo, estrutura química, características de superfície da célula, resistência a agentes químicos e físicos comumente usados em procedimentos de higienização, entre outros (ALLISON et al., 2000). As células estão envolvidas em uma matriz polimérica e são diferentes fenotipicamente de quando crescem em suspensão. Uma das maiores diferenças é o aumento da resistência, na ordem de 10 vezes a 100 vezes, aos agentes antimicrobianos (DRUGGAN et al., 1993).

Os biofilmes são naturalmente heterogêneos e, por essa razão a quantificação da morfologia é o principal problema (MIDELET e CARPENTIER, 2004). Embora a função e a aparência de biofilmes em vários ambientes sejam diferentes, todos os biofilmes originam-se da mesma sequência de eventos (BOS et al., 1999; FORSYTHE, 2010). Segundo estes autores, sua formação ocorre na seguinte sequência de eventos (Figura 1):

- i) Os nutrientes dos alimentos são adsorvidos na superfície formando um filme condicionante. Isso leva a uma alta concentração de nutrientes, comparada com a fase líquida, e favorece a formação de biofilmes. A camada de nutrientes afeta ainda as propriedades físico-químicas da superfície, como, por exemplo, a energia livre da superfície, as mudanças na hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam e dão condições à colonização microbiana.
- ii) Os micro-organismos aderem à superfície condicionante. A adesão inicial das bactérias por forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbicas é reversível. Mais tarde, a adesão é irreversível devido às ligações mais fortes como interações dipolo-dipolo, ligações covalentes e iônicas e interações hidrofóbicas. Os flagelos bacterianos, as fímbrias e os exopolissacarídeos estão envolvidos no contato com filmes condicionantes. O exopolissacarídeo é importante na adesão célula-célula e célula-superfície e também protege as células contra a desidratação.
- iii) As bactérias irreversivelmente aderidas crescem e dividem-se, formando micro colônias, as quais aumentam e depois se unem para formar uma camada de células que cobre a superfície. Durante essa fase, as células produzem polímeros adicionais que aumentam sua fixação e estabilizam a colônia contra flutuações do ambiente.
- iv) A adesão contínua e o crescimento das células bacterianas, conjuntamente com a formação de exopolissacarídeos, levam a formação de biofilmes. A camada de biofilme pode ter vários milímetros de espessura em questão de dias.
- v) Com o tempo, o biofilme começa a liberar partículas relativamente grandes de biomassa.



**Figura 01:** Mecanismo teórico dos estágios de adesão e formação de biofilmes.

Fonte: MARSHALL (1992).

As bactérias das partes liberadas podem contaminar o alimento, distribuindo-se de forma não homogênea no alimento ou iniciar a formação de um novo biofilme na linha de produção.

Após a fixação inicial de células bacterianas, o resultado das etapas seguintes define a estrutura e a atividade do biofilme. Estas etapas incluem todos os fatores físicos envolvidos no processamento de biofilmes e alguns fatores biológicos como crescimento, divisão celular e produção de exopolissacarídeos (XAVIER et al., 2005).

A forma de prevenção e controle de biofilmes é outro aspecto importante e objeto de pesquisas. Geralmente, uma limpeza e um programa de sanitização efetivos inibirão a formação de biofilmes.

No controle e na prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental. Um biofilme microbiano presente em uma superfície com resíduos oriundos do alimento impede uma efetiva penetração do sanitizante para inativar os micro-organismos. O sanitizante reage, também, com resíduos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais. Assim, a atividade antimicrobiana sanitizante será prejudicada.

Sabe-se que quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes, antes do uso de sanitizantes, a população de micro-organismos será reduzida. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam os micro-organismos aderidos (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Tratamentos mecânicos e a quebra química da matriz de polissacarídeos são necessários para a remoção de biofilmes (FORSYTHE, 2010).

As bactérias aderidas são cobertas com material orgânico o qual pode inibir a penetração do sanitizante em função da perda de propriedades umectantes. Portanto, a atividade de detergência é necessária para remover essa camada externa, antes da utilização de um sanitizante. Os micro-organismos mortos devem ser removidos, pois, do contrário, podem agir como um filme condicionante e como fonte de nutrientes para uma posterior formação de um novo biofilme. Novos agentes de limpeza e tratamentos enzimáticos são formulados para a remoção efetiva de biofilmes (FORSYTHE, 2010).

O desenho e o projeto dos equipamentos também são aspectos importantes para a prevenção e o controle de biofilmes. Um desenho adequado de equipamentos como tanques, dutos e juntas facilita a limpeza da linha de produção. A microtopografia da superfície pode complicar os procedimentos de limpeza quando fendas e outras imperfeições protegem as células aderidas. O aço inoxidável resiste aos danos de impacto, mas é vulnerável à corrosão, enquanto superfícies emborrachadas são propensas à deterioração e podem desenvolver rachaduras onde as bactérias podem se acumular (LE CLERCQ-PERLAT e LALANDE, 1994).

Muitos micro-organismos estão envolvidos na adesão e formação de biofilmes, incluindo bactérias deterioradoras e patogênicas. Dentre as alteradoras encontram-se: *Pseudomonas aeruginosa* (HEYDOM et al., 2002), *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. (CRIADO et al., 1994), *Pseudomonas fluorescens* (ROSSONI e GAYLARDE, 2000; VALCARCE et al., 2002), *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al., 1998a) e *Shewanella putrefaciens* (HJELM et al., 2002). Entre as bactérias patogênicas incluem-se *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thymurium*, *Listeria monocytogenes* (LEJEUNE, 2003), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (POMPERMAYER e GAYLARD, 2000), *Vibrio parahaemolyticus* (WONG e CHUNG, 2002), *Klebsiella pneumoniae* (DI MARTINO et al., 2003) e *Escherichia coli* O157:H7 (DEWANTI e WONG, 1995).

Em estudo realizado por Peters et al. (1999), vários patógenos foram isolados de comunidades de biofilmes. Neste estudo, *Listeria* spp. foi encontrada em 35% das superfícies de contato com alimentos e em 42% de fontes ambientais, com *Staphylococcus aureus* presente em um total de 7 e 8%, respectivamente. Joseph et al (2001), relataram a presença de bactérias, como *Klebsiella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* enterohemorrágica em biofilmes.

Estudos realizados comprovaram que *E. coli* O157:H7 pode formar biofilme sob superfícies de aço inoxidável (DEWANTI e WONG, 1995; RYU et al., 2004a; RYU et al., 2004b) e o desprendimento de células pode resultar em uma contaminação cruzada dos alimentos durante o processamento (FRANK et al., 2003). Stopforth et al (2003) mostraram que *E. coli* O157:H7 adaptada a ácido teve uma maior sobrevivência e prevalência em biofilmes sobre superfícies de aço inoxidável. A resistência das células bacterianas embebidas no biofilme a estresses ambientais, como sanitizantes rotineiramente usados nas indústrias de alimentos pode ser consideravelmente aumentada (FRANK et al., 2003).

A *E. coli* O157:H7 é conhecida por produzir exopolissacarídeos (EPS) (MAO et al., 2001), os quais podem prover uma barreira física para proteger as células contra estresses ambientais. EPS estão também envolvidos na adesão das células e formação do biofilme (FRANK, 2000). Além disso, os EPS podem servir como um filme condicionante sob superfícies inertes, o que afeta a união da célula por funcionar como um aderente ou antiaderente e influenciar a formação de um biofilme de estrutura tridimensional (DANESE et al., 2000).

Segundo estudo conduzido por HOLAH et al., (2002) em uma indústria de alimentos, estirpes microbianas, por exemplo, *E. coli* e *L. monocytogenes*, foram encontradas nas superfícies de trabalho e produtos, e algumas dessas cepas foram persistentes. As células estavam embebidas na matriz orgânica do biofilme, o qual mostra que a estrutura do biofilme

formado afeta o modo pelo qual as superfícies devem ser limpas. OULAHAL-LAGSIR et al. (2003) constataram que o tratamento com enzima glicolítica e proteolítica associado com ultrassom aumenta a remoção de biofilme formado por *E. coli* em superfícies de aço inoxidável suja com leite.

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

### **2.5.1. Controle e Remoção do Biofilme**

A restrição de água e nutrientes, o tipo de equipamento e a temperatura são importantes para o controle do biofilme, entretanto geralmente não é possível reduzir a quantidade de água ou aprimorar o “design” do equipamento ou reduzir a temperatura de operação, por isso o controle do biofilme está focado nos processos de limpeza e desinfecção (FRANK e CHMIELEWSKI, 2003).

Em condições ideais, os equipamentos são confeccionados de forma a prevenir o acúmulo de sujidades, permitindo uma maior qualidade do processo de limpeza e desinfecção, para que não haja a formação de biofilmes (FRANK e CHMIELEWSKI, 2003).

Dentre os materiais mais utilizados em equipamentos para a preparação de alimentos, tanto em nível industrial quanto doméstico, o aço inoxidável tem sido o material de escolha devido a sua resistência à corrosão e oxidação, por ter uma maior durabilidade, por ser de fácil fabricação e também por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com cobre, alumínio e com a ampla variedade de polímeros (HOLA e THORPE, 1990; ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Para o processamento de alimentos, também destacam-se os utensílios fabricados com polietileno, principalmente placas de corte. Devido à grande variedade de alimentos que são preparados em residências ou em estabelecimentos comerciais, um dos principais cuidados com essas placas é a contaminação cruzada, a qual está muito relacionada com a capacidade de adesão das bactérias contaminantes. Uma das maiores preocupações nesse sentido é a contaminação de placas de polietileno por *Salmonella* sp. patogênicas (CARPENTIER, 1997).

Chen et al. (2001) quantificaram a contaminação cruzada de alimentos para placas de corte, e destas para o alimento. A avaliação da aderência bacteriana indicou que a taxa de

transferência foi bastante alta (aproximadamente 55%), demonstrando que uma maior taxa de contaminação por micro-organismos patogênicos pode ser gerada devido à utilização inadequada desse utensílio.

## **2.6. Superfícies utilizadas no processamento de alimentos**

A Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 do SVS/MS (BRASIL, 1997) aprova o “Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com esta Portaria, todo o equipamento e utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que: I) não libere substâncias tóxicas, odores e sabores; II) seja não absorvente e resistente à corrosão; III) seja capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção.

As superfícies devem ser lisas e estarem isentas de rugosidade e frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos. Não é recomendável o uso de madeira e de outros materiais que não possam ser limpos e desinfetados adequadamente, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será uma fonte de contaminação. Deve ser evitado o uso de diferentes materiais na mesma superfície para inibir o aparecimento de corrosão por contato (BRASIL,1997).

As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado (HAYES, 1993). Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície, podendo apresentar fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficientes para alojar micro-organismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização que favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de micro-organismos (BOWER et al., 1996).

A rugosidade dos materiais também influencia na formação do biofilme (TAYLOR e HOLAH, 1996), mas parece ser menos importante em relação à adesão inicial (BOULANGE-PETERMANN et al., 1998). Esse fato pode ser relacionado à superfície de contato entre micro-organismos e superfícies que processa o alimento. Em geral, quanto maior a superfície de contato maior a probabilidade de formação de biofilme, uma vez que maior é a força inicial de adesão. Contudo, nem sempre quanto maior a rugosidade maior será a adesão inicial. A

influência da rugosidade da superfície no processo de formação de biofilme é relacionada às dificuldades durante higienização de superfícies rugosas (Teixeira et al., 2008).

Equipamentos processadores de alimentos são fontes potenciais de micro-organismos patogênicos (MIDELET e CARPENTIER, 2004). Haeghebaert et al. (2002) constataram que a contaminação de equipamentos contribuiu com 59% dos surtos de doenças de origem alimentar investigadas na França durante o ano de 2001.

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

Os materiais das superfícies comumente usados o processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro, permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes (RODOLFO JR et al., 2002; LEJEUNE, 2003).

As superfícies de processamento devem ser inertes, tanto no que se refere aos alimentos quanto ao que concerne a detergentes e sanitizantes sob condições normais de uso. Além disso, seus componentes não devem ser tóxicos, não podem migrar nem ser absorvidos pelos alimentos. As superfícies lisas, duras, contínuas sem fendas ou fissuras são as mais indicadas. As características macroscópicas e particularmente microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos com micro-organismos deterioradores ou patogênicos. As características das superfícies auxiliam na realização de um procedimento de higienização adequado, sendo que quanto mais lisa a superfície, mais fácil será a higienização. O ideal é que nas superfícies não se formem poros nem ranhuras, e que estas sejam resistentes às deformações, como o abaulamento (ANDRADE et al., 2008).

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

As propriedades dos polímeros variam bastante, de acordo com a matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Aqueles usados na indústria de alimentos são agrupados em duas categorias: termoplásticos e termoestáveis. Os termoplásticos

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

O PVC caracteriza-se por ser atóxico, resistente à maioria dos reagentes químicos, como agentes oxidantes, é impermeável, estável, bom isolante térmico, além de possuir grande durabilidade e não propagar chamas. Pode ser rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco, colorido ou não. Este material pode ser formulado com vários tipos de aditivos, sendo o polímero mais polivalente. Os aditivos empregados podem melhorar as características das superfícies de PVC, como a resistência ao calor ou ao frio, a choques ou à luz, dentre outras. A adição de líquidos orgânicos, denominados plastificantes, confere ao PVC grande flexibilidade (RODOLFO JR. et al., 2002).

Dentre os materiais disponíveis, o aço inoxidável, uma liga cuja composição inclui carbono, cromo e níquel, é o mais utilizado. Há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18% de cromo e 8% de níquel são os mais usados. Neste grupo, estão as ligas da classe 300, por exemplo, 304 e 316, que são resistentes à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes, além de serem facilmente higienizáveis e relativamente baratas. Esta superfície é comumente usada na construção de equipamentos e utensílios de processamento de alimentos em geral, como: tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, mesas, pias, bancadas para manuseio, entre outras aplicações (JULLIEN et al., 2002).

Superfícies de aço inoxidável e vidro são de mais fácil limpeza do que polímeros, alumínio e cobre (BOULANGE-PETERMANN, 1998). Segundo Boulange-Petermann (1998), este material é relativamente mais resistente ao ataque de agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes usados na indústria de alimentos, como hipoclorito de sódio, ácido peracético e iodóforos. Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo escoamento do alimento (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

## 2.7. Processos de Higienização

Conforme BRASIL (1997), os pisos e paredes, assim como os equipamentos e utensílios utilizados na indústria devem ser lavados diariamente e convenientemente desinfetados, neste caso, pelo emprego de substâncias previamente aprovadas pelo DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal). Na indústria da carne a adequação a um processo de higienização é julgado na base do cumprimento a um Processo Operacional Padrão específico, durante o processo de limpeza, inspeção da higienização das instalações e equipamentos e também na amostragem aleatória das superfícies de trabalho limpas para estimação do número de bactérias sobreviventes após a higienização (GILL et al., 1996).

A higienização, do ponto de vista conceitual, divide-se em duas etapas distintas: limpeza e sanitização. Na limpeza, objetiva-se a remoção de resíduos orgânicos e minerais – proteínas, gorduras e sais minerais. Na sanitização, procura-se eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de saprófitas ou alteradores a quantidades insignificantes (AQUINO et al., 2003). Uma boa limpeza é responsável por até 99,9% da remoção de partículas indesejáveis. O 0,1% restante inclui os micro-organismos que podem deteriorar os alimentos ou causar uma intoxicação alimentar aos indivíduos que os ingerirem (FUJIHARA e SYLVIO, 2003). Hood e Zottola (1997), salientam que a lavagem e sanitização regulares ainda parecem ser os melhores meios para prevenir ambos, micro-organismos de vida livre e aderidos, de se tornarem um sério problema. E segundo Nel (2004a), os produtos e procedimentos aplicados para limpar e desinfetar os equipamentos, são tão importantes quanto à frequência de lavagem e desinfecção.

A atividade antimicrobiana é comumente caracterizada pela concentração mínima inibitória do composto contra um isolado bacteriano. No entanto, com desinfetantes a capacidade do composto antimicrobiano para matar bactérias tem sido considerada, com frequência, a medida de importância (AARESTRUP e HASMAN, 2004).

Para que uma sanificação seja efetiva, é necessário utilizar o sanificante, respeitando alguns parâmetros, como: tempo de contato, concentração, temperatura, níveis de pH da solução em uso, natureza da superfície, método de aplicação, carga de sujeira orgânica, estabilidade e atividade residual (FUJIHARA e SYLVIO, 2003).

Desinfecção inadequada pode produzir resistência ao desinfetante como resultado da seleção ou adaptação através da exposição regular à concentrações subletais (AASE et al., 2000). Cuidados devem ser tomados quanto à presença de biofilmes, pois a área de produção industrial de alimentos dispõe de altas taxas de umidade e temperaturas adequadas. E ainda, nos biofilmes,

os micro-organismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos (MENEZES, 2007).

## 2.8. Sanitizantes

A sanitização é definida como o tratamento de superfícies / equipamentos usando-se métodos físicos ou químicos, tais que a quantidade de micro-organismos presentes é reduzida a números aceitáveis (ASSELT e GIFFEL, 2005).

Deve-se selecionar sanitizantes que i) sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; ii) apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os micro-organismos; e iii) sejam estáveis sob variadas condições de uso e que possuam baixa toxicidade e corrosividade (ANDRADE et al., 2008).

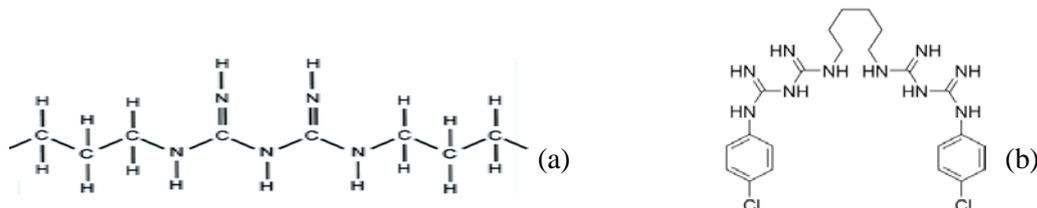
É importante saber que a ação dos sanitizantes pode ser alterada pelas características da superfície, pelo tempo e pela temperatura de contato, pela concentração de uso e pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, pelo pH, pelas propriedades físico-químicas da água e, ainda, por substâncias inativadoras. O tipo e a concentração de micro-organismos contaminantes da superfície também influenciam na eficiência do sanitizante (RUSSELL, 1999).

Conforme a Resolução nº 211 (BRASIL, 1999), as indústrias estão autorizadas a usar os desinfetantes em superfícies onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, podendo utilizar, exclusivamente, os princípios ativos dos grupos quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, iodo e derivados, biguanidas e peróxido de hidrogênio. O ácido peracético também está autorizado como desinfetante para uso na indústria alimentícia (BRASIL, 1993).

Existe uma grande variedade de sanitizantes químicos disponíveis, como, compostos clorados, compostos iodados, compostos de amônia quaternária, ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Outros compostos podem ser usados em formulações de sanitizantes, principalmente aldeídos (por exemplo, glutaraldeído), fenóis (por exemplo, triclosan), biguaninas (por exemplo, clorexidina) e álcoois. Há compostos orgânicos naturais como o extrato de semente “grapefruit” que também é usado como agente antimicrobiano. Todos esses agentes são quimicamente distintos, entretanto, alguns apresentam mecanismos similares de ação (ASSELT e GIFFEL, 2005).

### 2.8.1. Biguanida

Seguindo esta linha, o grupo das biguanidas vem sendo estudado como um potencial e versátil antimicrobiano desde 1879 na preservação de cosméticos, produtos farmacêuticos e principalmente como princípio ativo em formulações de desinfetantes e sanitizantes para diversas áreas de aplicação. Como exemplos primários destas biguanidas tem-se Clorexidina–biguanida monomérica (Figura 2a) e a bis (biguanida) ou biguanida polimérica (Figura 2 b).



**Figura 02:** Estrutura química da PHMB – Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (a) e da Clorexidina (b).

Fonte: FRANZIN, 2001.

Quando se constatou que esta bis(biguanida) tinha atividade bactericida muito superior às biguanidas monoméricas, os cientistas mostraram-se interessados em desenvolver as biguanidas poliméricas como agentes antimicrobianos, especialmente o Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) que atualmente é utilizado em diversas aplicações antimicrobianas devido ao seu amplo espectro de atuação no controle de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, vírus, micro-organismos resistentes à antibióticos, mesmo em condições adversas como: presença de matéria orgânica e água dura. O amplo espectro de ação do PHMB aliado à sua boa estabilidade térmica, baixa formação de espuma, alta solubilidade em água, baixa volatilidade e corrosividade somados aos estudos de toxicidade em mamíferos e ao meio ambiente, caracterizam o PHMB como um antimicrobiano de última geração, seguro, eficiente e versátil para formulação de desinfetantes de uso industrial, institucional e doméstico tornando-o uma opção de melhor custo benefício aos tradicionais antimicrobianos (FRANZIN, 2001).

O cloridrato de clorhexidina é um composto sintético. Quimicamente é o dicloridrato de 1,1-hexametil-enobis (p-clorofenil) biguanida. Tem reação alcalina, é levemente hidrossolúvel e relativamente atóxico. A clorhexidina é ativa contra diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas, e outros micro-organismos. Tem boa ação na presença de matéria orgânica (FRANZIN, 2001). Nas Tabelas 1, 2 e 3 é possível verificar a atividade antimicrobiana do PHMB no controle de diversos micro-organismos.

**Tabela 1:** Atividade antimicrobiana do PHMB sobre bactérias Gram negativas e concentrações recomendadas.

Micro-organismos	Referência	PHMB (ppm)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	8
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	20
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 11936	8
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	32
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	NCTC 12900	16
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NCTC 9528	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352	5
<i>Proteus mirabilis</i>	NCTC 10975	1
<i>Proteus vulgaris</i>	NCTC 4175	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25668	8
<i>Pseudomonas cepacia</i>	NCTC 10661	12
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525	31
<i>Pseudomonas putida</i>	-	8
<i>Salmonella Cholerasuis</i>	ATCC 13311	5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	24
<i>Salmonella Poona</i>	NCTC 4840	32
<i>Serratia marcescens</i>	NCTC 11935	32
<i>Vibrio cholerae Non 0:1</i>	NCTC 11348	0,5

Fonte: FRANZIN, 2001.

**Tabela 2:** Atividade antimicrobiana do PHMB sobre bactérias Gram positivas e *Bacillus* (esporos).

Micro-organismos	Referência	PHMB (ppm)
<i>Bacillus polymyxa</i>	-	2
<i>Clostridium welchii</i>	-	12
<i>Corynebacterium acnes</i>	-	3
<i>Enterococcus faecium</i>	NCIB 11508	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 775	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	6
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	NCIB 8548	2
<i>Staphylococcus albus</i>	-	0,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	6
<i>Staphylococcus epidermis</i>	ATCC 14990	2
<i>Staphylococcus faecalis</i>	-	1
<i>Staphylococcus lactis</i>	NCTC 7944	4
<i>Staphylococcus pyogenes</i>	-	6
<i>Bacillus subtilis</i>	-	1,6
<i>Bacillus cereus</i>	-	12,5
<i>Bacillus circulans</i>	-	2,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	3,1
<i>Bacillus coagulans</i>	-	2,5

**Tabela 3:** Atividade antimicrobiana do PHMB sobre bolores e leveduras.

Micro-organismos	Referência	PHMB (ppm)
<i>Aspergillus niger</i>	-	150
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	62
<i>Rhodotorula rubra</i>	NCYC 1659	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	62
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	5

Fonte: FRANZIN, 2001.

A clorhexidina demonstrou ser útil na desinfecção de equipamentos e instalações contaminadas, panos de limpeza do úbere e equipamentos de ordenha. Normalmente, a concentração recomendada é de 0,2% a 1% (RADOSTITS et al. 2000.).

A clorhexidina pertence ao grupo das biguanidas, e atualmente, o gluconato de clorhexidina, por ser mais solúvel, é a preparação mais utilizada. Sua ação é praticamente imediata, apresentando baixo potencial de toxicidade, bem como baixa irritabilidade (VICENTE e TOLEDO, 2003). Apresenta o mecanismo de ação semelhante ao do quaternário de amônio, com destruição parcial das membranas celulares e alteração dos equilíbrios de transporte metabólico (FUJIHARA e SYLVIO, 2003).

Conforme Aquino et al. (2003), o digluconato de clorhexidina é completamente solúvel em água. Pode ser inativado por precipitação com sais minerais, inclusive por aqueles que compõem a dureza da água. As soluções aquosas deste germicida, não possuem cor nem odor, mas têm pouco efeito de molhagem, por isso podem ser utilizados tensoativos catiônicos e não iônicos para melhorar esta característica.

O mecanismo de ação do PHMB vem sendo estudado por vários cientistas ao longo de décadas. Baseado no trabalho destes cientistas, a sequência bactericida começa com uma rápida atração do PHMB catiônico na superfície bacteriana negativamente carregada provocando uma falha no mecanismo de defesa da célula e a ruptura da parede da célula. O PHMB então é atraído para a membrana citoplasmática, onde causa a perda de substâncias de baixo peso molecular, tais como íons de Potássio, Cálcio e a inibição de enzimas responsáveis pela união da membrana, tais como o ATPase. A grande ruptura subsequente da membrana citoplasmática pode então levar à perda de substâncias macromoleculares (ex. Nucleotídeos) e à precipitação das substâncias celulares (FRANZIN, 2001).

O PHMB vem sendo estudado a décadas (ROSENTHAL et al., 1982) como ingrediente ativo em formulações de desinfetantes para indústrias alimentícias, possuindo uma excelente atividade no controle de micro-organismos patogênicos, tais como, *E. coli*, *S. aureus* e *P.*

*aeruginosas* bem como endoesporos de bactérias termoresistentes (*Bacillus* sp.). Seu amplo espectro de ação na presença de matéria orgânica (leite, sangue, albumina, etc) aliado a baixa toxicidade em mamíferos, baixa corrosividade e formação de espuma garantem ao PHMB um melhor custo benefício quando comparado aos tradicionais desinfetantes à base de quaternário de amônio.

Desinfetantes contendo PHMB podem ser utilizados na desinfecção de equipamentos, pisos, paredes em sistemas abertos ou CIP (clean-in-place) através de aplicação manual, imersão ou recirculação seguida de enxague com água potável conforme “Resolução nº 211/MS/ANVISA, de 18 de Junho de 1999 publicada no D.O.U em 26 de Junho de 1999” (Brasil, 1999).

A alta solubilidade do PHMB em água permite formulações límpidas e transparentes mesmo em condições extremamente alcalinas ou ácidas desde que observadas algumas orientações básicas. Desinfetantes ácidos e alcalinos (pH entre 4 a 13) transparentes podem ser obtidos com a utilização de diversos tipos de ácidos e bases desde que respeitando alguns procedimentos de adição (FRANZIN, 2001).

### **2.8.2. Ácido Peracético**

O peróxido do ácido acético, chamado de ácido peroxiacético ou peracético, é produzido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com peróxido de hidrogênio na sulfúrico, tem a função de catalisador. No entanto, um agente estabilizador, ou um sequestrante, é adicionado durante a produção do produto (KITIS, 2004). É um composto instável, que sofre perda de 1% a 2% dos ingredientes ativos por mês, na solução a 40% e mais da metade em 6 dias, na solução 1% (NASCIMENTO et al., 2003). É um agente antimicrobiano mais eficiente do que o peróxido de hidrogênio sendo ativo contra um grande espectro de micro-organismos. É esporicida em baixas temperaturas e permanece ativo na presença de matéria orgânica (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

O modo de ação do peróxido de hidrogênio e do ácido peracético é baseado na oxidação do radical livre (por exemplo, radicais hidroxilas) de componentes essenciais da célula, tais como, lipídios, proteínas e DNA. O ácido peracético não somente ataca as proteínas da parede celular, mas também migram dentro da célula, e da mesma forma, rompem componentes internos da célula (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

Dentre as vantagens do ácido peracético, verificam-se que são excelentes sanitizantes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus esporos

bacterianos. O APA apresenta facilidade de implementação de tratamento; largo espectro de atividade, mesmo na presença de matéria orgânica heterogênea; ausência de residual ou subprodutos tóxicos e, ou, mutagênicos; desnecessária descloração; baixa dependência do pH; curto tempo de contato; baixo impacto ambiental e tem sido o mais ativo contra os biofilmes (SOUZA e DANIEL, 2005).

Segundo Baldry (1983), a rápida atividade do ácido peracético contra uma variedade de micro-organismos é o mérito deste princípio ativo podendo ser utilizado como um desinfetante ou esterilizante. Além do mais, este sanitizante parece ser um dos mais efetivos para proteção contra biofilmes (MARRIOT e GRAVANI, 2006). A grande capacidade de oxidação dos componentes celulares torna o ácido peracético um excelente sanitizante, pois o oxigênio liberado pelo peróxido reage imediatamente com os sistemas enzimáticos inativando-os (AQUINO et al., 2003).

O ácido peracético é decomposto a elementos inofensivos, resultando apenas em traços de água e ácido acético. Para desinfecção aplica-se até a temperatura máxima de 50-60°C que evita a decomposição do princípio ativo. A temperatura mais comum de aplicação está entre 5-35°C (MASSAGUER, 2006)

É amplamente usado na desinfecção de linhas de processamento, tubulações, superfícies, evaporadores, e nos pontos de contato com os alimentos. A forte característica oxidativa possibilita a remoção da sujidade e boa parte dos biofilmes. Em indústrias de alimentos e de papel e celulose, é um excelente auxiliar na deslignificação. Esta vantagem pode se tornar desvantagem se o produto (principalmente em concentrações muito elevadas) for colocado em contato com materiais sensíveis à oxidação como no caso de polímeros, resinas de troca iônica e outros materiais. Outra vantagem apresentada pelo ácido peracético é a sua baixa toxicidade após a aplicação e enxágüe. Esta vantagem pode se tornar uma desvantagem se cuidados devidos não forem tomados com reciclagem de antimicrobianos. Isto ocorre porque a desinfecção é realizada principalmente pela ação do peróxido, e a ação residual é devido à redução de pH (pelo ácido acético) (MASSAGUER, 2006).

## **2.9. Água Quente**

Em Brasil 2005 (Circular 175/2005), a higienização dos instrumentos de trabalho será precedida de lavagem dos mesmos e far-se-á em esterilizadores com temperatura mínima de 82,2 °C (180 °F), por um tempo mínimo de 15 segundos. Da mesma forma, ganchos utilizados no

abate, como os que prestam para pendurar cabeça, devem ser higienizados nas mesmas circunstâncias.

Mais eficiente e funcional que os esterilizadores móveis da desossa é a central de esterilização anexa ao setor, pois permite a troca de facas de cabo de cores diferentes a períodos regulares, a não geração de vapor em sala com temperatura controlada e garantia de que os citados instrumentos são corretamente higienizados.

O uso da água quente está baseado em seu efeito destrutivo sobre os micro-organismos. Porém há diversos fatores que afetam a resistência dos micro-organismos ao calor, a mesma concentração de bactérias em caldo nutriente e em solução fisiológica, com o mesmo pH, não é destruída com a mesma facilidade pelo calor. As células microbianas tem sua resistência aumentada com o decréscimo da umidade ou atividade de água. Na presença de gorduras, existe aumento da resistência de alguns micro-organismos ao calor (JAY 2005).

O efeito dos sais é variável e depende da concentração e do tipo, mas também possui efeito protetor na maioria das vezes sendo que em outros casos torna as células mais sensíveis ao calor. Assim também o pH, e a presença de açúcares e proteínas no meio de suspensão causam aumento na resistência do micro-organismo ao calor. O número de micro-organismos não é menos importante, afinal quanto maior o número de micro-organismos, mais alto o grau de resistência ao calor, muito provavelmente devido a excreção de substâncias protetoras pelas células.

## **2.10. Ultrassom**

Conforme Willians (1990), são vastas as aplicações de ondas de ultrassom, que vão desde homogeneização de substâncias, rompimento de células, extração de produtos fitoquímicos, esterilização de equipamentos, localização de mineral, emulsificação, até degradação de massa molar e fonoforese (ação do ultra-som para facilitar a penetração de agentes farmacologicamente ativos através da pele).

Segundo Fontana (1996), o efeito do ultrassom na área biológica, pode ocorrer devido ao poder da alta potência de radiação, que podem deslocar, distorcer e/ou reorientar partículas intercelulares ou mesmo células com relação a suas configurações normais. Tais efeitos estão associados a grandes tensões hidrodinâmicas suficientes para causar danos às células e macrocélulas suspensas. Além disso, o ultrassom desenvolve o processo biofísico da cavitação que vem sendo considerado como um dos principais mecanismos que afetam a atividade

germicida em meio líquido.

Segundo Guirro (1999), a cavitação gerada pelo ultrassom pode induzir fenômenos elétricos e químicos e destruição mecânica. Isto acontece quando neste último as cavidades se colapsam ou quando as bolhas de gás crescem, até ficarem suficientemente grandes para vibrar em ressonância com as ondas sonoras. A cavitação produz intensas ondas de choque, aumentos instantâneos de temperatura e pressão, e efeitos químicos no meio, que são gerados pelo colapso das cavidades ou microbolhas. As células de *E. coli* BH 100, irradiadas com ondas de ultrassom revelaram no plaqueamento, diminuição do número de colônias na frequência de 1MHz, nos tempos de irradiação de 5 e 15 minutos. Para a frequência de 3MHz houve incremento das colônias, nos mesmos tempos. Os ensaios indicam que na relação número de colônias em função do tempo considerando 5 e 15 minutos, houve maior inibição no tempo de 15 minutos.

Estudos associando o ultrassom na frequência de 1MHz com tetraciclina em função do tempo de 5 e 15 minutos, apresentaram diminuição do número de colônias no tempo de 5 minutos e inibição total do crescimento no tempo de 15 minutos (GUIRRO, 1999).

Barbosa e Serra (1992), citam que no final dos anos 70, o interesse pela sonoquímica ressurgiu devido em grande parte, aos resultados provenientes de tentativas de se entender o fenômeno. O efeito das ondas ultra-sônicas começou a ser observado em sistemas homogêneos não aquosos. Nesta época, as pesquisas começaram a serem orientadas para sistemas heterogêneos. Em sistemas heterogêneos, numa interface sólido-líquido, o ultrassom pode dirigir-se para a superfície originando uma erosão localizada, responsável pela fadiga na extremidade do transdutor. Com o aumento do emprego do ultrassom, foram constatados fenômenos tais como rompimento de células vivas, dispersão de tecidos biológicos e limpeza de superfícies.

Além disso, Barbosa e Serra (1992), citam que no processo de cavitação gerado por ondas de ultrassom pode haver formação de dois tipos de bolhas:

- Bolhas de cavitação estáveis: que oscilam periodicamente no meio e possuem tempo de vida longa de alguns ciclos. Seu volume cresce por penetração de gás dissolvido no meio quando na fase de descompressão. Se atingirem uma dimensão crítica podem tornar-se transitórias;

- Bolhas de cavitação transitórias: possuem tempo de vida curto de poucos ciclos. Seu volume cresce por penetração do gás dissolvido na fase de descompressão, quando alcançam uma dimensão crítica. São as responsáveis pela cavitação. No momento da implosão das bolhas há formação de ondas de choque e na fase final esperam-se no centro da bolha, temperatura e pressão muito elevadas da ordem de aproximadamente 10.000K e 1000 atm.

Para Lin e Zhang (2000), o ultrassom com alta potência (em torno de frequência de 3MHz) é um meio tradicional de várias aplicações e que durante décadas passadas sendo utilizado na indústria eletrônica e outros diferentes campos. Cada vez mais tem-se dado atenção a algumas aplicações como limpeza ultra-sônica, soldagem ultra-sônica de plásticos, avaliação da qualidade de metais fundidos, assim como para novas aplicações do ultra-som alta potência, como química de ultrassom e terapia ultrassônica. No caso da energia de aplicação do ultrassom de alta potência, as características de vibração do transdutor usado são essenciais para modelo e segurança de trabalho do sistema vibracional. A medida das características vibracionais do transdutor é importante para avaliação da sua performance, assim como do processo prático do transdutor utilizado.

As características da alta potência do transdutor incluem o sistema fechado acústico, a eficiência eletroacústica, a elevação da temperatura do deslocamento da distribuição vibracional, e outros fatores. Como essas características do transdutor sob as condições de alta potência afetam a performance do transdutor e do efeito do processo ultrassônico, um trabalho mais acentuado tem sido feito para análise e melhoria do modelo do sistema vibracional.

Segundo Phull et al. (1997), a destruição ou inativação de micro-organismos por aplicação de ondas ultra-sônicas foi estudada e os resultados obtidos nos ensaios mostraram que o ultrassom pode ser utilizado com eficácia na desinfecção de águas. O processo de ultrassom pode ser aplicado em associação com cloro o que promove uma diminuição acentuada no número de bactérias presentes na água, além de diminuir significativamente a quantidade de cloro necessária para a desinfecção. Neste estudo, os pesquisadores concluíram que aumentando o poder do ultrassom aumenta a destruição das células bacterianas e que as ondas do ultrassom de alta frequência (a nível de MHz) são mais eficazes do que as de baixa frequência (a nível de KHz) com relação ao processo de desinfecção de água.

Tomasin (2001) relata que o ultrassom de 20 KHz quando aplicado em condições controladas de laboratório mostra diminuição da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*. A eficiência do ultrassom aumenta com o tempo de exposição aos efeitos das ondas acústicas e da cavitação sobre as células. O ultrassom pode ser utilizado como um método para controle da viabilidade de micro-organismos em resíduos aquosos e sanitização de águas contaminadas.

Segundo Margulis (2002), a causa da eletrificação local está relacionada com a fragmentação das bolhas decorrente do processo de cavitação e também pela própria deformação das mesmas. A ruptura das bolhas na cavitação está relacionada com a tensão superficial,

vibração das bolhas, força de Stokes e forças eletrostáticas. O problema das cargas não compensadas na superfície das bolhas deformadas pela cavitação é apresentado numa nova visão: a deformação radial é devida à rotação parabólica /deformação axial e à cavidade hiperbólica de rotação. A explanação dos efeitos físicos e físico-químicos da cavitação é proposta em função da teoria elétrica e em particular da eletrificação local da cavitação de bolhas. A teoria da eletrificação local é uma teoria simples que correlaciona a maioria dos fatos experimentais da cavitação.

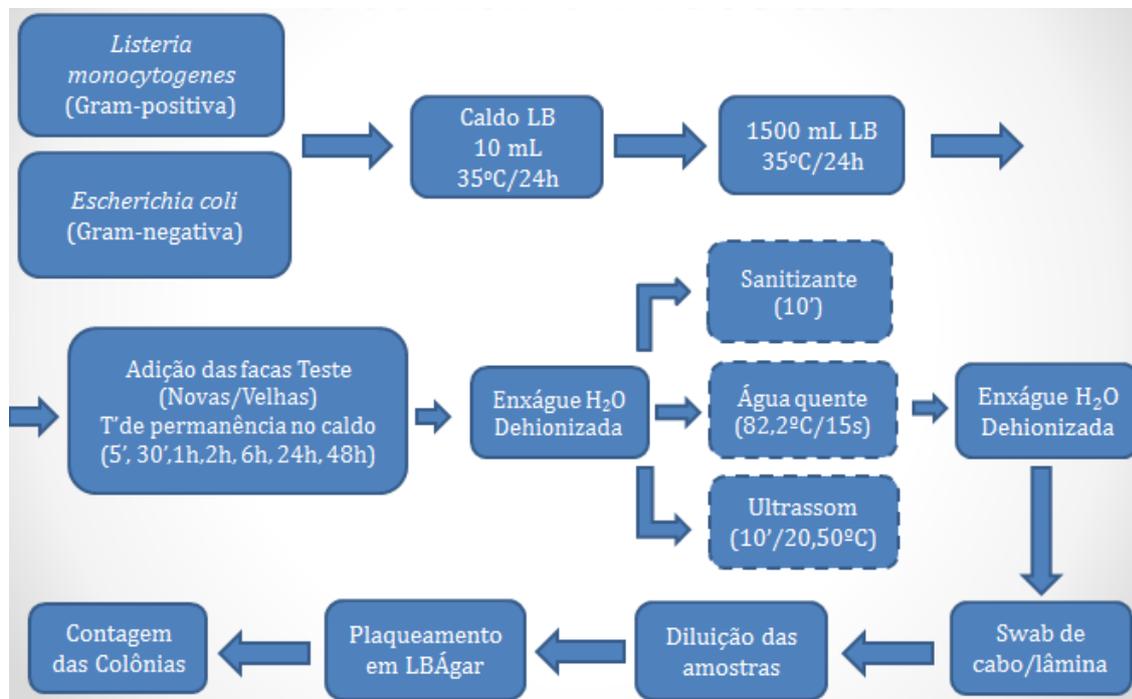
### **2.11. Considerações Finais a respeito do estudo**

As doenças de origem alimentar são transmitidas ao homem através dos alimentos consumidos. Porém a evolução tecnológica está permitindo avanços no sentido da conscientização e desenvolvimento de técnicas e metodologias que permitem evitar que essas doenças continuem causando transtornos a população.

A pesquisa tem por objetivo maior contribuir para que esta avanço tenha base técnica e possa ser difundido entre indústrias produtoras de alimentos e insumos de forma a elucidar lacunas voltadas ao controle das contaminações em superfícies que entram em contato direto com o alimento que está sendo produzido.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar a visualização, os procedimentos utilizados neste trabalho, e descritos nos itens de material e métodos foram compilados na Figura 03.

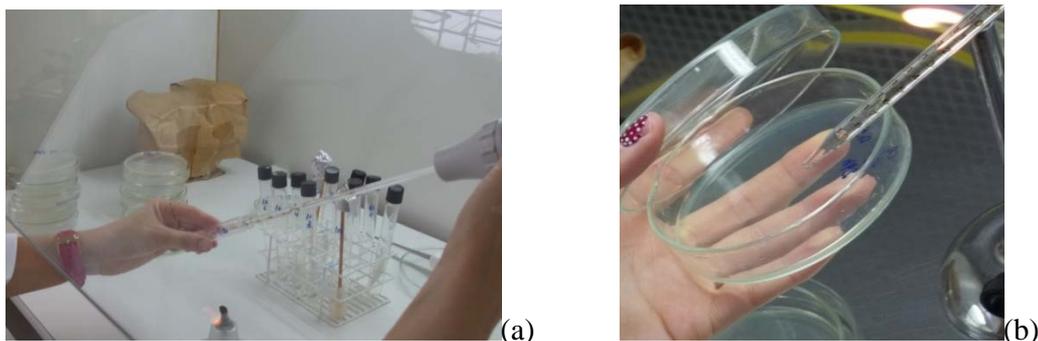


**Figura 03:** Esquema de realização das análises

#### 3.1. Micro-organismos e meios de cultura utilizados

Foram utilizadas a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) da biblioteca de cepas do laboratório de Biotecnologia da URI Erechim. As cepas foram descongeladas e repicadas em Caldo Luria Bertani - LB (triptona 10,0g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5,0g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5,0g.L<sup>-1</sup>) e mantidas a 4°C até o momento do subcultivo.

Para efetuar as diluições antes do plaqueamento foi utilizado água peptonada (peptona 10,0g.L<sup>-1</sup>, fosfato de hidrogênio 9,0g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5,0g.L<sup>-1</sup>, fosfato de potássio 1,5g.L<sup>-1</sup>) e para plaqueamentos de superfícies foi utilizado Ágar Luria Bertani - LBA (triptona 10,0g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura 5,0g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5,0g.L<sup>-1</sup>, Ágar 15,0g.L<sup>-1</sup>) (Figura 04a e 04b).



**Figura 04:** Sistema de diluição das amostras (a) e plaqueamento em superfície em LB ágar (b).

### **3.2. Avaliação da adesão dos micro-organismos *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em facas de desossa**

Para este estudo foram empregadas as bactérias *E. coli* (Gram-negativa) e *L. monocytogenes* (Gram-positiva). Para a avaliação da adesão bacteriana foram selecionadas as facas de desossa comumente utilizadas em matadouro frigorífico de bovinos. Foram utilizadas facas de desossa da linha profissional da marca Mundial® modelo 5315-6 novas e usadas (com tempo de uso de 45 a 60 dias) de cabos brancos e amarelos utilizadas na desossa de bovinos conforme a indicação original do fabricante. As facas novas foram obtidas por doação do fabricante e as usadas foram doadas por um frigorífico que desossa bovinos regularmente. As dimensões do cabo são 130 cm<sup>2</sup> e da lâmina 52 cm<sup>2</sup>. A preparação das facas para início das análises ocorreu da seguinte forma: primeiramente através de limpeza por meio de esfregação empregando-se água e detergente neutro líquido, enxágue com água corrente seguida por água destilada e secagem em câmara de secagem de material de laboratório. As superfícies foram expostas a luz ultravioleta (254nm), por 1 hora para sanitização conforme metodologia descrita por Parizzi, (1999) (Figura 05).



**Figura 05:** Facas em secagem na câmara de secagem de materiais do laboratório.

As facas foram imersas, com auxílio de uma pinça esterilizada, em fluxo laminar, em frascos desenvolvidos para tal procedimento conforme apresentado na Figura 06. Uma vez que as facas deviam ficar totalmente cobertas pelo caldo, foram adicionados 1500 mL de caldo LB acrescido de um volume de suspensão de células bacterianas (10 mL/LB), previamente incubadas e em franco desenvolvimento. Para isso, a estirpe da bactéria foi previamente semeada em caldo LB e incubadas a 35-37°C, por 24 horas.



**Figura 06:** Aparato experimental empregado para incubar as facas em caldo LB a 35-37°C/24 h.

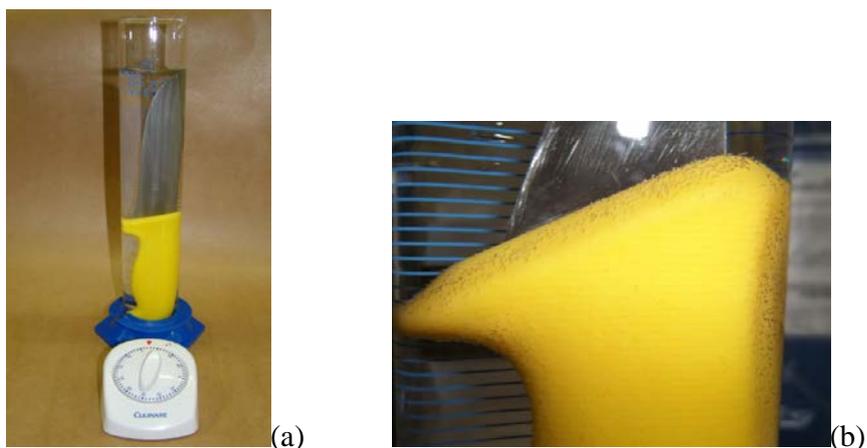
Após a incubação as facas foram retiradas do tubo com pinça estéril, realizado enxágue com água deionizada e em seguida realizado Swab de toda área de cabo e lâmina separadamente. Destes foram realizadas diluições em água peptonada para realizar plaqueamento em superfície em placas contendo agar LB que foram incubadas a 35-37°C por 24h, seguido por contagem das colônias. Após a contagem realizou-se a transformação dos valores para Log UFC/cm<sup>2</sup> para facilitar a visualização dos resultados.

As avaliações da quantidade de células aderidas por centímetro quadrado foram realizadas, em cada superfície (lamina e cabo), sendo um teste para facas novas e outro para facas usadas. As avaliações da quantidade de células aderidas por centímetro quadrado foram realizadas durante 48 horas (0,1; 0,5; 1; 2; 6; 24 e 48 h) de contato, em cada superfície. Estes tempos foram selecionados visando simular o tempo de produção em um planta industrial, onde as facas permanecem em contato com os produtos cárneos sem higienização. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.3. Avaliação da remoção dos micro-organismos

#### 3.3.1. Remoção empregando sanitizantes

Para remoção dos micro-organismos, as facas foram retiradas do tubo com pinça estéril. Após a incubação com cada micro-organismo teste, foi realizado enxágue com água deionizada, sendo em seguida imersas em provetas contendo 500 mL de solução sanitizante a base de Biguanida (Pluron 463 AP<sup>®</sup>) ou ácido peracético (Pluron 461 A/1) em diferentes concentrações: controle; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0% (v/v), onde a faca permaneceu durante 10 minutos de exposição, conforme recomendação do fabricante (Figura 07).



**Figura 07:** Aparato empregado para a remoção dos micro-organismos em facas novas e usadas empregadas na indústria de alimentos (a) e detalhe da atuação do sanitizante na remoção dos biofilmes bacterianos (b), respectivamente.

#### 3.3.2. Remoção empregando água quente

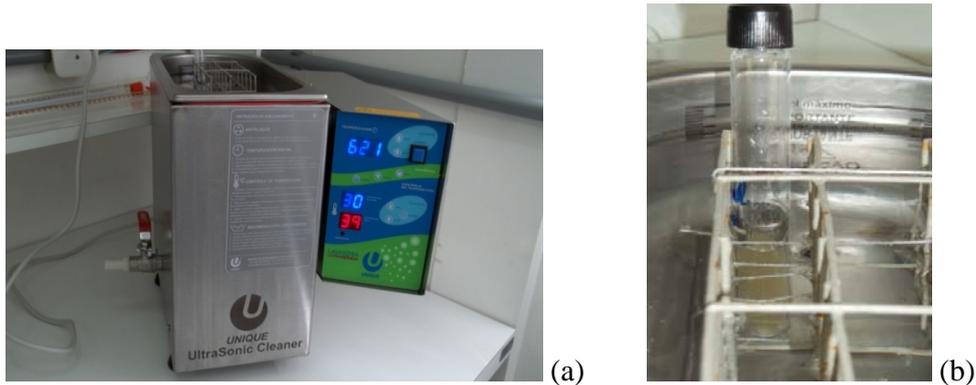
As facas contaminadas também foram submetidas à remoção dos micro-organismos pela imersão em banho-maria, onde a faca ficou totalmente coberta por água quente (82,2°C) por 15 segundos (Figura 8) conforme preconizado na Circular 175/2005/MAPA (Brasil, 2005).



**Figura 08:** Facas submetidas à remoção dos micro-organismos em água quente (82,2°C/15seg).

### 3.3.3. Remoção ultrassom

Para testes com o aparelho de ultrassom (Unique, ULTRASONIC 2500) foi realizado um estudo preliminar, onde as bactérias foram incubadas em Caldo LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 5 g/L) em tubos de ensaio por 24 horas a 35-37°C. Em seguida, 10 mL de cada um dos inoculo foram submetidos ao banho de ultrassom por controle, 10 e 60 minutos, com potência nominal de 155 Watts e frequência ultrassônica de 40kHz, com temperatura da água de 38°C (Figura 09).



**Figura 09:** Aparelho de Ultra-Som utilizado nos experimentos de remoção de micro-organismos (a) e os tubo de ensaio contendo micro-organismo submetido ao banho de ultrassom (b), respectivamente.

Posteriormente, avaliou-se a remoção dos micro-organismos nas facas novas e usadas. Para este estudo empregou-se, também, um banho de ultrassom, com potência nominal de 155w e frequência ultrassônica de 40kHz, com temperatura da água de 50°C por 10 minutos de exposição (Figura 10).



**Figura 10:** Facas novas e usadas em processo de remoção dos micro-organismos aderidos em banho de ultrassom.

De cada um dos tempos de exposição ao ultrassom foi realizado o plaqueamento em superfície em meio LB ágar em diferentes diluições e incubados por 24 horas a 35-37°C, para posterior contagem das colônias e verificação da possível redução no número de unidades formadoras de colônias viáveis. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Todos os experimentos foram conduzidos de maneira que a água contida nas imersões foi substituída em cada tempo de contato, para verificar a eficiência deste método na eliminação dos micro-organismos. Após cada ensaio as provetas e os banhos (água quente e ultrassom) foram higienizados com água e detergente neutro, sanitizado com hipoclorito de sódio 2% (v/v) e enxaguado com água deionizada.

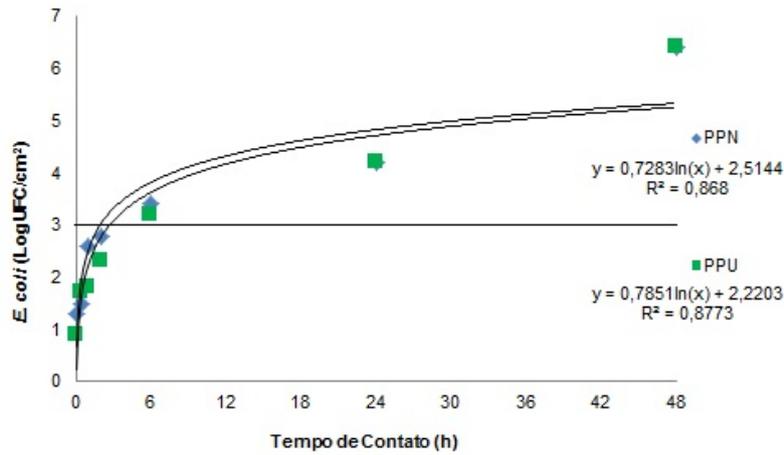
#### **3.4. Contagem padrão em placas**

A avaliação da adesão bacteriana e da remoção dos micro-organismos foi avaliada pela técnica da contagem padrão em placas (CPP), onde foram realizados swabs nas superfícies de cada um dos tempos e concentrações de sanitizante e/ou banho estudados. O plaqueamento em superfície foi realizado em meio LB ágar e incubação por 24 horas a 35-37°C, de diferentes diluições, para posterior contagem das colônias e verificação da possível redução no número de unidades formadoras de colônias viáveis. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados encontram-se expressos em Log UFC/cm<sup>-2</sup>.

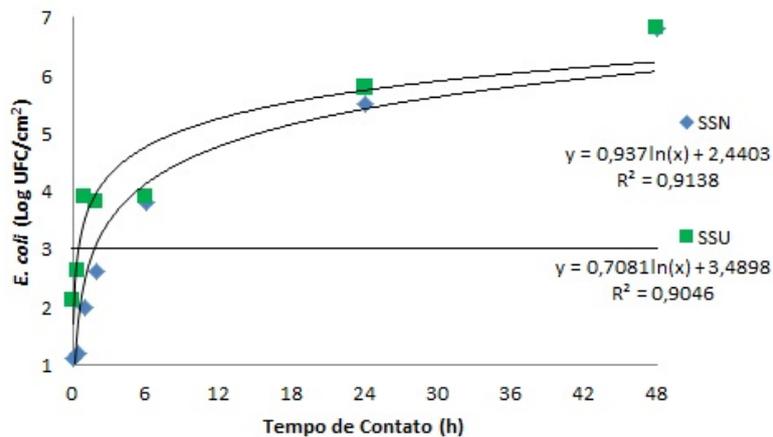
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Adesão de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em facas de desossa pela contagem padrão em placas

A cinética de adesão de *Escherichia coli* em cabos e lâminas de facas de desossa estão apresentados na Figura 11.



A



B

**Figura 11:** Cinética de adesão de *Escherichia coli* em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) (A) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas) (B). (Formação de Biofilme com 3,0 Log UFC/cm<sup>2</sup>).

É possível verificar que a adesão ocorreu de forma logarítmica em cabos e lâminas, sendo que observa-se uma maior velocidade de adesão de *E. coli* no aço inox usado (SSU) ( $b = 0,708$ ) em relação ao novo (SSN) ( $b = 0,937$ ). Nos cabos a velocidade de adesão entre cabos

novos (PPN) e usados (PPU) foi semelhante, com valores de b de 0,728 e 0,785, respectivamente. Isso pode ter ocorrido em função da cobertura Sanitized<sup>®</sup> presente nos cabos das facas utilizadas, que reduziram a adesão nestes.

A maior adesão de *E. coli* ocorreu na superfície de inox (SS) e a menor em polipropileno (PP), obtendo-se 6,8 e 6,4 Log UFC/cm<sup>2</sup> após 48 horas de contato com o micro-organismo (Tabela 4), respectivamente.

**Tabela 4:** Média de adesão de *Escherichia coli* (Log UFC/cm<sup>2</sup>) em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas).

Superfície	Tempo de contato (horas)						
	0,1	0,5	1	2	6	24	48
PPN	1,3	1,5	2,6	2,8	3,4	4,2	6,4
PPU	0,9	1,7	1,8	2,3	3,2	4,2	6,4
SSN	1,1	1,2	2,0	2,6	3,8	5,5	6,8
SSU	2,1	2,6	3,9	3,8	3,9	5,8	6,8

As facas utilizadas para o experimento são da marca comercial Mundial<sup>®</sup> que apresentam algumas peculiaridades que explicam a adesão diferenciada das bactérias em suas superfícies. Os cabos são injetados em polipropileno virgem diretamente sobre a lâmina impedindo formação de frestas e absorção de umidade, juntamente com este material é injetado um aditivo antimicrobiano chamado comercialmente de sanitized<sup>®</sup>, cuja função é inibir o crescimento de fungos e bactérias (Conforme testes OECD 404 e 406, autorização FDA, 2002/72 EEC, 2002/17 EEC). O aço inox é de uma liga especial, cuja composição química não se enquadra na classificação americana denominada AISI 304 ou 316, é composto por carbono, cromo, molibdênio, manganês, titânio, etc., correspondendo a classificação alemã denominada DIN 1.4116/X45CrMoV15, que trata-se de um aço de baixa liga ou aço magnético/martensítico composto de 14 a 14,5 % de cromo e 0,5 a 0,55% de molibdênio sem níquel, produzido especialmente para cutelaria profissional e contato com alimentos. A presença de molibdênio (material que não está presente no inox AISI 304) confere grande resistência à corrosão facilitando o uso de sanitizantes como ácido peracético.

Ronner e Wong (1993) consideraram como biofilme um número de  $1 \times 10^3$  UFC ou 3,0 log UFC de células aderidas por centímetro quadrado. Assim, segundo o critério desses autores, na superfície de polietileno (Tabela 4) formou-se biofilme após um tempo de contato de 6 horas,

enquanto para as superfícies de inox, observou-se a formação de biofilme em apenas 1 hora de contato para lâminas de inox usadas (SSU) e 6 horas de tempo de contato para lâminas novas (SSN). Entretanto, Wirtanen et al. (1996) e Andrade et al. (1998b) afirmaram ser necessária uma população de células de  $10^5$  e  $10^7$  células por  $\text{cm}^2$ , respectivamente. Então, de acordo com Wirtanen et al. (1996) na superfície de polietileno não foi formado biofilme em até 24 horas de contato. Porém, para as duas superfícies de inox houve a formação de biofilmes com 24 horas de tempo de contato. Entretanto quando se trata de utensílios (facas de desossa), dificilmente se trabalha mais do que 6 a 8 horas sem intervalo ou troca de turno, o que se subentende a higienização e esterilização e/ou sanitização dos equipamentos. Neste caso, significa dizer que há uma boa condição de trabalho em turnos se houver a higienização adequada dos equipamentos durante a troca de turnos e não haverá formação de biofilmes. Conforme os autores, esse intervalo para higienização e “quebra” do ciclo de formação do biofilme, fica em 6 horas no caso das facas, levando-se em consideração cabos e lâminas.

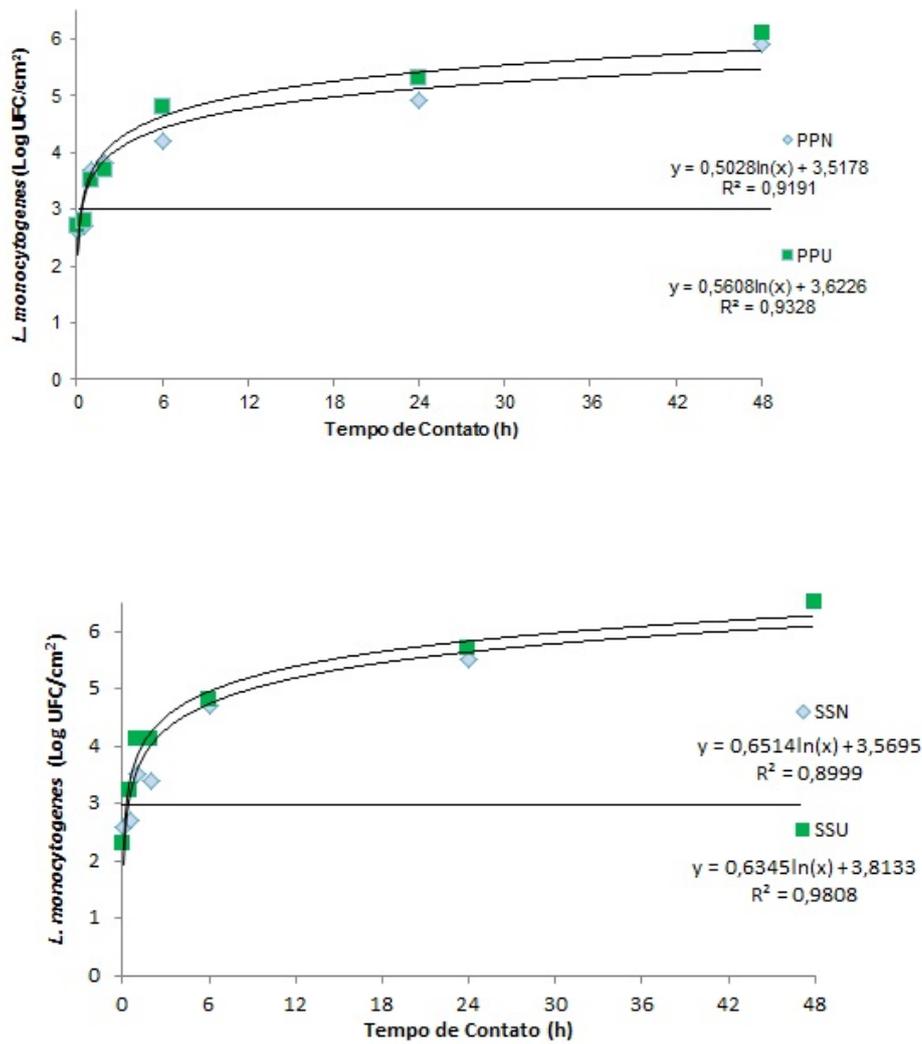
A Figura 11 mostra a tendência que a bactéria apresentou em aderir à superfície em relação ao tempo de contato. Isto pode ser explicado pelo fato de que muitas bactérias Gram-negativas regulam a expressão de alguns genes em resposta à densidade populacional por meio de N-acil-homoserinas lactonas em um mecanismo chamado “quorum sensing”. Além disso, *E. coli* possui um outro sinal regulatório global, chamado de autoindutor 2 (furanosil borato diéster) que regula mais de 400 genes, mostrando a possível relação do “quorum sensing” com a etapa inicial de formação do biofilme (VIANA, 2006). Esses dados mostram a importância dos procedimentos de higienização nas superfícies que entram em contato com alimentos, pois se constatou que a formação de biofilmes pode ocorrer em um curto espaço de tempo, o que mostra a necessidade de se realizar uma boa higienização nas superfícies e equipamentos ao longo do processamento do alimento.

Zaqueus et al. (2000) constataram que a formação de biofilme bacteriano em superfícies de PVC, polietileno e aço inoxidável expostos à água ozonizada foram muito similares. Entretanto, o número de células aderidas foi um pouco mais alto em PVC do que em polietileno.

Bactérias e outros micro-organismos têm tendência natural de aderir a superfícies como mecanismo de sobrevivência. No entanto, a colonização bacteriana a superfícies sólidas tem sido descrita como estratégia básica e natural em uma variedade de ambientes (CAPPELLO e GUGLIELMINO, 2006). A adesão de bactérias à superfície depende de parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e relacionados ao material. Portanto, a topografia da superfície tem sido largamente estudada, uma vez que micro-organismos alocados em ranhuras

ou fendas podem escapar de procedimentos de limpeza e desinfecção, e, posteriormente, podem vir a contaminar ou a recontaminar produtos alimentícios durante o processamento (HILBERT et al., 2003).

A Figura 12 apresenta as cinéticas de adesão de *Listeria monocytogenes* em cabos e lâminas de facas de desossa. A adesão ocorreu de forma logarítmica em cabos e lâminas mas, diferentemente do observado com *E. coli*, as velocidades de adesão são semelhantes entre os materiais novos e usados, tanto para cabos (PPN = 0,502 e PPU = 0,560) como para lâminas (SSN = 0,651 e SSU = 0,634).



**Figura 12:** Cinética de adesão de *Listeria monocytogenes* em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) (A) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas) (B). (Formação de Biofilme com 3,0 Log UFC/cm<sup>2</sup>).

Avaliando a adesão do micro-organismo *Listeria monocytogenes* (Tabela 5), é possível observar que inicialmente as contagens são superiores a 2,0 Log UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto que com *E. coli* (Tabela 4) isto só ocorreu em inox usado. O que indica maior poder de adesão por parte do micro-organismo Gram-positivo.

**Tabela 5:** Média de adesão de *Listeria monocytogenes* em Log UFC/cm<sup>2</sup> em cabos de polipropileno (PPN = novos; PPU = usados) e lâminas de aço inox (SSN = novas; SSU = usadas).

Superfície	Tempo de contato (horas)						
	0,1	0,5	1	2	6	24	48
PPN	2,6	2,7	3,7	3,8	4,2	4,9	5,9
PPU	2,7	2,8	3,5	3,7	4,8	5,3	6,1
SSN	2,6	2,7	3,5	3,4	4,7	5,5	6,7
SSU	2,3	3,2	4,1	4,1	4,8	5,7	6,5

A *L. monocytogenes* apresentou maior capacidade de aderência ao inox (SS) em relação ao cabo (PP) (Tabela 5) a partir de 6 horas de contato para facas novas e 24 horas de contato para facas velhas. Isto pode estar relacionado as condições características da bactéria. A presença de flagelos e conseqüentemente mobilidade foi demonstrada por Saá et al. (2009), como fator determinante para a adesão inicial.

Nas primeiras horas de contato observou-se pequena variação da adesão de *L. monocytogenes* entre facas novas e velhas, resultado semelhante ao encontrado por Kalmokoff et al. (2001). As características do meio de cultura também podem ter contribuído para que os valores de adesão de *L. monocytogenes* fossem maiores que os valores iniciais de *E. coli*. Oulahal et al. (2008), analisaram a capacidade de aderência de *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável, utilizando como substrato leite desnatado pasteurizado, leite cru e coalho de queijo, incubados a 12 °C e 25 °C, durante 8 dias. Observaram diferenças de adesão em função do micro-organismo, com maior adesão de *L. innocua* em relação a *S. aureus*, em função da temperatura, com maior adesão a 12 °C, e também relacionado ao substrato utilizado.

Em comparação com a adesão de *E. coli*, a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* ocorreu após 1 hora de contato para os cabos (PP), a partir de 30 minutos para inox usado e 1 hora para inox novo (SSN), usando o padrão mais rigoroso para a formação de biofilmes

(RONNER e WONG, 1993), corroborando com a literatura com relação a facilidade do inox em permitir a adesão de células bacterianas e permitir a formação de biofilmes.

Segundo Song e Leff (2006), fatores ambientais, como concentração eletrolítica e composição do meio, têm importante impacto na formação do biofilme. Interações eletrostáticas contribuem para coesão do biofilme e cátions são "cross-linkers" (permitem fazer ligações cruzadas, tornando a matriz do biofilme forte e resistente) significantes da matriz do biofilme, pois contribuem para integridade e estabilidade da membrana externa da bactéria e propriedades de lipopolissacarídeos. Cátions bivalentes, como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , podem influenciar diretamente na formação do biofilme por meio de seus efeitos na interação eletrostática e, indiretamente, no processo de aderência dependente da fisiologia, por agir como importantes cátions celulares e cofatores enzimáticos.

Utilizando a abordagem de Van Oss et al. (1989), é possível determinar o grau de hidrofobicidade absoluta de qualquer substância vis-a-vis água (w), que pode ser precisamente expresso em unidades SI aplicáveis. De acordo com este critério, *L. monocytogenes* é hidrofílica e os materiais, polietileno e inox, são hidrofóbicos. É bem conhecido que a rugosidade da superfície impede procedimentos de higiene e limpeza.

O parâmetro mais comum utilizado para definir a rugosidade da superfície é *Ra* e é do conhecimento geral que um aumento no valor de superfície *Ra* irá causar um aumento correspondente na retenção microbiana em sua superfície (WHITEHEAD et al., 2004). Isto tem sido confirmado pela literatura (VERRAN et al., 1991; TEBBS et al., 1994), que mostram que a maior extensão de adesão ocorre em superfícies com valores de *Ra* que variam de 1,12 a 1,29  $\mu m$ . Este aumento da adesão pode ser devido a proteção que as células apresentam por nichos microscópicos. Segundo Flint et al. (1997), valores *Ra* de 0,8  $\mu m$  ou menos são geralmente utilizados para descrever uma superfície higiênica. Segundo estudos de Teixeira et al. (2008) os valores de *Ra*, para o polietileno novo e usado comprovam os resultados encontrados no presente trabalho em relação ao número de células aderidas (Tabelas 4 e 5). Segundo ele todos os materiais testados são superfícies higiênicas, porém o inox (SS) é o material com a mais elevada rugosidade de superfície, com um valor muito superior de *Ra* que o polietileno, embora os testes realizados pelo autor tenham sido com inox do tipo AISI 304 de composição diferente, e o que foi utilizado no estudo das facas Mundial® é composto por liga específica, sendo mais indicado para o contato direto com alimentos. Estudos de Flach (2006) para a hidrofobicidade de materiais, confirmam estes dados, sendo o vidro, o polipropileno e o inox classificados quanto a capacidade de adesão em ordem crescente.

Explorando os fatores de adesão de *L. monocytogenes* (o primeiro evento quando as células bacterianas entram em contacto com uma superfície sólida), Palmer et al. (2007) concluíram que "a sua superfície celular é um processo dinâmico". Isso poderia explicar os resultados conflitantes observados quando se estuda o impacto dos seguintes fatores na superfície de colonização (o evento seguinte, quando as células anexadas crescem num meio de cultura): (1) As estirpes, (2) o meio de cultura e (3) o tempo.

(1) Vários estudos mostraram claros padrões de fixação diferentes, entre os isolados de *L. monocytogenes* (CHAE e SCHRAFT, 2000; TRESSE et al., 2007). Entre esses estudos, alguns indicaram que cepas persistentes eram melhores em atingir um elevado número de células por unidade de área (ou densidade das células) após crescimento em TSBYE (BORUCKI et al., 2003) ou, inversamente, conforme a diluição ou tipo do meio. Os estudos alegam que o desenvolvimento depende de uma série de fatores como idade da cepa, quantidade de células, local que ela encontra para se reproduzir.

(2) Seja qual for a estirpe considerada, a densidade de células é altamente dependente do meio de crescimento. O crescimento pronunciado de células com forte adesão em inox (SS) e em polietileno (PP) das facas de desossa, crescendo em caldo BHI observado neste trabalho, não significa dizer que esta situação de adesão vai se repetir quantitativamente em situação de indústria, uma vez que os nutrientes da carne são diferentes dos nutrientes do meio de cultura utilizado, além de diferenças de pH, temperatura, presença de umidade, atividade de água, etc. Al-Makhlafi et al. (1994) observaram maior adesão de *L. monocytogenes* em beta-lactoglobulina e menor em soro-albumina. Smoot e Pierson (1998) analisando a influência do pH com variação de 4 a 9, observaram maiores valores de adesão a pH baixo, após um tempo de contato de 1 h, resultado semelhante ao encontrado por Duffy e Sheridan (1997) que observaram um maior número de *L. monocytogenes* aderidas em pH 4,76. Em relação à temperatura, Norwood e Gilmour (2001) encontraram máxima adesão para o aço inoxidável a 18°C, em comparação com 4 e 30°C. No que diz respeito ao impacto de umidade relativa, trabalhos mostram que dessecação aumenta a força de fixação bacteriana (Douglas, 1968; Asséré et al, 2008), embora também resulte em mortalidade.

(3) Estudos de Lunden et al. (2000) indicaram que, enquanto as cepas de bactérias mais resistentes se aderem mais rapidamente do que as não-resistentes dentro de um curto período de tempo (1 ou 2 h tempo de contato), demorando mais para atingir níveis comparáveis de adesão (após 72 h de incubação em TSB). Em contrapartida a densidade celular tende a diminuir depois de alcançar valores em torno de  $1,6 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> após 24 h de crescimento em TSBYE, de *L.*

*monocytogenes*.

Enfim, diversos fatores podem interferir na adesão inicial dos micro-organismos às superfícies estudadas, porém independente destes, o estudo demonstra que houve adesão considerável, a qual requer cuidados e atenção com relação aos procedimentos de limpeza e sanitização em condições industriais.

#### 4.2. Avaliação da capacidade de desinfecção das facas de desossa previamente contaminadas com *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* com sanificantes químicos e água quente

Inicialmente foi verificada a variação na eficiência dos procedimentos com base em reduções decimais no efeito microbiano exercido pelos diferentes sanitizantes avaliados e a água quente (Tabela 6). Observou-se que tanto para *E. coli* como para *L. monocytogenes*, os métodos mais eficazes foram em ordem decrescente, ácido peracético, água quente e biguanida.

**Tabela 6:** Redução na contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>). de *E. coli* e *L. monocytogenes* em facas de desossa após tratamento químico e água quente (tempo de contato das facas com a bactéria de 6 horas e concentrações do sanitizante recomendadas pelo fabricante - Biguanida 1% e Ácido Peracético 0,2% e temperatura da água quente de 82,2<sup>o</sup>C).

<i>Escherichia coli</i>							
Facas de desossa	Contagem inicial	Biguanida 1%	Redução*	Ácido peracético 0,2%	Redução*	Água quente 82,2 <sup>o</sup> C	Redução*
PPN	3,4	0,0	3,4	0,0	3,4	0,0	3,4
PPU	3,2	0,9	2,3	0,0	3,2	0,6	2,6
SSN	3,8	0,0	3,8	0,0	3,8	0,0	3,8
SSU	3,9	2,2	1,7	0,0	3,9	0,0	3,9
<i>Listeria monocytogenes</i>							
PPN	4,2	1,7	2,5	0,0	4,2	0,1	4,1
PPU	4,8	2,1	2,7	0,0	4,8	0,0	4,8
SSN	4,7	2,0	2,7	0,0	4,7	0,0	4,7
SSU	4,8	2,4	2,4	0,0	4,8	0,0	4,8

PPN: cabos novos; PPU: cabos usados SSN: lâminas novas; SSU: lâminas usadas.

\* O número de reduções decimais é definido como [Log UFC da população inicial – Log UFC da população final].

Avaliando-se separadamente o desempenho dos tratamentos para *E. coli*, observa-se que

no tratamento com 1% de biguanida houve maior resistência bacteriana nas facas usadas (PPU e SSU), resultado também registrado nos cabos usados tratados com água quente a 82,2°C, demonstrando que as ranhuras podem ter formado sítios para alojamento e adesão permanente dos micro-organismos, sendo que somente o tratamento com 0,2% de ácido peracético foi capaz de remover totalmente os micro-organismos inicialmente aderidos.

Para *L. monocytogenes*, o tratamento com 1% de biguanida também se mostrou pouco eficiente, com maior sobrevivência dos micro-organismos nas facas usadas (PPU e SSU), ainda que o número de reduções decimais tenha sido maior nos cabos usados em relação aos novos, de 2,7 e 2,5 log UFC/cm<sup>-2</sup>, respectivamente. Os demais tratamentos, água quente e ácido peracético, demonstraram ser eficazes na remoção das bactérias aderidas inicialmente.

A atividade desinfetante do ácido peracético é baseada na liberação de oxigênio ativo. Ele rompe funções quimiosmóticas de lipoproteínas da membrana citoplasmática e o transporte por meio da deslocação ou da ruptura da parede celular. Isso pode ser igualmente efetivo contra lipoproteínas da membrana externa, facilitando a ação contra bactérias Gram-negativas. Ácido peracético intracelular pode também oxidar enzimas essenciais. Assim, vias bioquímicas vitais, transporte através da membrana e níveis de solutos intracelulares são danificados, além de alterações na molécula de DNA (KITIS, 2004).

Houve diferença entre o efeito bactericida das soluções sanitizantes de biguanida e ácido peracético (Tabela 6), corroborando com dados de Silva et al. (2009), que demonstraram que o hipoclorito de sódio e ácido peracético foram mais bactericidas do que o composto de amônio quaternário (cujo mecanismo de ação é semelhante ao da biguanida).

Rossoni e Gaylarde (2000), isolaram *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango e aderiram a cupons de aço inoxidável por 1 h antes de enxaguar com água destilada estéril (controle) e tratar com ácido peracético (250 ou 1000 mg.L<sup>-1</sup>) e hipoclorito (100 ou 200 mg.L<sup>-1</sup>), durante 10 minutos. O hipoclorito de sódio foi mais eficaz do que o ácido peracético em matar ou remover as células aderentes. No entanto, outros estudos mostraram que o ácido peracético foi considerado mais eficaz para controlar biofilmes de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* sp. em aço inoxidável (HOLAH e THORPE, 1990; FATEMI e FRANK, 1999). Como já discutido, estas diferenças de resultados podem estar associadas a diversos outros fatores como nutrientes, pH, etc.

Na presença de matéria orgânica os sanitizantes tem seu desempenho comprometido. No entanto a clorhexidina (biguanida) mantém sua ação desinfetante mesmo após o contato com altas concentrações (GÉLINAS e GOULET, 1983), como também quaternário de amônio e ácido

peracético (HOLAH et al., 1990). No presente estudo, não houve exposição das facas à matéria orgânica, apenas ao meio de cultura, e estas, antes de serem submetidas ao sanitizante, sofreram um enxágue com água deionizada.

Em estudos de Marques et al. (2007), ao comparar três desinfetantes, dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético, sobre a remoção de biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e de vidro, o ácido peracético apresentou uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os três desinfetantes usados. A alta eficiência de ácido peracético foi explicada pela sua elevada capacidade em oxidar moléculas celulares.

A sobrevivência de bactéria após a limpeza e sanitização representa um perigo potencial para a indústria alimentícia e para o consumidor. A perda da atividade microbiana na presença de matéria orgânica é amplamente registrada na literatura (RODGERS et al., 2001), variando com o princípio ativo do sanitizante e linhagem desafiadora. Isto demonstra a importância de testes específicos para a escolha de produtos a serem utilizados na higienização de superfícies que entram em contato com alimentos. Além disso, a bactéria pode obter alta resistência por meio de adaptação, aquisição de elementos de resistência genética, resposta ao estresse e formação de biofilmes.

Deve sublinhar-se que um adequado e eficiente processo de higienização é de fundamental importância, uma vez que o American Public Health Association (APHA) recomenda um limite tolerado máximo de 2 UFC/cm<sup>2</sup> de modo a considerar uma superfície de contato com alimentos adequados, enquanto que a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere tais limites como sendo de 30 UFC/cm<sup>2</sup>. Com base nos resultados obtidos e as considerações acima pode-se afirmar que o ácido peracético e a água quente foram totalmente eficientes na remoção de células de *E. coli* e *L. monocytogenes* aderidas em facas de desossa, enquanto que a biguanida foi parcialmente eficiente, sendo eficiente para remoção de *E. coli* em facas novas e não sendo eficaz na remoção de *L. monocytogenes* em facas de desossa.

Foi realizada também uma comparação entre diferentes concentrações do sanitizante biguanida (0,2; 0,5; 1,0 e 2,0% v/v) para remoção da adesão em relação a diferentes tempos de contato das facas de desossa com as bactérias (1, 2 e 6 horas) *E. coli* (Tabela 7) e *L. monocytogenes* (Tabela 8).

Observa-se que, tanto para cabos novos (PPN) como para lâminas novas (SSN), os tratamentos com concentrações de 0,5 a 2,0% não diferem entre si ( $p < 0,05$ ), independentemente do tempo de contato prévio com a *E. coli* (1 a 6 horas), indicando que apenas a concentração de 0,2%

foi menos eficiente na remoção da adesão (Tabela 7).

Já para cabos usados (PPU), somente os tratamentos com 1,0 e 2,0% de biguanida foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) na remoção da adesão. Em relação as lâminas usadas (SSU), o tratamento com 1,0 e 2,0% foram significativamente superiores apenas com 1 hora de contato. Com 2 horas de contato de *E. coli* com as lâminas usadas, somente a concentração de 2,0% foi superior, e com 6 horas de contato não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as concentrações testadas, indicando baixa eficiência na remoção da adesão.

**Tabela 7:** Redução na contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de *E. coli*, em função do tempo de contato (1, 2 e 6 horas) e as concentrações do sanitizante Biguanida (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0%).

Tempo	Facas de desossa	CI	0,2%	R*	0,5%	R*	1,0%	R*	2,0%	R*
1h	PPN	3,7	0,9	2,8 b	0,0	3,7 a	0,0	3,7 a	0,0	3,7 a
	PPU	3,5	1,4	2,1 b	1,3	2,2 b	0,9	2,6 a	1,0	2,5 a
	SSN	3,5	2,5	1,0 b	0,0	3,5 a	0,0	3,5 a	0,0	3,5 a
	SSU	4,1	2,3	1,8 b	2,0	2,1 b	1,3	2,8 a	0,9	3,2 a
2h	PPN	3,8	1,5	2,3 b	0,1	3,7 a	0,0	3,8 a	0,0	3,8 a
	PPU	3,7	2,1	1,6 b	1,6	2,1 b	1,0	2,7 a	0,9	2,8 a
	SSN	3,4	1,5	1,9 b	0,0	3,4 a	0,0	3,4 a	0,0	3,4 a
	SSU	4,1	2,3	1,8 b	2,2	1,9 b	1,9	2,2 b	1,0	3,1 a
6h	PPN	4,2	1,7	2,5 b	0,9	3,3 ab	0,0	4,2 a	0,0	4,2 a
	PPU	4,8	2,2	2,6 b	1,8	3,0 b	0,9	3,9 a	1,0	3,8 a
	SSN	4,7	2,3	2,4 b	0,0	4,7 a	0,0	4,7 a	0,0	4,7 a
	SSU	4,8	2,7	2,1 a	2,2	2,6 a	2,2	2,6 a	2,8	2,0 a

PPN: cabos novos; PPU: cabos usados SSN: lâminas novas; SSU: lâminas usadas.

\* Reduções decimais [Log UFC da população inicial – Log UFC da população final].

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

A *L. monocytogenes* (Tabela 8) mostrou-se mais resistente à remoção da adesão por biguanida nos diferentes tempos de contato. Observa-se que, com uma hora de contato, cabos novos (PPN) e lâminas novas (SSN) apresentam redução de adesão significativamente superior ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de 1 e 2%, enquanto que cabos usados (PPU e lâminas usadas (SSU) apresentaram redução significativamente superior somente com 2% de biguanida.

No entanto, com 2 horas de contato de *L. monocytogenes*, foi necessário 2% de biguanida para uma redução significativamente superior ( $p < 0,05$ ) nos materiais avaliados, com exceção de cabos novos (PPN), e com 6 horas de contato observou-se diferenças no comportamento dos cabos em relação às lâminas onde 1 e 2% de biguanida foram superiores

tanto para cabos novos (PPN) como usados (PPU), enquanto que somente 2% foi significativamente superior para lâminas, tanto novas como usadas (Tabela 8).

**Tabela 8:** Redução na contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de *Listeria monocytogenes*, em função do tempo de contato (1, 2 e 6 horas) e as concentrações do sanitizante Biguanida (0,2, 0,5, 1,0 e 2,0%). Resultados em Log UFC/cm<sup>2</sup>.

Tempo	Facas de desossa	CI	0,2%	R*	0,5%	R*	1,0%	R*	2,0%	R*
1h	PPN	3,7	1,7	2,0 b	1,0	2,7 b	0,4	3,3 a	0	3,7 a
	PPU	3,5	3,0	0,5 c	1,8	1,7 b	1,7	1,8 b	0,5	3,0 a
	SSN	3,5	2,9	0,6 c	2,2	1,3 b	0,3	3,2 a	0,1	3,4 a
	SSU	4,1	3,9	0,2 d	2,4	1,7 c	1,3	2,8 b	0,1	4,0 a
2h	PPN	3,8	2,1	1,7 b	1,4	2,4 ab	1,0	2,8 a	1,1	2,7 a
	PPU	3,7	2,9	0,8 c	1,9	1,8 b	1,9	1,8 b	1,0	2,7 a
	SSN	3,4	3,2	0,2 c	2,5	0,9 c	1,5	1,9 b	0,1	3,3 a
	SSU	4,1	3,5	0,6 c	2,5	1,6 b	2,0	2,1 b	0,8	3,3 a
6h	PPN	4,2	3,1	1,1 b	2,1	2,1 b	1,7	2,5 a	1,4	2,8 a
	PPU	4,8	4,7	0,1 c	2,5	2,3 b	2,1	2,7 ab	1,7	3,1 a
	SSN	4,7	3,7	1,0 c	2,7	2,0 b	2,0	2,7 b	0,8	3,9 a
	SSU	4,8	4,1	0,7 c	4,3	0,5 c	2,4	2,4 b	1,1	3,7 a

PPN: cabos novos; PPU: cabos usados SSN: lâminas novas; SSU: lâminas usadas.

\* Reduções decimais [Log UFC da população inicial – Log UFC da população final].

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Em relação ao uso do ácido peracético para remoção da adesão, observou-se que o mesmo foi eficiente, com 100% de remoção em todas as concentrações testadas (0,2 a 2%), nos diferentes tempos de contato (1 a 6 horas), tanto nos cabos e lâminas novos, como nos cabos e lâminas usados.

### **4.3. Avaliação da capacidade de desinfecção das facas de desossa previamente contaminadas com *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* com aplicação de ultrassom**

Para avaliar a eficácia do ultrassom na remoção da adesão, foi realizado um estudo preliminar, onde se submeteu cultivos axênicos de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* ao ultrassom. Os resultados do efeito da exposição destas culturas a diferentes tempos de exposição ao ultrassom encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9:** Efeito de diferentes tempos de exposição ao ultrassom (155W/40KHz) em meio de cultura LB sobre a contagem de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

Tempo de Exposição ao Ultrassom	<i>Listeria monocytogenes</i> (Log/mL)	<i>Escherichia coli</i> (Log/mL)
Controle	9,0 a	9,0 a
10 minutos	9,3 a	9,0 a
60 minutos	9,2 a	9,4 a

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

As contagens das culturas bacterianas expostas ao ultrassom com potência de 155W, independente do tempo de exposição, não apresentaram diferença significativa em relação à cultura sem exposição ao ultrassom (contagem inicial de 9,0 Log/mL), indicando que o mesmo não foi eficaz em provocar morte bacteriana, tanto de bactéria Gram-positiva como Gram-negativa. A partir destes resultados foi testado o efeito do tempo de exposição ao ultrassom sobre *L. monocytogenes* e *E. coli* diluídas em água peptonada a 0,1% (Tabela 10).

**Tabela 10:** Efeito de diferentes tempos de exposição ao ultrassom (155W/40KHz) de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* diluídas em água peptonada 0,1%,.

Tempo de Exposição ao Ultrassom	<i>Listeria monocytogenes</i> (Log/mL)	<i>Escherichia coli</i> (Log/mL)
Controle	4,2 a	3,8 a
10 minutos	4,5 a	2,0 b
60 minutos	4,3 a	2,0 b

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

A exposição de uma concentração menor de bactérias ao ultrassom permitiu observar-se que o mesmo foi capaz de reduzir em aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos a contagem de *E. coli* a partir de 10 minutos de exposição. Entretanto, um maior tempo de exposição (60 minutos) não foi capaz de aumentar esta mortalidade, indicando que a mesma não é linear em função do tempo.

Para *L. monocytogenes* não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com ultrassom com 10 e 60 minutos de exposição, em relação a contagem inicial. Este resultado confirma a maior resistência física de bactérias Gram-positivas em relação à Gram-negativas a qual está associada a constituição diferencial de suas paredes.

Lee et al. (1989) promoveram a redução de populações de *Salmonella* sp. em água peptonada em até 4 ciclos logarítmicos, usando ultrassom (1KHz) com 10 minutos de exposição.

Entretanto, Pires (2006), estudando os efeitos das radiações gama nas doses 0,2; 4; 6; 6 e 8 K Gy e ultrassônica na frequência 25, 35 e 42 KHz e tempos de 0, 1, 5, 10, e 20 minutos em suco de laranja contaminado por *Alicyclobacillus acidoterrestris*, observaram que o tempo de exposição à fonte ultrassônica não apresentou efeito significativo. Nascimento et al. (2008), avaliando os efeitos de ozônio a  $3,5\text{g.L}^{-1}$  e ultrassom a 37KHz no tratamento de café despulpado, também não encontraram diferença significativa na contagem de mesófilos com o tratamento com ultrassom.

Villamiel e Jong (2000) estudaram o efeito do ultrassom de baixa frequência (20kHz) de fluxo contínuo sobre *Pseudomonas fluorescens* (Gram-negativa) e *Streptococcus thermophilus* (Gram-positiva) em leite. Constataram que *P. fluorescens* teve maior ruptura de células quando comparado com *S. thermophilus*, fato esperado, pois a parede celular das bactérias Gram-positivas em forma de cocos são mais resistentes que as Gram-negativas em forma de bastão, corroborando com os dados encontrados neste estudo onde obteve-se melhores resultados para a eliminação de *E. coli*, que tem formato bacilar Gram-negativo.

O uso do ultrassom como tratamento antimicrobiano, isoladamente ou em combinação, foi de interesse durante muitos anos, para utilização em produtos alimentares, ou até mesmo para eliminar micro-organismos contaminantes de alimentos e superfícies (SANTOS et al., 2010). A eficiência do ultrassom, na descontaminação microbiana de vários tipos de alimentos, consiste na ruptura da integridade do micro-organismos (MCCLEMENTS, 1995). Segundo Mason et al. (1996) o fenômeno denominado cavitação acarreta danos ou ruptura das paredes de células biológicas, ocasionando conseqüentemente a morte destas.

Neste sentido, foram feitos testes de utilização do ultrassom para remoção da adesão de *E. coli* e *L. monocytogenes* em facas de desossa novas e usadas com diferentes tempos de contato para adesão (5 minutos a 6 horas), usando-se 10 minutos de exposição ao ultrassom (potência de 40KHz/155W) com controle de temperatura a 20°C e 50°C. Os resultados não foram promissores, apenas com pequeno aumento na remoção em torno de 0,5 Log UFC/cm<sup>2</sup> em facas expostas a 50°C, independentemente do tempo de adesão, tanto nos cabos como lâminas, novos e usados, mostrando não haver influência do ultrassom na remoção da adesão nas diferentes superfícies analisadas (resultados não mostrados).

O ultrassom parece ser mais efetivo na destruição de micro-organismos quando em combinação com outras técnicas de descontaminação, como aquecimento, extremos de pH,

substâncias bactericidas (MCCLEMENTS, 1995; MASON et al., 1996), ou com cloração (LILLARD, 1994). Ordoñez e Burgos (1976) relataram os benefícios da aplicação combinada do calor com o ultrassom.

Os fatores que parecem afetar substancialmente a destruição de micro-organismos pelo ultrassom são: a amplitude da onda ultra-sônica; o tempo de contato/exposição com o micro-organismo; o tipo de micro-organismo, o volume de produto a ser processado, a composição do mesmo e a temperatura de tratamento (FDA, 2009). As diferenças na viscosidade dos meios também podem explicar algumas das diferenças, uma vez que há um número mais elevado de sobreviventes de micro-organismos em meios mais viscosos, pois a alta viscosidade protege os micro-organismos, reduzindo a cavitação (SANTOS et al., 2010).

## 5. CONCLUSÕES

Após avaliar a adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e a resistência destas frente a diferentes métodos de desinfecção foi possível apresentar algumas conclusões:

- ✓ Observou-se uma curva logarítmica de adesão, tanto de *E. coli* como de *L. monocytogenes*. Para *E. coli*, verificou-se também uma maior velocidade de adesão nas lâminas em relação aos cabos, principalmente nas lâminas usadas, diferentemente do comportamento de *L. monocytogenes*, onde não se observou diferenças entre os materiais novos e usados.
- ✓ A maior adesão de *E. coli* ocorreu em inox (SS) e a menor em polipropileno (PP), obtendo-se respectivamente 6,8 e 6,4 Log UFC/cm<sup>2</sup> após 48 horas de contato com o micro-organismo.
- ✓ Avaliando a adesão da bactéria Gram-positiva, *L. monocytogenes*, foi possível observar que a mesma apresenta contagens superiores a 2,0 Log UFC/cm<sup>2</sup>, em 5 minutos. Indicando maior poder de adesão em relação a *E. coli*.
- ✓ A desinfecção com ácido peracético mostrou-se eficiente em todos os tempos de contato e concentrações avaliados para ambas as bactérias, não havendo contagem de bactérias aderidas após aplicação do sanitizante em todas as condições testadas;
- ✓ O uso de sanitizante a base de biguanida se mostrou eficaz a 0,5% para *E. coli* em facas novas. Em facas usadas foram necessárias concentrações maiores para redução do micro-organismo, sendo recomendado 2% para remoção de *E. coli* com até 2h de uso.
- ✓ Para *L. monocytogenes*, o tratamento com biguanida se mostrou pouco eficiente, com maior sobrevivência do micro-organismo nas facas usadas, tanto em polipropileno como inox, ainda que o número de reduções decimais tenha sido maior nos cabos usados em relação aos novos. Os demais tratamentos, água quente (82,2<sup>o</sup>C) e ácido peracético, demonstraram ser eficazes na redução das bactérias aderidas inicialmente.
- ✓ O tratamento com água quente (82,2<sup>o</sup>C), normalmente usado nas indústrias, mostrou-se eficiente, com redução dos micro-organismos, *E. coli* e *L. monocytogenes*, nos materiais testados.
- ✓ O tratamento com ultrassom (155W/40KHz) apresentou pequenas reduções para cultivos de *E. coli* com inóculo de 10<sup>3</sup> UFC/mL, reduzindo 1,5 ciclos logarítmicos. Para *L.*

*monocytogenes* partindo de um inóculo de  $10^4$  UFC/mL não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com ultrassom.

- ✓ Quando realizado teste diretamente nas facas os resultados não foram promissores, mostrando não haver influência ( $p < 0,05$ ) do ultrassom (155W/40KHz) na redução da adesão em facas de desossa contendo *L. monocytogenes* ou *E. coli*.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- ✓ Avaliar diferentes materiais empregados para fabricação de equipamentos;
- ✓ Avaliar novos métodos de sanitização, a fim de reduzir ou impedir a adesão bacteriana, alterando as características físico-químicas da superfície.
- ✓ Investigar diferentes superfícies que apresentam um número máximo de fatores desfavoráveis à adesão microbiana e formação de biofilme.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; HASMAN, H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 100, p. 83-89, 2004.

AASE, B.; SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; RORVIK, L. M. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 57-63, 2000.

ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, suplemento 1, p. S156-S162, julho 2010.

ALI, S. H.; HOSHYARE, D. F.; AL-DELA IMY, K. S. Microbial counts on surfaces of lamb carcasses and shelf-life of refrigerated ground lamb. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 45, n. 11, p. 1013-1015, 1982.

ALLISON, D.G.; MCBAIN, A.J.; GILBERT, P. Biofilms: problems of control. In: GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, M.; WILSON, M. (Eds). **Community Structure and Cooperation in Biofilms**. Cambridge: University Press. p. 309-328. 2000.

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**, v. 60, p. 3560-3565. 1994.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA. 676 p. 2001.

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela LTDA, 184p. 1996.

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

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

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; LIMA, J.C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N.J. (Ed). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela. 412 p. 2008.

ANUALPEC 2012. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: **FNP Consultoria & Comércio**, 368p. 2007.

AQUINO, S.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Princípios gerais de higienização. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela. cap. 26, p.423-444. 2003.

ASSELT, A.J.; GIFFEL, M.C. Pathogen resistance to sanitizers. In: LELIEVELD, H.L.M.; MOSTERT, M.A.; HOLAH, J. (Eds). **Handbook of Hygiene Control in the Food Industry**. England: Woodhead Publishing Limited, p. 69-92. 2005.

ASSÉRÉ, A.; OULAHAL, N.; CARPENTIER, B. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1692–1702. 2008.

BALDRY, M.G.C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 54, p. 417-423, 1983.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som (I): **Influência do ultra-som na química.**, Química Nova, São Paulo, p. 302 a 316, 1992.

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

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

BERESFORD, M.R.; ANDREWS, 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.

BOLETTI, F.T. Manufacture of vinegar. In: MARSHALL, C.E. (Ed). **Microbiology: a textbook on microorganisms general and applied**. London: Churchill, p. 636-648. 1921.

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

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

BOULANGE-PETERMANN, L.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. **Biofouling**, Buckingham, v. 11, p. 201-216, 1998.

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

BRASIL, F.B.J, PADILHA FILHO, J. G.; GUASTALD, A. C.; RAMIRE, I.; CASTRO, M. B. Placas de aço inoxidável 316L aplicadas no reparo de fratura experimental diafisária do rádio e ulna de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n.1, p. 37-43, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. **Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, Boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e Qualidade na Área de Alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 13 maio 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria, nº 122, de 29 de novembro de 1993. **Incluir na Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988, subanexo 1, alínea I, o princípio ativo ÁCIDO PERACÉTICO, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 dez. 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Circular Nº 175/2005/CGPE/DIPOA, de 16 de maio de 2005. **Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole**. Brasília: 2005. 38 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Circular Nº 354/2004/DCI/DIPOA, de 25 de junho de 2004. **Prevenção da contaminação com *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo**. Brasília: 9 p. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Circular Nº 105/2005/CGPE/DIPOA, de 11 de abril de 2005. **Procedimentos de Verificação para *Listeria monocytogenes***. Brasília: 1 p. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**. RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J *Enterobacteriaceae*. In: BRENNER, D.J; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. v.2. New York: Springer Science+Business Media Inc., p. 587-607. 2005.

BUCHANAN, R., LINDQVIST, R., ROSS, T., SMITH, M., TODD, E., WHITING, R.,. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological Risk Assessment Series, 4. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome (Italy). 2004.

CAIRNS, B.J., PAYNE, R.J.H.; Sudden increases in listeriosis rates in England and Wales, 2001 and 2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 465–468. 2009.

CAPPELLO, S.; GUGLIELMINO, S. P. P. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 37, p. 205-207, 2006.

CARBALLO, J.; FERREIROS, C. M.; CRIADO, M. T. Factor analysis in the evaluation of the relationship between bacterial adherence to biomaterials and changes in free energy. **Journal of Biomaterials Applications**, Lancaster, v. 7, n. 2, p. 130-141, 1992.

CARPENTIER, B. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. **Food Microbiology**, Paris, v. 14, p. 31-37, 1997.

CARPENTIER; B.; CERF, O.; Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, Paris, v. 75, p.499-511, 1993.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H., Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103–111. 2000.

CHEN, Y.; JACSON, K. M.; CHEA, F. P.; SCHAFFNER, D. W. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. **Journal of Food Protection**, New Jersey, v. 64, n. 1, p. 72-80, 2001.

COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, v. 8, p. 3299-3324, 1981.

COSTERTON, J.W.; ANWAR, H.; DASGUPTA, M. K. Bacterial biofilm in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Alberta, v. 41, p. 435-84, 1987.

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

DANESE, P.N.; PRATT, L.A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* k-12 biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, p. 3593-3596, 2000.

DAVEY, M.E; O'TOOLE G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology Molecular Biology Review**, New Hampshire, v. 64, n. 4, p. 847-67, 2000.

DEWANTI, R; WONG, C.M. Influence of culture conditions on biofilms formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, p.147-164, 1995.

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

DOUGLAS, J. Recovery of known numbers of micro-organisms from surfaces by swabbing. **Laboratory Practice**, v. 17, p. 1336–1337. 1968.

DRUGGAN, P.; FORSYTHE, S.J.; SILLEY, P. Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. In: *New Techniques in Food and Beverage Microbiology*. **Society for Applied Bacteriology**, Technical series n° 31. Oxford: Blackwell Science. p. 120-

125. 1993

DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J. The effect of temperature, pH and medium in a surface adhesion immunofluorescent technique for detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 95–101. 1997.

FATEMI, P.; FRANK, J. F. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Pseudomonas* biofilms, by peracid sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 761-795, 1999.

FAVERO MS, GABIS DA, VESLEY D. Environmental monitoring procedures. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination os Foods**. 2ed. Washington: APHA, p. 47-61. 1984

FDA-CFSAN. Bacteriological Analytical Manual on line. 2009. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Acesso em 07/10/2012.

FELÍCIO, P. E. de. Desdobramento da Função Qualidade da Carne Bovina. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 12, n. 54, p. 16-22, 1998.

FLACH J. Formação de Biofilmes em Diferente materiais utilizados na indústria de Processamento de leite - **Dissertação** de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Área de Microbiologia do Ambiente - UFRGS – Porto Alegre (RS), 2006.

FLINT, S.H., BROOKS, J.D. & BREMER, P.J. Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v. 11, p. 81–97. 1997.

FONTANA,R. - Efeitos do Ultra-som de alta intensidade na ativação e inativação de esporos bacterianos, Dissertação de Mestrado, área de Ciências Biológicas – **Microbiologia Aplicada** - UNESP - Rio Claro (SP), p. 1 - 63, 1996.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies**. Jun. 2009. Disponível em: <[www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm103342.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm103342.htm)>Acesso em: 22.01.12.

FORSYTHE, S.J.; The **Microbiology of Safe Food**. 2nd.Chichester:Wiley-Blackwel, 496p 2010.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 2005

FRANK, J.F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Advances in Food and Nutrition Research**, Lincoln, v. 43, p. 319-370, 2000.

FRANK, J.F.; CHMIELEWSKI, R.A.N. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, Washington, v. 2, p. 22-32, 2003.

FRANK, J.F.; EHLERS, J.; WICKER, L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. **Food Protection Trends**, Des Moines, v. 23, p. 654-663, 2003.

FRANZIN, M. Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto; **Boletim Técnico**. Avecia Biocides. 2001. disponível em < [http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida\\_Arch.pdf](http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida_Arch.pdf) >; acesso em 09/06/2012.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia,. 681p.1998.

FUJIHARA, R.M.; SYLVIO, S.B. Limpeza e desinfecção de plantas de processamento. In: CONTRERAS, C.J. et al. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, p.7-16. 2003.

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

GÉLINAS, P.; GOULET, J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 54, p. 243 - 247, 1983.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; KAMEL, C. A. K.; ABREU, E. S.; RIBEIRO, E. R.; SILVA, K. C.; LAMARDO, L. C. A.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, V. K. I.; KAWASAKI, V. M. Manipuladores de alimentos: Capacitar É preciso. Regular Será preciso?. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 78-79, p.18-22, 2000.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C.; BANDONI, M. Use of total or *Escherichia coli* counts to asses the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, n. 1-3, p. 181-196, 1996.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C. Contamination of beef trimmings with *Escherichia coli* during a carcass breaking process. **Food Research International**, Barking, v. 33, p. 125-130, 2000.

GILLESPIE, I.A.; MCLAUCHLIN, J; GRANT, K.A.; LITTLE, C.L.; MITHANI, V.; PENMAN, C.; LANE, C.; REGAN, M. Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001– 2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1361–1366. 2006.

GOTTENBOS, B.; VAN DER MEI H.C; BUSSCHER H.J. Initial *Staphylococcus epidermidis Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v. 50, n. 2, p. 208-214, 2000.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 734–740. 2008.

GUIRRO,E.C.O. - Bioefeitos induzidos por ultra-som em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* estudo in vitro, **Tese de Doutorado**, área de Ciências Biológicas Microbiologia Aplicada -

UNESP - Rio Claro(SP), p. 1-91, 1999.

HAEGHEBAERT, S., LE QUERREC, F., BOUVET, P., GALLAY, A., ESPIÉ, E., VAILLANT, V., 2002. Les toxi- infections alimentaires collectives en France en 2001. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire**, Paris, v. 50, p. 249-254, 2002.

HANSSON, I.B. Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouses in Sweden. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 6, p. 820-825, 2001.

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

HEYDOM, A.; ERSBØLL B.; KATO, J.; HENTZER, M. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell- to-cell signaling and stationary-phase a factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2008-2017, 2002.

HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVN, D.; KOLD, J.; GRAM, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n. 52, p. 173-185, 2003.

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

HOLAH, J.T.; TAYLOR, J. H; BROWN, K. L. F.; TOIVENEN, J. A conductance based surface disinfection test for food hygiene. *Letters Applied Microbiology*, Wolverhampton, v. 11, p. 255-259, 1990, J.T.; THORPE, R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**, Gloucestershire, v. 69, n. 4, p. 599-608, 1990.

HOLAH, J.T.; TAYLOR, J.H.; DAWSON, D.J. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent stains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Society for Applied Microbiology Symposium Series**, Bedford, v. 31, p. 111S-120S, 2002.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Minnesota, v. 37, n. 2/3, p. 145-153, 1997.

HUGAS, M. Bacteriogenics lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and products. **Meat Science**, Illinois, v. 49, p. 139-150, 1998.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. El Sistema de Análisis de Riesgos Y Puntos Críticos – su aplicación a las industrias de alimentos. **Academic Press**. Zaragoza: Acribia, 332p. 1991.

JAY, J. M. Indicators of Food Microbial Quality and Safety. In: JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. (Eds.) **Modern Food Microbiology**. Berkely: Springer, p. 387-409, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 711p.2005.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. 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.

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

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

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, Patras, v. 8, p. 37-57, 2004.

KHELEF, N.; LECUIT, M.; BUCHRIESE R, C.; CABANES, D.; DUSSURGET, O.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSE NBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. 3rd. ed. New York: Springer,. Cap. 1.2.11, p. 404-476. 2006.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, Oxford, v. 30, n.1, p. 47-55, Mar. 2004.

KOCH, J; STARK, K. Significant increase of listeriosis in Germany—**epidemiological patterns** 2001–2005. *Eurosurveillance* 11, 85–88. Kvistholm Jensen et al., 2010, 2006.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** . 4 ed. Washington: APHA,. p.69-82. 2001

KREFT, J.U.; PICIOREANU, C.; WIMPENNY, J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology*, **Cardiff**, v.147, n. 11, p. 2897–2912, 2001.

KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 227-236, 2003.

KVISTHOLM. J., A., ETHELBERG, S., SMITH, B., M. N., E., LARSSON, J., MØLBAK, K.C., J.J., KEMP, M. **Substantial increase in listeriosis**, Denmark 2009. *Eurosurveillance* 15 (12) pii=19522. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19522> (accessed on 2010-03-31). 2010.

LE CLERCQ-PERLAT, M.N.; LALANDE, M. Clean ability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. **Journal**

of **Food Engineering** , California, v. 23, p. 501-517, 1994.

LEE, B.H.; KERMASHA, S.; BAKER, B.E. Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of Salmonella in thin films of aqueous media and chocolate. **Food Microbiol.**, v. 6, p. 143-152, 1989.

LEITÃO, M.F.F. Aspectos microbiológicos da carne. In: **CONTRERAS, C.J.** et al. Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados. São Paulo: Varela, p. 1-5. 2003.

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

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

LILLARD, H. S. Decontamination of poultry skin by sonication. **Food Technol.** v. 48, n.12, p. 72-73, 1994.

LIN, S.; ZHANG, F. - Measurement of ultrasonic power and electroacoustic efficiency of high power transducers, **Applied Acoustic Institute, Ultrasonics Sonochemistry** – Elsevier Science B.V.; v. 37, p. 549-554, 2000.

LOPES, RLT. **Dossiê técnico Fontes de contaminação de alimentos.** Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). Out 2007. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloads/DT/MjIx>> Acesso em 09 de junho de 2012.

LUNDÉN, J.M.; MIETTINEN, M.K.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1204–1207. 2000.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em Alimentos de Origem Animal. **Revista da FZVA.** V.14, n. 1, p. 180-192, 2007.

MAO, Y.; DOYLE, M.P.; CHEN, J. Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 3811-3815, 2001.

MAPA/DAS/DIPOA/DCI – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL.GOV)/ Secretaria de Defesa Agropecuária/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Controle do Comércio Internacional. Especificação da **Decisão da Comissão n° 2001/471/CE. 27 de Maio de 2002.** Brasília.2002.

MARGULIS,M.A.; MARGULIS,I.M. - Contemporary review on nature of sonoluminescence and sonochemical reactions, **Ultrasonics Sonochemistry** – Elsevier Science B.V., v. 9, p. 1 10, 2002.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J.G. O.S.; ALVES, L. A. F.; SILVA B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R.H.; formation of biofilms by *staphylococcus aureus* on stainless steel and Glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 538-543, 2007.

MARRIOTT, N.G.; GRAVANI, R.B. **Sanitizers**. In: Principles of food sanitation. New York: Springer, chapt. 10, p. 165-189. 2006.

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

MASON, T.J.; PANIWNKYK, L.; LORIMER, J.P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 3, p. S253-S260, 1996.

MASSAGER, P.R. Desinfetantes utilizados na indústria de alimentos. In: **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, cap. 14, p. 191-204. 2006.

McCLEMENTS, J. Advances in the application of ultrasoun in food analysis and processing. Trends in **Food Science e Technology**., Oxford, v. 6, n. 9, p. 293-299, 1995.

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

MENEZES , L. F.; MELLO, C. A.; JÚNIOR, J. C. G. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de superfícies de equipamentos, em matadouro-frigorífico de bovinos no município de Varzéa Grande, MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 156, 2007.

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

MONTEIRO. R.Z. Serviços Profissionais de Alimentação: uma perspectiva. São Paulo.. 283 p. **Dissertação** (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) - Faculdade de Arquitetura e Urbanismo da Universidade Presbiteriana Mackenzie. 2004.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R. **Food Microbiology**: An Introduction. 2nd. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 428p. 2008.

NASCIMENTO, L.C.; LIMA, L.C.O.; PICOLLI, R.H.; FIORINI, J.E.; DUARTE, S.M.S.; SILVA, J.M.S.F.; OLIVEIRA, N.M.S.; VEIGA, S.M.O.M. Ozônio e ultrassom: processos alternativos para o tratamento do café despulpado. **Ciência e Tecnologia do Alimento**, v. 28, n.2, p. 282-294, 2008.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, K. C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 6, n.1, p.63-68, jan./jun. 2003.

NEL, S.; LUES, J. F; BUYS, E. M; VENTER, P. Bacterial populations associated with meat

from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Meat Science**, Barking, n. 66, p. 667-674, 2004b.

NEL, S.; LUES, J.F.R.; BUYS, E.M.; VENTER, P. The personal and general hygiene practices in the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Food Control**, Guildford, n. 15, p. 571-578, 2004<sup>a</sup>.

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**, v. 33, p. 320–324. 2001.

ORDOÑEZ, J.A.; BURGOS, J. The effect of ultrasonic treatment on the heat resistance of *Bacillus* spores. **Applied Env. Microb.** Washington, v.32, n.1, p. 183-184, 1976.

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.

OULAHAL-LAGSIR, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M. ‘*Escherichia coli* –milk’ biofilm removal from stainless steel surfaces: Synergism between ultrasonic waves and enzymes. **Biofouling**, Buckingham, v. 19, p. 159-168, 2003.

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

PARDI, M.C; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. M. C.; Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. v.1. **Ciência e Higiene da Carne. Tecnologia da sua obtenção e Transformação**. 2 ed. Goiânia: Ed. UFG, 624 p. 2006.

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

PETERS, A.C.; ELVERS, K.T.; GRIFFITH, C.J. Biofilm in the industry: Assessing hazards and risks to health. In: WIMPENNY, J.; GILBERT, P.; WALKER, J. (Eds). **Biofilms – The good, the bad and the ugly**. Cardiff: BioLine, 1999.

PHAC. *Listeria monocytogenes* outbreak — final update: December 10, 2008. Public Health Agency of Canada, Ottawa (Ontario, Canada) [http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria\\_2008-eng.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2008-eng.php). accessed 2009-02-24. 2008.

PHULL,S.S.; NEWMAN,J.P.; LORIMER,J.P.; POLLET,B.; MASON,T.J. – The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water – **Ultrasonics sonochemistry** - Elsevier Science B.V., v. 4, p. 157 a 164, 1997.

PINHEIRO, M. B.; WANDA, T. C.; PEREIRA, C. A. M. Análise microbiológica de tábuas de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos, SP. **Revista**

**Simbio-Logias**, v. 3, n. 5, Dez/2010.

PIRES, C.C. Efeitos das radiações gama e ultrassônica em suco de laranja contaminado por *Alicyclobacillus acidoterrestris*. 92f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, 2006.

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

PRENDERGAST, D. M.; DA LY, D. J. SHERIDAN, J. J; McDOWELL, D. A;BLAIR, I. S. The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. **Food Microbiology**, Copenhagen, v. 21, p. 589-596, 2004.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C., **Veterinary medicine**. 9.ed. Philadelphia : Saunders, 1877p. 2000.

ROBERTS T.A.; HUDSON W. R.; WHELEHAN O. P. Number and distribution of bacteria on some beef carcasses at selected abattoirs in some member states of the European Communities. **Meat Science**, Illinois, v. 11, p. 191-205, 1984.

ROBERTS, A. J; WIEDMANN, M. P athogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, n. 5, p. 904-918, 2003.

ROÇA, R.O.; SERRANO, A.M. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, n.35, p. 8-13, jan.-fev. 1995a.

RODGERS, J.D.; MCCULLAGH, J. J.; MCNAMEE, P. T.; SMYTH, J. A. AND BALL, H. J. An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of *Staphylococcus aureus* associated with the poultry industry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 131-140, 2001.

RODOLFO JR., A., NUNES, L.R., ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. São Paulo: Proeditores/Braskem.400 p. 2002.

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

ROSENTHAL I, JUVEN B J AND BEN-HUR E Evaluation of poly(hexamethylene biguanide HCl) as a biocide in the food industry. **J. Food Safety**, v. 4, p. 191-197. 1982.

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

RUSSELL, A.D. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: RUSSELL, A.D.,

HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J. (Eds). **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999.

RYU, J.H., KIM H, FRANK JF, BEUCHAT LR. Attachment and biofilm formation by on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 359-362, 2004b.

RYU, J.H.; KIM, H.; BEUCHAT, L.R. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 2123-2131, 2004a.

SAÁ, P., CABO, M.L., RODRÍGUEZ, J.J., Effects of mussel processing soils on the adherence of *Listeria monocytogenes* to polypropylene and stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1885–1890. 2009.

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

SANTOS, A., LOURENÇO, D., FERREIRA, S., PITA, N. CABETE, A. Ondas de ultra-sons. Escola Superior Agrária de Coimbra. **Proc. G. de Alim.** Portugal, 2010.

SILVA, I. D., CARELI, R. T., L, J. C., ANDRADE N. J., Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis, and *Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, ISSN, p. 0101- 2061, 2009.

SILVA, J. A. Extensão da vida de prateleira da carne bovina pela utilização de sanitizantes físicos e químicos. 119f. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1995.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, Ourence, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2000.

SMOOT, L.M., PIERSON, M.D., Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to buna-rN Rubber and stainless steel. **Journal of Food Protection** v. 61, p. 1286–1292. 1998.

SMULDERS F. J. M.; WOOLTHUIS, C. H. J. Influence of two levels of hygiene on the microbiological condition of veal as product of two slaughtering/processing sequences. **Journal Food Protection**, Ames, v. 46, p.1032-1035, 1983.

SONG, B.; LEFF, L. G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological Research**, n. 161, p. 355-361, 2006.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, abr./jun. 2005.

STOPFORTH, J.D.; SAMELIS, J.; SOFOS, J.N. Influence of extended acid stressing in fresh beef decontamination runoff fluids on sanitizer resistance of acid -adapted *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, p.2258-2266, 2003.

TAYLOR, J.H.; HOLAH, J.T. A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 81, p. 262-266, 1996.

TEBBS, S.E., SAWYER, A. & ELLIOTT, T.S.J. Influence of surface morphology on in vitro bacterial adherence to central venous catheters. **Brazilian Journal of Anaesthesia**, v. 72, p. 587-591. 1994.

TEIXEIRA, P. J.; LIMA, J.; AZEREDO, R. OLIVEIRA. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. **Int. Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1239-1244. 2008.

TOMASIN, A.C. - Biorresistência e Efeitos Causados pela Ação Acoplada da Irradiação Ultra Sônica e Processo Eletrolítico no Aproveitamento da Levedura - **Dissertação** de Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Microbiologia Aplicada - UNESP – Rio Claro(SP), 2001.

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

TRESSE, O., SHANNON, K., PINON, A., MALLE, P., VIALETTE, M., MIDELET-BOURDIN, G., Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. **Journal of Food Protection** v. 70, p. 1569-1578. 2007.

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

VAN OSS, C.J., JU, L. CHAUDHURY, M.K. & GOOD, R.J. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 128, p. 313-319. 1989.

VANDERLINDE, P.B.; SHAY, B.; MURRAY, J. Microbiological quality of Australian beef carcass meat and frozen bulk packed beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 4, p. 437-443, 1998.

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

VERRAN, J., LEES, G.; SHAKESPEARE, A.P. The effect of surface roughness on the adhesion of *Candida albicans* to acrylic. **Biofouling**, v. 3, p. 183-192. 1991.

VIANA, E.S. Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias

psicotróficas isoladas de leite. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2006.

VICENTE, E.; TOLEDO, M.C.F. Metodologia para determinação de digluconato de clorhexidina em carcaças de frango utilizando CLAE - par iônico e avaliação de resíduos durante a refrigeração e congelamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, 2003.

VILLAMIEL, M.; JONG, P. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase soy broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. **Journal. Food Eng.**, Oxford, v. 45, p. 171-179, 2000.

WHITEHEAD, K.A., COLLIGON, J.S.; VERRAN, J. The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, p. 143–151. 2004.

WILLIAMS, A.R. - Phonophoresis: evaluation using three topical anaesthetic, **ultrasonics**, v. 28, p. 137 - 141, 1990.

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

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

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. 2003 Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, Oeiras, v. 1, p. 1-12, 2005.

ZAQUEUS, O.M.; IVANAINEN, E.K.; NISSINEN, T.K.; LEHTOLA, M.J.; MARTIKAINEN, P.J. Bacterial biofilm formation on polyvinylchloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Res.**, v. 34, n.1, p. 63-70. 2000.

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

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.