

JUNIA CÁPUA DE LIMA NOVELLO

**IMPLANTAÇÃO DE ÍONS DE PRATA EM AÇO INOXIDÁVEL E
INFECÇÃO FÁGICA PARA O CONTROLE DE ADESÃO E
FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS NA INDÚSTRIA DE
ALIMENTOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

N939i
2012

Novello, Junia Cápua de Lima, 1979-
Implantação de íons de prata em aço inoxidável e infecção
fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes
bacterianos na indústria de alimentos / Junia Cápua de Lima
Novello. – Viçosa, MG, 2012.
xx, 112f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélio José de Andrade
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 86-112

1. Alimentos - Indústria. 2. Aço inoxidável. 3. Adesão.
4. Biofilmes. 5. Implantação iônica. 6. Bacteriófagos. 7. Prata.
8. *Listeria monocytogenes*. 9. *Pseudomonas fluorescens*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.024

JUNIA CÁPUA DE LIMA NOVELLO

**IMPLANTAÇÃO DE ÍONS DE PRATA EM AÇO INOXIDÁVEL E INFECÇÃO
FÚNGICA PARA O CONTROLE DE ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES
BACTERIANOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

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

APROVADA: 02 de maio de 2012.

Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Coorientadora)

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Joana Cecília Valente de
Rodrigues Azeredo

Antônio Fernandes de Carvalho

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

Dedico,
a *Deus*,
pela vida, saúde e oportunidade de realização deste trabalho.

À *Irmã Scheilla*,
por me iluminar e guiar cada passo.

Aos meus queridos pais, *Antônio e Elecir*, esposo, *Eleandro*, e irmãos, *André e Rodrigo*,
pelo amor e companheirismo que me fazem seguir mais forte.

Ao Professor Nélcio José de Andrade e demais professores da Universidade Federal
de Viçosa pelo conhecimento durante todos estes anos.

*“Pelo sonho é que vamos,
comovidos e mudos.
Chegamos? Não chegamos?
Haja ou não haja frutos,
pelo sonho é que vamos.
Basta a fé no que temos,
basta a esperança naquilo
que talvez não teremos.
Basta que a alma demos,
com a mesma alegria
ao que desconhecemos
e ao que é do dia-a-dia.
Chegamos? Não chegamos?
- Partimos. Vamos. Somos.”*

Sebastião Gama (1953).

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me guiou com seu amor.

Aos meus pais pelo sacrifício dos momentos de descanso durante minha infância para dedicar a minha alfabetização. Graças a esta formação educacional, pude realizar o sonho de chegar aqui.

Ao meu esposo Eleandro, pelo amor, pela cumplicidade, paciência e compreensão durante a realização deste trabalho. A caminhada está apenas iniciando...

Aos meus irmãos, André e Rodrigo, por estarem sempre comigo onde quer que eu esteja.

À “Grande família Capua de Lima”, pelo amor e carinho.

À família Novello (Vasco, Maria, Vagner e Tatiane) pelas palavras amigas que me fizeram seguir sempre firme e forte.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo em Portugal, BEX 5451/09-4, pelo Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE).

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade de Minho, Braga, Portugal, pela oportunidade de realização do doutorado e pelo aprendizado.

Ao querido professor Nélio José de Andrade pela orientação, amizade e pelos ensinamentos desde minha iniciação científica (2001) ao doutorado.

À Indústria Brinox, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, na pessoa do Engenheiro Joaquim Feijó, pela importante colaboração: doação das superfícies de aço inoxidável.

À querida professora Jane Sélia dos Reis Coimbra pela co-orientação, amizade, pelos conselhos e principalmente pelo incentivo para realização de um sonho: o doutorado sanduíche.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira, pela co-orientação, amizade e realização das análises de Microscopia de Força Atômica.

À querida professora Joana Azeredo, Universidade do Minho, pelos ensinamentos, pela paciência, confiança, simpatia e, principalmente, pela orientação valiosa neste trabalho.

À estimada professora Rosário de Oliveira, Universidade de Minho, pelos ensinamentos e amizade: és meu espelho profissional.

À professora Mariana Henriques pela amizade e ensinamentos.

Ao professor Pedro Grande, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelas implantações de prata nas superfícies de aço inoxidável.

À Deise Schäfer, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela paciência e grandiosa colaboração neste trabalho: RBS e implantação dos cupons. Serei sempre grata!

Ao professor Edmar Soares, Universidade Federal de Minas Gerais, pelas análises de Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio X (XPS).

Ao professor Luís Henrique Mendes, pelos ensinamentos e paciência. Quem sabe um dia eu possa saber tanto de físico-química como o senhor sabe!

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho pelos ensinamentos, conselhos e pela amizade.

À querida “Família *Biofilms Group*”, Universidade do Minho, pela convivência, amizade e, acima de tudo, ensinamentos. O Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) foi a minha casa durante um ano: vocês não imaginam o quanto cresci profissionalmente e pessoalmente neste um ano! “É pelo sonho que vamos...”

Às doutoras Pilar Teixeira, Diana Rodrigues e Sanna Sillankorva, Universidade de Minho, pela co-orientação e amizade.

À querida doutora Carina Almeida pela sonda e auxílio nas análises de PNA-FISH! Amiga, também agradeço muito pelos ensinamentos de todos os dias e pela

convivência! Nada como um “gelado do Mc” para dar energia para horas e horas de trabalho no LMA!

Ao professor Fabyano Fonseca e Silva, Universidade Federal de Viçosa, pela co-orientação e auxílio durante a fase de análise estatística dos resultados.

Ao Sr. Manuel Santos pela simpatia e por se prontificar nos cortes dos cupons de aço inoxidável para realização de parte deste trabalho.

Aos amigos Bartolomeu Souza, Sônia Silva, Fábiana Andrade, Luisa Ferreira, André Motta, Fábio Grassi, Henry Grassi, Melyssa Grassi e Miguel Cerqueira, por tudo que fizeram por mim durante um ano em Braga. Não há palavras que possam expressar meus agradecimentos.

Aos queridos amigos Priscila Pires, Laura Cerqueira, Célia Ferreira, Alexandre Maller, Bruna Leite, Douglas Monteiro, Virgínia Medeiros, Nadja Serrano, Rui, Nuno Martins, Poliana Melo, Victor Carneiro, Eduardo Pires, Rose Maria (Rosy), Vera Seabra, as “Margaridas”, Idalina Machado, Oto Freitas, Hector Ruiz, Dani Correia, Luís Melo, Hugo Oliveira, Sofia Gabriel, Isabel Carvalho, Eva Pinho, Elisa e Rita, pelo companheirismo e bons momentos vividos em Braga.

Às amigas Roberta Careli, Valéria Salustiano e Kelly Brabes, pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica.

A todos os colegas do Laboratório de Higiene Industrial/DTA pela convivência e colaboração.

À querida Geralda Costa, pela atenção, amizade e dedicação, não somente a mim, mas a todos os alunos do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV, especialmente Adão, José Tomaz (Perereca), Juarez, Sr. Luís, Lúcia, Sr. Manoel, Pio, Vaninha e Divino (*sempre presente em nossos corações*).

À amigas de luta Luciane Barreto e Ivana Sandri, pelo apoio durante o finalzinho deste trabalho.

As minhas amadas “irmãs” Amanda Santana, Christine Capua, Fernanda Pena, Lélia Capua, Lílian Teodoro, Marília Cruz, Marla Souza e Vanessa Castro pela amizade que sempre me fortalece!

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram e participaram durante estes 4 anos de aprendizado e crescimento.

BIOGRAFIA

JUNIA CÁPUA DE LIMA NOVELLO, filha de Antônio Luiz de Lima e Elecir Capua Rosa de Lima, nasceu em Ponte Nova, Estado de Minas, em 12 de junho de 1979.

Em maio de 2005, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Em agosto de 2005 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em agosto de 2007.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, defendendo tese em 02 de maio de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Mecanismo da adesão e formação de biofilmes microbianos	4
2.1.1 Aspectos físico-químicos na adesão microbiana.....	9
2.1.2 Biofilmes microbianos na indústria de alimentos.....	13
2.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> : bactérias formadores de biofilme em superfícies processadoras de alimentos.....	15
2.1.3.1 <i>L. monocytogenes</i>	15
2.1.3.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
2.1.4 Controle da adesão e formação de biofilmes	19
2.2 Modificação da superfície pela técnica de implantação iônica	22
2.2.1 Aplicações.....	27
2.3 Uso de prata como agente antimicrobiano.....	33
2.4 Utilização de bacteriófagos no controle de patógenos alimentares.....	35

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Preparo e caracterização dos cupons de aços inoxidáveis modificados pela técnica de implantação iônica.....	38
3.1.1 Superfícies implantadas.....	38
3.1.2 Implantação dos íons de prata em aço inoxidável.....	39
3.1.3 Avaliação química das superfícies.....	40
3.1.4 Microscopia de força atômica (MFA).....	40
3.1.5 Hidroicidade.....	41
3.2 Avaliação da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em cupons de aços inoxidáveis modificados pela técnica de implantação iônica.....	41
3.2.1 Micro-organismos.....	42
3.2.2 Preparo da suspensão de células vegetativas.....	42
3.2.3 Adesão do micro-organismo nas superfícies.....	42
3.2.4 Determinação do número de células aderidas.....	43
3.2.5 Determinação da hidrofobicidade da superfície bacteriana.....	44
3.3. Estudo da formação de biofilmes de células de <i>L. monocytogenes</i> em cultura simples e cultura mista com células de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em aço inoxidável e seu controle biológico.....	44
3.3.1 Micro-organismos e bacteriófago.....	44
3.3.2 Superfície metálica e de vidro e preparo.....	45
3.3.3 Determinação da hidrofobicidade.....	45
3.3.4 Determinação da produção do bacteriófago.....	45
3.3.5 Preparação da suspensão de células microbianas.....	46
3.3.6 Titulação da solução estoque de bacteriófago.....	47
3.3.7 Avaliação da formação de biofilmes bacterianos nas superfícies.....	47
3.3.8 Determinação do número de células nos biofilmes.....	48
3.3.9 Infecção fágica dos biofilmes.....	48
3.3.10 Determinação das unidades formadoras de colônia e placas fágicas.....	49

3.3.11 Fluorescência de hibridização <i>in situ</i> de peptídeo de ácidos nucleicos (<i>PNA FISH</i>) e coloração com DAPI das células em biofilme.....	49
3.4 Análises dos resultados.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Implantação iônica Ag ⁺¹ em aços inoxidáveis	52
4.1.1 Avaliação química das superfícies	52
4.1.2 Microscopia de força atômica (MFA).....	56
4.1.3 Hidroicidade	61
4.2 Número de células aderidas de <i>Listeria monocytogenes</i> em cupons de aços inoxidáveis modificados pela técnica de implantação iônica	67
4.3 Estudo da formação de biofilmes de células de <i>L. monocytogenes</i> em cultura simples e mista com células de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em aço inoxidável e seu controle biológico	72
4.3.1 Hidrofobicidade.....	72
4.3.2 Determinação do número de células em biofilme.....	73
4.3.3 Controle fágico das células microbianas em biofilmes	77
4.3.4 Fluorescência de hibridização <i>in situ</i> de peptídeo de ácidos nucleicos (<i>PNA FISH</i>) e coloração com DAPI das células em biofilme.....	81
5. CONCLUSÃO.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componente da tensão superficial de líquidos a 25 °C	10
Tabela 2 - Aplicações da implantação iônica na fabricação de dispositivos semicondutores	28
Tabela 3 - Características das superfícies de aço inoxidável e dos acabamentos nº 2B, 4, 6 e 8	39
Tabela 4 - Parâmetros utilizados para análise de espectroscopia fotoeletrônica de raio-X (XPS)	40
Tabela 5 - Ângulo de contato, componentes da tensão superficial e variação da energia livre de interação entre materiais iguais imersos em água (ΔG_{sws}^{TOT})	63
Tabela 6 - Valores da variação da energia livre total de interação (ΔG) entre as células de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 4031T e as superfícies de adesão de aços inoxidáveis AISI 304 e 430 em meio aquoso, com diferentes acabamentos (nº 2B, 4, 5 e 8), antes (ni) e após (i) a implantação de íon Ag^{+1} a 200 keV	66
Tabela 8 - Valores da variação da energia livre total de adesão (ΔG) entre as células de <i>L. monocytogenes</i> 747 ou <i>L. monocytogenes</i> 994 ou <i>P. fluorescens</i> ATCC 27663 (b) e a superfície de adesão de aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento nº 4 (s) em meio aquoso (l; considerou-se água; Tabela 1) e as suas componentes apolares (ΔG_{bls}^{LW}) e polares (ΔG_{bls}^{AB})	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais etapas na colonização de uma superfície	5
Figura 2 - Relação entre a variação de energia total de interação (ΔG) célula bacteriana e superfície e a força iônica do meio	7
Figura 3 - Modelo de adesão em uma única etapa de células microbianas em superfícies cujo ambiente apresenta baixa força iônica	8
Figura 4 - Esquema de um implantador iônico	22
Figura 5 - Esquema ilustrativo dos defeitos causados por íons leves (a) e pesados (b) após colisões na superfície alvo	26
Figura 6 - Mecanismos de ação de íons Ag^{+1}	34
Figura 7 - Placa de cultura de tecido com poços preenchidos com diferentes soluções, sendo que na coluna (a), há caldo triptona de soja (TSB) enriquecido com extrato de levedura (YE) e células de <i>Listeria monocytogenes</i> CETC 4031T; na coluna (b), meio mínimo para retirada das células planctônicas e; na coluna (c), cupons de aço inoxidável não implantados de íons Ag^{+1} imersos em meio mínimo	43
Figura 8 - Contagem do número de unidades formadoras de placas (PFU). O halo preto indica a presença de uma unidade formadora de placa	47
Figura 9- Espectros de RBS de amostras de aços inoxidáveis: (a) austenítico AISI 304, acabamento 8, com Ag^{+1} implantada na energia 200 keV (seta vermelha) e (b) ferrítico AISI 430, acabamento 2B, com Ag^{+1} implantada na 70 keV (seta vermelha)	53
Figura 10- Espectros de RBS para amostras de aços inoxidáveis com íons Ag^{+1} implantados para amostras de aço inoxidável AISI 304, acabamento nº 2B	54
Figura 11 - Espectro de XPS de amostras de aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento nº 8 (a) e ferrítico AISI 430 (b), acabamento nº 8, com e sem implantação de íons Ag^{+1} , após o <i>sput</i> (calibração)	55

- Figura 12 – Parâmetros de rugosidade (R_a e R_z) para as diferentes superfícies de aço inoxidável (304 e 430), com diferentes acabamentos (n° 2B, 4, 5 e 8) e com (i) e sem (ni) implantação com íons de Ag^{+1} 56
- Figura 13 – Topografia das superfícies de aço inoxidável AISI 304 com diferentes acabamentos (n° 2B, 4, 5 e 8) e com (i) e sem implantação (ni) de íons Ag^{+1} : (a) AISI 304, n° 2B, i, a 200 keV; (b) AISI 304, n° 2B, i, 70 keV; (c) AISI 304, n° 2B, ni; (d) AISI 304, n° 4, i, a 200 keV; (e) AISI 304, n° 4, ni; (f) AISI 304, n° 5, i, a 200 keV; (g) AISI 304, n° 5, ni; (h) AISI 304, n° 8, i, a 200 keV; (i) AISI 304, n° 8, ni 59
- Figura 14 – Topografia das superfícies de aço inoxidável AISI 430 com diferentes acabamentos (n° 2B, 4, 5 e 8) e com (i) e sem implantação (ni) de íons Ag^{+1} , a 200 keV: (a) AISI 430, n° 2B, i; (b) AISI 430, n° 2B, ni; (c) AISI 430, n° 4, i; (d) AISI 430, n° 4, ni; (e) AISI 430, n° 5, i; (f) AISI 430, n° 5, ni; (g) AISI 430, n° 8, i; (h) AISI 430, n° 8, ni 60
- Figura 15 - Logarítmo do número de células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 4031T (CFU) em diferentes superfícies de aço inoxidável antes e após implantação com íons Ag^{+1} 68
- Figura 16 - Logarítmo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* 747 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 em biofilmes (CFU) em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4, em diferentes temperaturas 74
- Figura 17 - Logarítmo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* 994 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 em biofilmes (CFU) em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4, em diferentes temperaturas 75
- Figura 18 - Logarítmo do número de células viáveis de *P. fluorescens* ATCC 27663 planctônicas ou aderidas (CFU), quando em biofilmes simples, em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4, após infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A 78
- Figura 19 - Logarítmo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* 747 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 planctônicas ou aderidas (CFU), quando em biofilmes misto, em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4, antes e após infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A 79
- Figura 20 - Logarítmo do número de bacteriófagos ϕ IBB-PF7A (PFU) em suspensão e em biofilme simples ou misto, de *P. fluorescens* ATCC 27663 com *L. monocytogenes* 747 81

Figura 21- Imagens de microscopia de epifluorescência de biofilmes de *L. monocytogenes* 747 (cor verde) utilizando a sonda LmPNA1253 (a) e *P. fluorescens* ATCC 27663 coradas com fluorocromo DAPI (cor azul) (b), em superfícies de vidro, a 25 °C, em cultura simples; biofilmes simples de *P. fluorescens* ATCC 27663 em superfícies de vidro após infecção com bacteriófagos ϕ IBB-PF7A (c); biofilme misto de *P. fluorescens* ATCC 27663 e *L. monocytogenes* 747, sem infecção (d) e (e) e com fágica (f)

RESUMO

NOVELLO, Junia Cápua de Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Implantação de íons de prata em aço inoxidável e infecção fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: Sukarno Olavo Ferreira e Jane Sélia dos Reis Coimbra.

A adesão e a formação de biofilme bacterianos em superfícies de contato com alimentos, além de contaminar o produto durante o processamento, o que pode resultar em corrosão de superfícies de equipamentos e bloqueio de tubulações, pode também ocasionar doenças de origem alimentar, o que acarreta em perdas econômicas e, principalmente, em problemas de saúde pública. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade de adesão de *Listeria monocytogenes* CECT 4031T em superfícies de aço inoxidável austeníticos (AISI 304) e ferríticos (AISI 430) implantadas com íons Ag^{+1} ; estudar a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* (estirpes 747 e 994) em cultura simples e mista com células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663 em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4 e o biocontrole do biofilme de *L. monocytogenes* 747 em cultura mista com *P. fluorescens* ATCC 27663 por meio da infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A. Íons Ag^{+1} foram implantados em aço inoxidável austenítico AISI 304 e ferrítico AISI 430, acabamentos n° 2B, 4, 6 e 8, com a energia de 200 keV, e em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 2B, com a energia de 70 keV. A profundidade dos íons Ag^{+1} , composição química, hidrofobicidade, qualitativa e quantitativa, e rugosidade para as superfícies de aço inoxidável foram avaliadas por espectrometria de retroespalhamento de Rutherford (RBS), espectroscopia fotoeletrônica de raio-X

(XPS), ângulo de contato e microscopia de força atômica, respectivamente. Avaliaram-se as hidrofobicidades qualitativa e quantitativa das estirpes bacterianas, *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*. Utilizou-se a técnica de fluorescência de hibridização *in situ* de peptídeo de ácidos nucleicos (*PNA Fish*) para a avaliação do biofilme de *L. monocytogenes* 747, em cultura simples ou mista com *P. fluorescens*, antes ou após infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A. Os íons Ag^{+1} implantados com energia de 200 keV apresentaram profundidade média de 25 nm e, quando implantados com energia de 70 keV, estes íons encontraram-se mais superficiais, com uma profundidade média de 15 nm. As análises de XPS confirmaram a presença da prata nas superfícies implantadas. Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) de rugosidade (R_a e R_z) entre as superfícies de aço inoxidável. O aço inoxidável AISI 430, acabamento n° 4, com íons Ag^{+1} , apresentou maior rugosidade e o aço inoxidável AISI 430, acabamento n° 8, com e sem íons Ag^{+1} , menor. Após a implantação de Ag^{+1} , houve redução significativa ($p < 0,05$) dos ângulos de contato com a água (θ_w) e variações da energia livre de interação entre superfícies iguais imersas em água (ΔG_{SWS}^{TOT}). O aço inoxidável AISI 430, acabamento n° 8, sem íons Ag^{+1} implantados, apresentou maior hidrofobicidade (- 64,67 mJ.m⁻²). O número de células de *L. monocytogenes* CECT 4031T aderidas nos materiais avaliados variou significativamente ($p < 0,05$), com menor valor para o aço inoxidável AISI 304, acabamento n° 2B, com prata implantada a 70 keV ($2,63 \pm 0,32$ log CFU.cm⁻²). Não houve concordância entre o número de células aderidas de *L. monocytogenes* CECT 4031T e a variação da energia livre total de interação ($\Delta G_{adesão}$). Não se constatou relação direta entre o número de células aderidas e a rugosidade das superfícies de aço inoxidável. As células de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* apresentaram-se hidrofílicas. A maior variação de energia livre total de interação foi observada para *P. fluorescens* (- 27,91 mJ.m⁻²). *L. monocytogenes* 747 e 994, em cultura simples, apresentaram capacidade de adesão a 4 °C e de formar biofilme a 25 °C e a 37 °C em aço inoxidável AISI 304, acabamento n° 4. Observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no número de células viáveis em biofilmes simples de *P. fluorescens*, nas temperaturas avaliadas, com as contagens de 7,26 log CFU.cm⁻² a 25 °C e a 5,26 log CFU.cm⁻² a 37 °C. O número de células viáveis para as bactérias avaliadas, nas formas planctônicas ou em biofilmes simples, diminuiu ($p < 0,05$), após contato com o bacteriófago ϕ IBB-PF7A, em 5,5 ciclos logarítmicos, após 6 h, e em 2,03 ciclos logarítmicos, após 24 h. Houve redução significativa ($p < 0,05$) no número

de células viáveis de *P. fluorescens*, em biofilme misto com *L. monocytogenes* 747, após 6 h de contato com bacteriófago (5,6 ciclos logarítmicos). Entretanto, a redução do número de células de *P. fluorescens* (2,19 ciclos logarítmicos) não foi significativa ($p > 0,05$), após 24 h. A partir deste tempo, houve aumento da população, o que foi atribuído à resistência bacteriana ao bacteriófago, possivelmente iniciada em células planctônicas. Nas imagens de microscopia de epifluorescência observou-se que *L. monocytogenes* 747 e para *P. fluorescens* aderiu e formou biofilme nas superfícies de vidro, em cultura simples e mistas, a 25 °C. Observou-se também que a estrutura do biofilme continha células de *P. fluorescens* e *L. monocytogenes* 747, com formação de uma monocamada mista. A implantação de íons Ag^{+1} propiciou redução no número de células aderidas de *L. monocytogenes* em aço inoxidável. A infecção fágica ocasionou a redução, no tempo inicial, do número de células aderidas de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em biofilmes. Este trabalho mostra-se como um importante passo na pesquisa de novas tecnologias que podem ser empregadas para reduzir ou impedir a adesão e a formação de biofilmes bacterianos.

ABSTRACT

NOVELLO, Junia Cápua de Lima, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Implantation of silver ion in stainless steel and phage infection to control of bacterial adhesion and biofilm formation in food industry.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Sukarno Olavo Ferreira and Jane Sélia dos Reis Coimbra.

The bacterial adhesion and biofilm formation on food contact surfaces can lead to the increased in corrosion of equipment surfaces and pipes blockage. Moreover, it can also cause foodborne illness, which results in economic losses, and, especially, in public health problems. The aims of this work were to evaluate the adhesion of *Listeria monocytogenes* CECT 4031T on the austenitic stainless steel (AISI 304) and ferritic (AISI 430) surfaces implanted with Ag⁺¹ ions; study the biofilm formation of *L. monocytogenes* (strains 747 and 994) in single and mixed culture with cells of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663 on austenitic stainless steel surfaces, AISI 304, finishing #4, in the biofilm and; study the biocontrol of *L. monocytogenes* 747 in mixed culture with *P. fluorescens* ATCC 27663 by infection with bacteriophage ϕ IBB PF7A. Ag⁺¹ ions were implanted in austenitic stainless steel, AISI 304, and ferritic surfaces, AISI 430, finishing #2B, 4, 6 and 8, with the energy of 200 keV, and austenitic stainless steel, AISI 304, finish #2B, with the energy of 70 keV. The depth of Ag⁺¹ ions, chemical composition, hydrophobicity (qualitative and quantitative), and roughness for stainless steel surfaces were evaluated by Rutherford backscattering spectrometry (RBS) spectroscopy, X-ray photoelectron (XPS), contact angle and atomic force microscopy, respectively. Qualitatively and quantitatively hydrophobicity for bacterial strains, *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*, were also evaluated. The

technique of fluorescence *in situ* hybridization of peptide nucleic acids (PNA Fish) was used to study the biofilm formation ability of *L. monocytogenes* 747 in single or mixed culture with *P. fluorescens*, before or after infection with bacteriophage- ϕ IBB-PF7A. The results showed that Ag^{+1} ions implanted with energy of 200 keV presented an average depth of 25 nm and, when implanted with energy of 70 keV, these ions were found shallower, with an average depth of 15 nm. Additionally, the XPS analyzes confirmed the presence of silver in the implanted surfaces. There was significant difference ($p < 0.05$) between the roughness surfaces of stainless steel (R_a and R_z). Ferritic stainless steel, AISI 430, finishing # 4, with Ag^{+1} ions showed highest roughness and ferritic stainless steel, AISI 430, finishing #8, with and without Ag^{+1} lowest. After implantation of Ag^{+1} , it was possible to observe a significant reduction on values of the contact angles with water (θ_w) ($p < 0.05$) and alterations on the free energy of interaction between identical surfaces immersed in water (ΔG_{SWS}^{TOT}). Ferritic stainless steel, AISI 430, finishing #8, without Ag^{+1} ions implanted, showed highest values of hydrophobicity ($- 64.67 \text{ mJ.m}^{-2}$). The number of *L. monocytogenes* CECT 4031T cells adhered proved to be materials dependents ($p < 0.05$), with lowest values for stainless steel, AISI 304, finishing #2B, with silver implanted at 70 keV ($2.63 \pm 0.32 \text{ log CFU.cm}^{-2}$). Furthermore, there was no correlation between the number of adhered cells of *L. monocytogenes* CECT 4031T and the variation of the total free energy of interaction ($\Delta G_{adhesion}$). Important is to emphasize that no direct relationship was observed between the number of adhered cells and the roughness of the surfaces of stainless steel. *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* cells shown to be hydrophilic, and the greatest variation in total free energy of interaction was observed for *P. fluorescens* ($- 27.91 \text{ mJ.m}^{-2}$). *L. monocytogenes* 747 and 994, in single culture, were able to adhere at 4 °C and formed biofilms at 25 °C and 37 °C in stainless steel AISI 304, finishing #4. Moreover, there was significant difference ($p < 0.05$) in the number of viable cells in single biofilms of *P. fluorescens* under the tested temperatures measured with scores of 7,26 log CFU.cm⁻², at 25 °C, and 5,26 log CFU.cm⁻², at 37 °C. The number of viable bacteria cells measured in planktonic forms or single biofimes decreased ($p < 0.05$) after contact with the ϕ IBB-PF7A bacteriophage, reaching 5.5 log reduction, after 6 h, and 2.03 log reduction, after 24 h. In mixed biofilms with *L. monocytogenes* 747, it was also observed a reduction in the number of *P. fluorescens* viable cells ($p < 0.05$), after 6 h with phage contact, reaching 5.6 log reduction. However, after 24 h, the reduction in the number of *P.*

fluorescens cells was not significant ($p > 0.05$) (2.19 log reduction). From this time, there was an increase of population, which can be attributed to bacterial resistance to phage, possibly initiated during planktonic cells lifestyle. Epifluorescence microscopy images allow us to confirm that both *L. monocytogenes* 747 and *P. fluorescens* were able to form biofilms on glass surfaces in single and mixed culture at 25 °C. It was also observed that the structure of biofilm of *P. fluorescens* and *L. monocytogenes* 747 consists of a monolayer of cells with a mixture of both microorganisms. Important is to highlight that the Ag^{+1} ion implantation is a causative agent able for reducing the number of adhered cells of *L. monocytogenes* to stainless steel. In the initial time, phage infection was able to cause a reduction on the number of adhered cells of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* in biofilms. So, this work presents itself as an important step in researching new technologies that can be employed to reduce or prevent bacterial adhesion and biofilms formation.

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos, o controle de micro-organismos contaminantes constitui um desafio para a indústria de alimentos. Superfícies de equipamentos utilizados na indústria de alimentos estão associadas a ocorrência de surtos e casos de doenças de origem alimentar. Dentre os materiais mais utilizados na construção de equipamentos e utensílios encontra-se o aço inoxidável. Embora seja uma superfície lisa, comparada com outros materiais, apresenta irregularidades capazes de proteger bactérias e impedir a remoção destas durante os procedimentos de higienização. Uma vez na superfície, estes micro-organismos depositam, interagem nas superfícies, iniciam multiplicação e, ao se liberarem, podem contaminar os alimentos e, em consequência, ocasionar doenças de origem alimentar. Por esta razão, equipamentos utilizados para processar alimentos podem ser fontes potenciais de micro-organismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, e micro-organismos deteriorantes, como *Pseudomonas fluorescens*.

Uma forma conveniente de evitar a contaminação alimentar é prevenir a adesão e a formação de biofilme bacteriano. Alternativas tecnológicas vêm sendo desenvolvidas e testadas no controle destes processos, dentre elas a modificação de superfícies, como o aço inoxidável, com elementos químicos antimicrobianos, como prata, por meio da técnica de implantação iônica.

Embora existam muitos trabalhos com o propósito de modificação do aço inoxidável pela técnica de implantação iônica para a área médica, não há estudos que relatam o seu emprego para modificação destes materiais utilizados para processar alimentos. Por isso, este trabalho mostra-se como um importante passo na pesquisa de novas tecnologias que podem ser empregadas para reduzir ou

impedir a adesão e a formação de biofilmes microbianos. Além desta técnica, o biocontrole por meio da utilização de bacteriófagos também representa uma alternativa.

A criação de novas superfícies para a fabricação de equipamentos, assim como o emprego de bacteriófagos nos processos de higienização industrial, podem auxiliar na prevenção da contaminação dos alimentos e, em consequência, evitar surtos de intoxicações e infecções, o que diminui gastos com medicamentos, internações hospitalares e absenteísmo no trabalho.

O objetivo geral deste trabalho foi o de estudar a eficácia destes métodos inovadores para controlar a adesão e a formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* e *P. fluorescens* em superfícies de aço inoxidável.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Modificar as superfícies de aço inoxidável austenítico AISI 304 e ferrítico AISI 430 com diferentes acabamentos pela técnica de implantação iônica com Ag^{+1} ;
- b) Avaliar a adesão de células de *L. monocytogenes* nas superfícies de aço inoxidável antes e após modificação com Ag^{+1} , fundamentada em conceitos de físico-química de superfície, com enfoque no cálculo da variação da energia livre de Gibbs das interações superfície/micro-organismo;
- c) Caracterizar a topografia e composição das superfícies de aço inoxidável antes e após sua modificação por implantação de íons;
- d) Estudar a formação de biofilmes de células de *L. monocytogenes* em cultura simples e mista com células de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento nº 4;
- e) Estudar o controle da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* quando em cultura mista com *P. fluorescens* por meio da infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A formação de biofilme conduz a problemas de higiene e perdas econômicas por causa da deterioração do alimento e persistência de patógenos, o que reduz o prazo de validade dos produtos desde o processamento até a comercialização (BEER et al., 1994; FORSYTHE, 2002).

Muitos micro-organismos estão envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes. Bactérias alteradoras e patogênicas podem participar de processos de adesão e, eventualmente, originar problemas de saúde pública ou de ordem econômica. Dentre as alteradoras encontram-se: *Pseudomonas fluorescens* (ALLISON et al., 1998; ROSSONI; GAYLARDE, 2000; VALCARCE et al., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (PARSEK; GREENBERG, 2000), *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. (CRIADO et al., 1994) e *Shewanella putrefaciens* (HJELM et al.; 2002). Entre as bactérias patogênicas incluem-se: *Listeria monocytogenes* (BERESFORD, et al., 2001; LEJEUNE, 2003), *Escherichia coli* O157:H7 (DEWANTI; WONG, 1995), *Staphylococcus aureus* (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; LEREBOUR et al., 2004), *Yersinia enterocolitica* (HERALD; ZOTTOLA, 1988), *Salmonella* Thyphimurium (DOYLE, 1992; SMITH; FRATAMICO, 1995; LEJEUNE, 2003), *Vibrio parahaemolyticus* (WONG et al., 2002), *Campylobacter jejuni* (KUUSELA et al., 1989) e *Klebsiella pneumoniae* (DI MARTINO et al., 2003).

Muitas destas bactérias causam infecções e intoxicações, o que pode resultar em taxas expressivas de mortalidade e no aumento dos custos assistenciais, em decorrência de despesas hospitalares, perdas de horas de trabalho e de gastos com a recuperação da doença. Aproximadamente 25% dessas doenças estão envolvidos a matéria-prima, os equipamentos e os utensílios contaminados, sujeitos, portanto, à formação de processos de adesão microbiana (TROLLER, 1993).

Nos Estados Unidos, há um gasto anual de, aproximadamente, 10 a 83 bilhões de dólares no tratamento das doenças de origem alimentar, considerando-se todas as formas de contaminação dos alimentos. Adicionalmente, tem-se a previsão de que neste país ocorram, anualmente, 76 milhões de casos intoxicações e infecções, 325.000 hospitalizados e 5.000 mortes. Micro-organismos patógenos são responsáveis por 14 milhões destes casos, sendo 60.000 hospitalizados e 1.800 mortes. *Listeria*, *Salmonella* e *Toxoplasma* são micro-organismos responsáveis por 1.500 óbitos (MEAD et al., 1999; CDC, 2011).

De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (*Center for Disease Control*) (CDC, 2011), apenas em 2007, nos Estados Unidos, 17.883 casos de infecções foram confirmados em laboratórios, dentre estes destacam-se os relatados para *Salmonella* (6.790 casos), *Escherichia coli* O157 (547 casos) e *Listeria monocytogenes* (122 casos).

2.1 Mecanismo da adesão e formação de biofilmes microbianos

A colonização microbiana e consequente formação de biofilmes são governadas por processos químicos, físicos e microbiológicos (GARRETT et al., 2008). A adesão do micro-organismo é a etapa inicial para a formação destas estruturas, o que resulta no acúmulo de biomassa e materiais extracelular na superfície de um substrato (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990; VALCARCE et al., 2002; HORI; MATSUMOTO, 2010).

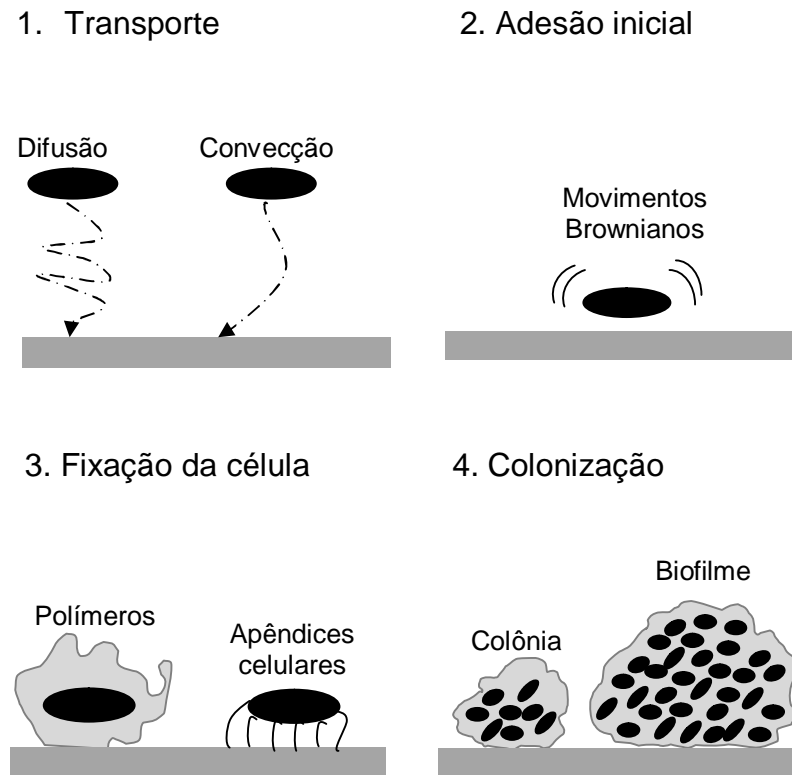
A adesão microbiana em superfícies pode ser definida como a energia necessária para uma união entre o suporte e a célula, ou seja, o trabalho necessário para removê-la e retorná-la ao seu estado original (AZEREDO et al., 2011).

De acordo com Fletcher (1980), o acúmulo de micro-organismos em uma superfície é descrita como um processo de três estágios. No primeiro ocorre a adsorção ou acúmulo de organismos. Em seguida, na segunda fase, há adesão ou consolidação da célula e, por fim, no terceiro estágio, o micro-organismo multiplica e coloniza o substrato.

Embora este modelo seja útil, não há descrição detalhada das etapas que ocorrem durante as interações célula - substrato ou entre célula - célula (GARRETT et al., 2008). Assim, alguns anos depois, Characklis e Marshall (1990) descreveram o mecanismo de adesão e colonização da superfície como um processo de oito

etapas que incluem principalmente a formação inicial de um filme condicionante, a adesão reversível e irreversível e o desprendimento de células de um biofilme maduro para subsequente recolonização. Na Figura 1 destacam-se algumas das etapas envolvidas.

Figura 1 – Principais etapas na colonização de uma superfície.



Fonte: Oliveira, 2001.

O filme condicionante é estabelecido nos primeiros 5 a 10 s (MITTELMAN, 1998) pela ação da força gravitacional ou pelo movimento do fluido que conduzirá partículas orgânicas e inorgânicas, como lipídeos, sais minerais e proteínas, à superfície do substrato em meio aquoso (DUNNE et al., 2002; GARRETT et al., 2008). Segundo Chamberlain (1992), a velocidade de formação deste filme varia conforme a concentração de partículas e sua afinidade com o suporte e a condição hidrodinâmica do meio. Além disso, as características superficiais do suporte, como, por exemplo, rugosidade, hidrofobicidade e tensão interfacial, podem influenciar nesta velocidade de formação (MARSHALL; BLAINEY, 1990). A carga, a tensão e o potencial do substrato podem ser alterados favoravelmente após constituição do

filme, o que pode facilitar ou dificultar a adesão bacteriana (FLETCHER, 1992; GARRETT et al., 2008).

Outro passo importante para a fixação microbiana é o seu transporte à superfície. Segundo Characklis (1981), em fluidos em repouso, o micro-organismo desloca por difusão por causa dos movimentos Brownianos (deslocamento médio de 40 $\mu\text{m/h}$) ou ainda por causa da mobilidade resultante dos apêndices celulares. Contudo, em fluidos em movimento, a aproximação das células à superfície é resultante da convecção, em que a velocidade do transporte convectivo é superior a de difusão.

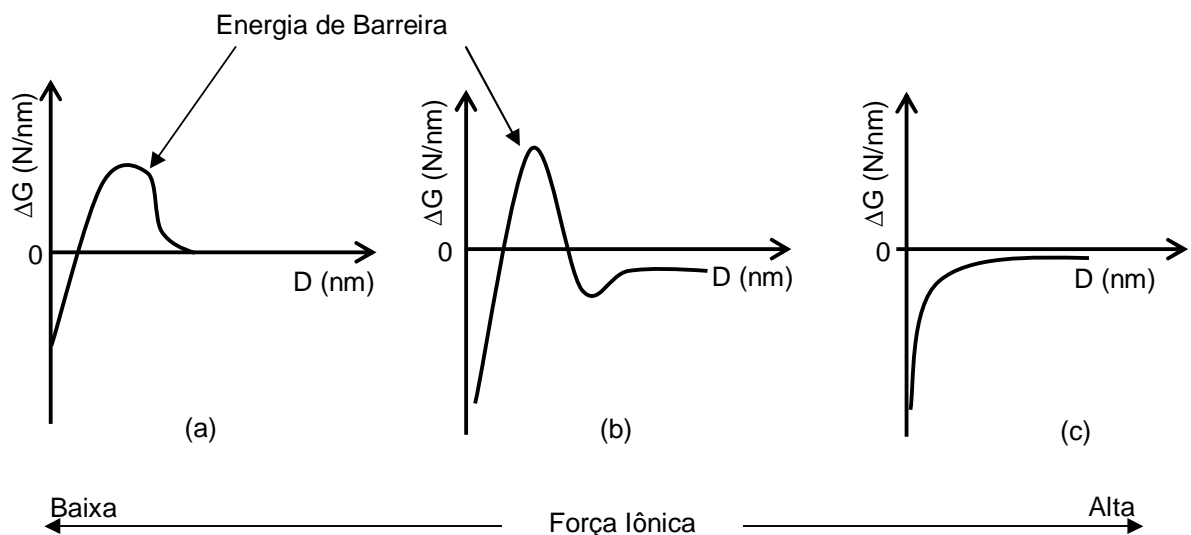
Com o transporte celular, na vizinhança de uma superfície (50 nm), a adesão inicial entre célula e superfície, ocorre e, em consequência de forças de curto e longo alcance, um processo reversível ou irreversível se inicia. No primeiro caso, processo reversível, o micro-organismo, após se fixar à superfície, continua a exibir movimentos Brownianos, sendo removido graças à ação de forças de tensão de corte, ou então, pelo próprio movimento celular. Neste momento, há também a ação de forças de longo alcance, van der Waals e eletrostáticas, que fixam a célula à superfície. Contudo, quando o micro-organismo deixa de exibir movimentos Brownianos, a adesão torna-se irreversível, sendo dificilmente removido da superfície (CHARACKLIS, 1981).

Assim, a carga superficial do micro-organismo, adquirida quando imersos em soluções aquosas, é também outro fator determinante durante a etapa de adesão. Isso pode ocorrer por adsorção de íons ou ionização de grupos químicos, uma vez que na superfície celular existem compostos ácidos (carboxílicos e fosfato) e básicos (grupos amina) que reagem com os íons OH^- e H_3O^+ presentes na solução. Além disso, este fenômeno é dependente do pH do meio, sendo que em soluções próximas da neutralidade, as bactérias possuem uma carga global negativa em consequência de haver um maior número de grupos fosfato e carboxílicos. Contudo, quando o pH é muito baixo, as bactérias podem apresentar uma carga global positiva, por causa da predominância de grupos amina (OLIVEIRA, 2001).

Portanto, se a bactéria e a superfície apresentarem o mesmo sinal e o meio apresentar baixa força iônica, haverá um máximo de energia potencial, ou energia de barreira, e um mínimo de energia, designado mínimo primário, que se localiza a uma distância inferior a 2 nm da superfície (Figura 2A). A redução da energia de barreira ocorre quando se aumenta a força iônica do meio, em consequência da

diminuição da energia potencial da dupla camada elétrica. Quando o meio apresenta valores intermediários de força elétrica (Figura 2B), o máximo de energia diminui, mas aparece um mínimo secundário. Nestas condições, o máximo de energia é em geral baixo e o seu valor é tanto menor quanto menor for a partícula. Se o máximo de energia for ultrapassado e o mínimo primário for alcançado, a ligação entre a bactéria e o substrato torna-se irreversível. O mínimo secundário situa-se entre 5 nm a 20 nm da superfície e pode ser tanto mais profundo quanto maiores forem as forças atrativas de van der Waals e conseqüentemente, quanto maior for o tamanho das partículas. Contudo, caso os valores da força iônica do meio forem elevados (Figura 2C), a energia potencial de interação será sempre negativa e, conseqüentemente, todas as partículas poderão atingir o mínimo primário. Se ambos, micro-organismo quanto substrato, apresentarem cargas de sinal oposto, sendo as forças eletrostáticas atrativas e, conseqüentemente, o mínimo primário será facilmente atingido, o que resulta em uma adesão forte e irreversível (AZEREDO et al., 2011; FLETCHER, 1988).

Figura 2 - Relação entre a variação de energia total de interação (ΔG) célula bacteriana e superfície e a força iônica do meio.

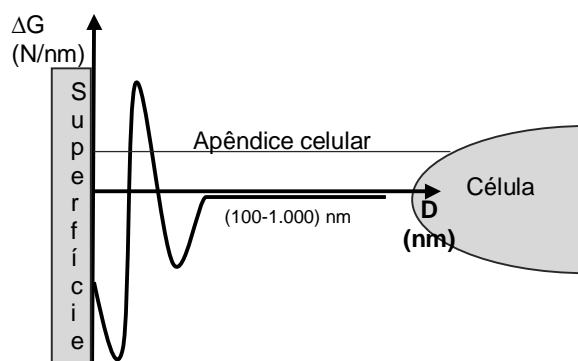


Fonte: Adaptado: Azeredo et al., 2011.

Alguns micro-organismos são capazes de aderir firmemente a substratos em ambientes de baixa força iônica (Figura 3). Nestas situações a adesão pode ser explicada pelo fato de as células apresentarem estruturas extracelulares, como

fímbrias e *pilus*, ou produzirem exopolissacarídeos, capazes de ultrapassar a barreira de energia imposta pelas forças eletrostáticas repulsivas e reduzir a distância entre ambos (HORI; MATSUMOTO, 2010; AZEREDO et al., 2011).

Figura 3 - Modelo de adesão em uma única etapa de células microbianas em superfícies cujo ambiente apresenta baixa força iônica.



Fonte: Adaptação: Hori; Matsumoto, 2010.

Assim, é estabelecida uma interação firme entre célula e superfície por meio de ligações físico-químicas específicas, como ligações covalentes, iônicas e de hidrogênio, ou ainda por meio de ligações estabelecidas por estruturas extracelulares específicas produzidas pelos micro-organismos, apêndices celulares filamentosos (fímbrias, flagelos e *pilus*) ou polímeros extracelulares (adesinas) (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990). Uma vez firmemente aderidas, um processo de etapas múltiplas inicia e conduz na formação de uma complexa comunidade microbiana (BOS et al., 1999), nas quais células se multiplicam e originam novas camadas, umas sobre as outras, formando-se então, microcolônias que se desenvolvem dando origem a um filme biológico. Muitos micro-organismos são capazes de excretar macromoléculas (polissacarídeos e proteínas) que constituem uma matriz (glicocálix) onde as células microbianas ficam embebidas, não sendo necessariamente uniforme durante um período de tempo e espaço. Esta estrutura é conhecida como biofilme (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990).

Há evidências de que o desenvolvimento primário, a maturação e o desprendimento do biofilme são regulados por moléculas sinalizadores, como homoserinas lactonas aciladas, sintetizadas por meio da expressão gênica celular. Uma vez totalmente maduro, um biofilme apresenta padrões alterados de multiplicação, cooperação fisiológica e eficiência metabólica entre as células

bacterianas (DUNNE, 2002). Entretanto, estas diferenças são responsáveis pela origem de um sistema biológico com alto nível de organização, em que bactérias formam comunidades funcionais, estruturadas e coordenadas (DAVEY; O'TOOLE, 2000) que se assemelham a um tecido eucariota primitivo (DUNNE, 2002).

2.1.1 Aspectos físico-químicos na adesão microbiana

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para descrever e, simultaneamente, prever a adesão bacteriana em superfícies. Em geral, a adesão pode ser ilustrada pela teoria Termodinâmica, a qual utiliza a equação modificada de Dupré (Equação 1); a teoria DLVO, cuja denominação decorre das iniciais dos nomes dos pesquisadores que a descreveram: Derjaguin e Landau, em 1941, e Verwey e Overbeek, em 1948 e; DLVO Estendida, teoria que complementa a anterior (SHARMA; HANUMANTHA RAO, 2003).

Na Teoria Termodinâmica, a adesão ocorrerá se durante o processo houver redução da variação da energia livre de Gibbs total (energia livre de adesão, ΔG^{TOT}). Neste modelo (Equação 1), não são consideradas as interações eletrostáticas e as interações específicas mediadas por exopolímeros ou apêndices extracelulares (VAN OSS, 1991; AZEREDO et al., 2011):

$$\Delta G^{TOT} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad (1)$$

em que γ_{sb} é a tensão superficial entre superfície e bactéria, γ_{sl} a tensão superficial entre superfície e líquido e, por fim, γ_{bl} a tensão superficial entre bactéria e líquido, sendo as unidades expressas em mJ.m^{-2} (VAN OSS, 1991).

A adesão de um micro-organismo a uma superfície sólida em solução aquosa só se estabelece se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido e a interface superfície de adesão/líquido terão que ser substituídas pela interface bactéria/superfície de adesão (CHAVES, 2004).

Como todo sistema na natureza, a interação micro-organismo e superfície também irá proceder em direção à diminuição de energia livre. Isso significa que a adesão do micro-organismo ocorrerá se ΔG^{tot} for negativa, mas será termodinamicamente desfavorável, se for positiva. O cálculo das tensões superficiais γ_{sl} e γ_{bl} é possível pela obtenção da medida do ângulo de contato (θ) entre

substrato, ou bactéria, com líquidos - padrão cuja componente da tensão interfacial é conhecida (Tabela 1) (SHARMA; HANUMANTHA RAO, 2003).

Tabela 1 - Componente da tensão superficial de líquidos a 25 °C.

Líquido	Tensão Interfacial (mJ.m ⁻²)			
	γ_i^{TOT}	γ_i^{LW}	γ_i^+	γ_i^-
Di-iodometano	50,8	50,8	0,0	0,0
α -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Glicerol	64,0	34,0	3,92	57,4
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6
Decano	23,8	23,8	0,0	0,0

γ_i^{TOT} - Tensão superficial total ; γ_i^{LW} - Tensão superficial relativa a componente de Lifshitz – van der Waals; γ_i^+ - Tensão superficial relativa a componente base de Lewis; γ_i^- - Tensão superficial relativa a componente ácido de Lewis.

Fonte: van der Mei et al., 1997.

Quando é utilizada a teoria DLVO os micro-organismos são considerados partículas quimicamente inertes, ou seja, seriam como colóides liofóbicos. Isso ocorre uma vez que a maioria das bactérias não excede 2,0 μm de comprimento e a sua densidade é superior a da água, podendo ser considerada, nesse caso, como partículas coloidais vivas (MARSHALL, 1976). Todavia, não há consideração dos aspectos microbiológicos da adesão. Essa teoria afirma que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz - van der Waals e as forças de dupla camada elétrica (Equação 2), que geralmente são repulsivas.

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{EL} + \Delta G^{LW} \quad (2)$$

em que ΔG^{EL} é a energia livre das forças da dupla camada elétrica e ΔG^{LW} , a energia livre das forças da Lifshitz - van der Waals (VAN OSS et al., 1990). A intensidade destas forças é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que interagem e na razão inversa da distância à superfície.

A superfície de um sólido eletricamente carregado em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário desse meio e simultaneamente repele os de sinais iguais. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa em solução, as forças da dupla camada elétrica apresentam, geralmente, um caráter repulsivo (OLIVEIRA, 2006). Dessa maneira, a adesão somente será irreversível

quando a variação energia livre de Gibbs total for negativa ($\Delta G^{TOT} < 0$), e a distância entre a superfície e o micro-organismo for mínima tanto quanto possível, entre 2 nm a 5 nm.

A teoria DLVO considera apenas a atração das forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula ou micro-organismo está muito próximo (2 nm - 5 nm) de uma superfície, forças de curto alcance passam a regular o processo. Tais forças, denominadas não-DLVO, são representadas pelas forças de repulsão de Born, forças de hidratação, interações hidrofóbicas e pontes poliméricas (ELIMELECH, 1995).

Van Oss e uma equipe de pesquisadores, em 1994, integraram os aspectos termodinâmicos da adesão à teoria DLVO. Essa teoria ficou conhecida como XDLVO, ou DLVO Estendida, e considerou as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas. A variação da energia livre das interações totais numa superfície (ΔG^{TOT}) (Equação 3) é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz - van der Waals (ΔG^{LW}), interações ácido-base de Lewis (ΔG^{AB}), forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (ΔG^{EL}) e interações resultantes dos movimentos Brownianos (ΔG^{BR}) (VAN OSS, 1991):

$$\Delta G^{TOT} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{EL} + \Delta G^{BR} \quad (3)$$

O contato direto entre a bactéria e o substrato pode ser estabelecido em nível molecular por meio de substâncias poliméricas extracelulares sintetizadas. Esses compostos não estão sujeitos ao mesmo tipo de repulsão que as bactérias, portanto podem facilitar a adesão entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas (eletrostáticas, co-valentes e de hidrogênio) e interações dipolo (dipolo-dipolo, dipolo-induzido dipolo e íon-dipolo), além de interações hidrofóbicas. Conseqüentemente, a bactéria pode vir a ter diferentes tipos de adesividade (MARSHALL, 1992).

Van Oss e Giese (1995) desenvolveram uma metodologia de cálculo que permite quantificar a hidrofobicidade da superfície do material por meio de componentes da tensão superficial. Segundo esses autores, a hidrofobicidade é expressa em termos da energia hidrofóbica de atração e define o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água.

O ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida é o ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado. Esse ângulo permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado à hidrofobicidade da superfície. Ângulos inferiores a 50° indicam superfície hidrofílica e ângulos superiores a 50°, superfície hidrofóbica (ADAMSON, 1982; VAN OSS; GIESE, 1995). Contudo, para Vogler (1998), uma superfície hidrofóbica deve apresentar ângulo de contato com a água superior a 65°.

A hidrofobicidade microbiana é definida pela energia de atração entre células apolares ou levemente polares, imersas em fase aquosa (VAN OSS; GIESE, 1995; CERCA et al., 2004). Pode ser medida por vários métodos, contudo a técnica que melhor determina a hidrofobicidade é a do ângulo de contato (DOYLE, 2000).

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes relaciona o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida com as componentes da tensão superficial do líquido e da superfície (Equação 4). Um líquido apolar e dois polares são necessários para a realização das medidas destes ângulos.

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l^{TOT} = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+}) \quad (4)$$

em que γ_l^{TOT} é a tensão superficial total do líquido; γ_l^{LW} e γ_s^{LW} são as tensões superficiais das forças de interação de Lifshitz - van der Waals; γ_l^+ e γ_s^+ são as componentes aceptoras de elétrons do componente ácido-base de Lewis da tensão superficial; e γ_l^- e γ_s^- são as componentes doadoras de elétrons do componente ácido-base da tensão superficial, considerando-se que são as tensões para os líquidos (l) e para a superfície (s) analisados. Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula, e, portanto, a Equação 4 reduz-se à Equação 5:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l^{TOT}}{4}(1 + \cos\theta)^2 \quad (5)$$

As equações permitem determinar as componentes da tensão superficial de líquidos a 25 °C (Tabela 1) (VAN DER MEI et al., 1997).

Além disso, as componentes da tensão superficial são utilizadas para calcular a variação de energia livre de interação total (ΔG_{sws}^{TOT}). Segundo esta metodologia, a

hidrofobicidade é definida como o grau de interação entre as moléculas de um determinado material imerso em água. Se os valores de ΔG_{SWS}^{TOT} forem inferiores a zero, a variação de energia livre total de interação entre as moléculas de uma superfície imersa em água é atrativa ($\Delta G_{SWS}^{TOT} < 0$), o que indica que as moléculas da superfície apresentam menor afinidade com a água do que entre si mesma e, portanto, é considerada hidrofóbica. Contudo, se esta variação energia for positiva, ou seja, uma interação de caráter repulsivo ($\Delta G_{SWS}^{TOT} > 0$), a superfície é considerada hidrofílica. Vale ressaltar que quanto maior for o valor absoluto de ΔG_{SWS}^{TOT} , mais hidrofóbica (valores negativos) ou mais hidrofílica (valores positivos) é a superfície (VAN OSS; GIESE, 1995).

As teorias apresentadas anteriormente não consideram os aspectos microbiológicos da adesão, apenas os aspectos físico-químicos e termodinâmicos da adesão. Portanto, não leva em consideração o fato de os micro-organismos serem células vivas, cujas características microbiológicas são capazes de condicionar a adesão (CHAVES, 2004).

2.1.2 Biofilmes microbianos na indústria de alimentos

As bactérias em biofilmes tornam-se resistentes aos processos de limpeza e sanitização, podendo representar uma fonte de contaminação para os alimentos, comprometendo a qualidade e segurança do produto final, o que limita a vida de prateleira (FAILLE et al., 2002; SHARMA; ANAND, 2002; PARKAR et al., 2004; FLACH et al., 2005; SALUSTIANO et al., 2009).

O controle da formação de biofilmes é comum em várias áreas de pesquisa como a biotecnologia e saúde pública (XAVIER et al., 2005). Embora os trabalhos, em sua maioria, tenham sido desenvolvidos em laboratório simulando condições reais (LIMA, 2007; SALUSTIANO et al., 2009) não há dúvidas de que os biofilmes sejam formados também em condições de processamento (SHARMA; ANAND, 2002; BAGGE-RAVN et al., 2003; GUOBJORNSDORTTIR et al. 2005; GUNDUZ; TUNCEL; 2006). Por isso, a indústria de alimentos deve estar preparada para controlar ou evitar ocorrências dessas formações.

Estratégias de sobrevivência desenvolvidas pelos micro-organismos possibilitam a adaptação rápida às mudanças das condições ambientais. Particularmente, é bem conhecido o fato de que bactérias em biofilmes são mais

resistentes a tratamentos com antimicrobianos comparadas às células planctônicas. Entretanto, o mecanismo exato que confere resistência a estas substâncias não é completamente conhecido (POULSEN, 1999). Uma explicação para esse fato é a barreira criada pelo glicocálix. Neste caso, ligações iônicas são estabelecidas entre o antimicrobiano e a matriz que funcionará como resina trocadora de íons ou, então, por meio de ligações covalentes com os compostos reativos, como cloro e peróxidos (GILBERT et al., 2003). Ressalta-se ainda que existam enzimas que inativam moléculas antimicrobianas menos reativas ou sem cargas na matriz exopolissacarídica, por exemplo β -lactamases (GIWERCMAN et al., 1991).

Além de as células em biofilmes apresentarem maior resistência aos antimicrobianos, também são resistentes à exposição à luz ultravioleta, toxicidade de metais, exposição a ácidos, desidratação e fagocitose (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Problemas microbiológicos estão constantemente associados à formação de biofilmes em tubulações e equipamentos (STORGARDS et al., 1999) em indústrias alimentícias, particularmente laticínios, frigoríficos e processadoras de vegetais (HOOD; ZOTTOLA, 1995, 1997; BERESFORD et al., 2001; SIMÕES et al., 2010).

Biofilme composto por bactérias, principalmente patogênicas, em superfícies de contato com alimentos além de contaminar um produto durante o processamento, o que pode resultar em doenças de origem alimentar (SHARMA; ANAND, 2002), pode também ocasionar corrosão de superfícies de equipamentos e bloqueio de tubulações, o que ocasiona perdas de energia (POULSEN, 1999). Gaxetas, juntas e algumas válvulas presentes nos equipamentos também são locais favoráveis para a formação dessas estruturas, pois permitem o acúmulo de sujeira e material orgânico (SHARMA; ANAND, 2002).

Pesquisadores (MATTILA-SANDHOLM et al., 1992; SHARMA; ANAND, 2002; LINDSAY; VON HOLY, 2006; SHI; ZHU, 2009) relataram que bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Campylobacter* são formadoras de biofilme. Dentre os locais em que estes gêneros foram isolados, encontram-se indústrias de processamento de leite (SHARMA; ANAND, 2002), sorvete (GUNDUZ; TUNCEL, 2006) e pescado (BAGGERAVN et al., 2003; GUOJORNSDOTTIR et al., 2005).

Uma vez formados, em superfícies de processamento de alimentos, os biofilmes são de difícil remoção e frequentemente resultam em populações persistentes e endêmicas (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

2.1.3 *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*: bactérias formadores de biofilme em superfícies processadoras de alimentos.

2.1.3.1 *L. monocytogenes*

Listeria é um gênero de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas e em forma de bastonete (JEYALETCHUMI et al., 2010) que contém seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*. Algumas estirpes são capazes de fermentar açúcares e apresentam propriedades hemolíticas (GASANOV et al., 2005).

Embora *L. monocytogenes* seja o patógeno associado à listeriose em humanos e, por isso, muito estudado durante as últimas décadas (MCLAUCHLIN, 1990; JANZTEN et al., 2006), há também alguns relatos de doenças provocadas pelas espécies *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. innocua* (PERRIN et al., 2003; GASANOV et al., 2005). Indivíduos imunodeprimidos, como aqueles que apresentam câncer, cirrose ou AIDS, grávidas, recém nascidos e idosos, são os principais afetados (WHO, 2011).

Este micro-organismo é capaz de utilizar a polimerização de actina para o movimento intracelular e, com isso, causar infecção dos tecidos, principalmente do fígado (GANDHI; CHIKINDAS; 2007). Manifestações clínicas como gastroenterite, meningoencefalite e septicemia são comuns em adultos e recém nascidos. Entretanto, em mulheres grávidas causa febre e aborto (GEELING; BROOME, 1989; BESSE et al., 2005; WHO, 2011).

A listeriose é observada, principalmente, em países industrializados. Não se sabe se as diferenças nas taxas de incidência entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento são por causa de diferenças geográficas, hábitos alimentares e armazenamento de alimentos, ou por causa das diferenças nas práticas de diagnóstico e elaboração de relatórios que registrem e divulguem os resultados (WHO; FAO, 2004).

Embora a listeriose seja uma doença rara, a taxa de mortalidade é alta, 20% a 30% (MEAD et al., 1999; WHO; FAO; 2004), comparada a taxas resultantes de doenças causadas por outros patógenos. A incidência anual desta doença é de 0,1 a 11,3 casos por milhão de pessoas, sendo que na Europa varia de 0,3 a 7,5 casos e nos EUA é de 4,4 por milhão de pessoas (WHO; FAO, 2004). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2009), 719 casos ocorreram em 2008 nos EUA. Ressalta-se ainda que em 23 países Europeus a listeriose é a 15^o doença mais comum (EFSA, 2007; ZUNABOVIC et al., 2011). Entretanto, medidas tomadas pelos órgãos governamentais e pelas indústrias de alimentos tentam reduzir a incidência desta doença (JANZTEN et al., 2006; CARPENTIER; CERF, 2011).

L. monocytogenes é uma bactéria que se encontra amplamente dispersa no ambiente, como solo, água, silagem, material fecal, e nos alimentos e é predominantemente associada a refeições prontas para consumo, principalmente industrializadas (WHO; FAO, 2004). Pesquisas demonstraram que diferentes tipos de alimentos são associados à veiculação desta bactéria, o que incluem alimentos como carnes cruas, cozidas e defumadas, vegetais (MCLAUHLIN, 1990; JOHANSSON, 1998; VITAS et al., 2004) e em especial produtos derivados de leite, pois estes são os principais alimentos associados a surtos de listeriosis (YÜCEL et al., 2005). É importante ressaltar ainda que *L. monocytogenes* apresenta longo período de incubação, o que torna difícil a sua identificação e do alimento envolvidos (GANDHI; CHIKINDAS; 2007).

Apesar de a pasteurização ou o cozimento auxiliar na eliminação de *L. monocytogenes*, esta bactéria, por sua vez, pode persistir no ambiente de processamento por muitos anos (NESBAKKEN et al., 1996) e, provavelmente, originar biofilmes (JESSEN; LAMMERT, 2003). Algumas estirpes de *Listeria* sobrevivem no ambiente de oito meses até dez anos. A persistência bacteriana é associada à adaptação física das células aderidas, o que culmina na tolerância aos produtos de higienização (LUNDÉN et al., 2000; LEAR et al, 2002; LINDSAY; VON HOLY, 2006; CERF et al., 2010;) e consequente sobrevivência da bactéria em drenos, pisos e equipamentos (MAFU et al., 1990; KIM; FRANK, 1995; POULSEN, 1999). Além do mais, este micro-organismo apresenta capacidade de multiplicar em condições adversas não só de temperatura (NESBAKKEN et al., 1996), sendo a faixa entre 1 °C a 45 °C, como também de pH, entre 4 a 9, e concentração de NaCl

extremos, superior a 10% (p/v) (YOULSEF; CARLSTROM, 2003; VAID et al., 2010). Uma possível explicação para a sobrevivência e multiplicação desta bactéria em baixas temperaturas (psicrotróficas) é o aumento da proporção de ácidos graxos insaturados e a redução do número de carbonos na cadeia que ajudam a manter a fluidez da membrana (BEALES, 2004).

Estirpes de *L. monocytogenes* são isoladas com frequência em superfícies de indústria de alimentos (GUDMUNDSDÓTTIR et al., 2006; CHAMBEL, 2007; ORTIZ et al., 2010; CARPENTIER; CERF, 2011), como aço inoxidável, polímeros e borrachas (CHAVANT et al., 2002; LUNDE´N et al., 2002; BORUCKI et al., 2003). Podem existir em biofilmes na forma de monocultura ou em conjunto com outras bactérias, como por exemplos *Pseudomonas* sp. (SASAHARA; ZOTTOLA, 1993; NORWOOD; GILMOUR, 2001; CARPENTIER; CHASSAING, 2004; HASSAN et al., 2004;), *Bacillus* sp. (CARPENTIER; CHASSAING, 2004) e *Flavobacterium* (BREMER et al., 2001). Quando em biofilme misto, *L. monocytogenes* apresenta maior adesão (SASAHARA; ZOTTOLA, 1993; BOURION; CERF, 1996; CARPENTIER; CHASSAING, 2004). Contudo, Norwood e Gilmour (2001) constataram que este micro-organismo quando associado a uma estirpe de *Staphylococcus xylosus* ou *Pseudomonas fragi* apresentou menor contagem.

Biofilmes formados por *L. monocytogenes* são estruturalmente simples comparados aos produzidos por outros micro-organismos e a sua maturidade pode ser estabelecida em 24 h (KALMOKOFF et al., 2001; RIEU et al., 2008; NILSSON et al., 2011).

Ao contrário de biofilmes formados sob condições de escoamento do fluido por *P. aeruginosa*, que consistem em estruturas semelhantes a cogumelos cuja matriz polimérica coesiva é interligada por canais de água (KLAUSEN et al., 2003), Rieu et al. (2008) mostraram que biofilmes formados por *L. monocytogenes* apresentaram-se como uma rede em que microcolônias são estruturadas. Observaram também que houve maior volume e espessura do biofilme formado sob condições de escoamento que estática.

Os biofilmes de *L. monocytogenes* são preocupantes e a sua eliminação do ambiente é um desafio (LEWIS, 2001), uma vez que as células nele presentes apresentam maior resistência a antimicrobianos, como sanitizantes, do que aquelas em suspensão (MIDELET; CARPENTIER, 2002).

2.1.3.2. *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, em forma de bastonetes, não formadoras de esporos, catalase positiva e móvel em razão de um ou vários flagelos (HOLT et al., 1994). É encontrada em muitos ambientes, como água, solo (ALABOUVETTE et al., 1993) e, frequentemente, isolada de ambientes industriais (GUOBJORNSDOTTIR et al., 2005; SHI; ZHU, 2009). Isso se deve ao fato de apresentar pequeno tempo de geração, resistência ao calor e capacidade de formar biofilme (SIMÕES et al., 2008b). No solo, a presença de *P. fluorescens* é importante no controle de doenças de plantas causadas por fungos (ALABOUVETTE et al., 1993; BUCHENAUER, 1998). Entretanto, em indústrias, a presença deste micro-organismo é indesejável, uma vez que sintetiza uma lipase e protease termorresistente responsável pela deterioração de alimentos (LAW et al., 1977), como leite, peixes, carnes curadas, ovos e vegetais (MASSON et al., 2002).

A capacidade de formar biofilme em diferentes condições de multiplicação, como temperatura, pressão osmótica, pH, oxigênio e nutrientes, é uma das características inerentes de *P. fluorescens* (DOGAN; BOOR, 2003; MARQUES, 2004; OLOFSSON et al., 2007). A persistência deste micro-organismo no ambiente (HOOD; ZOTTOLA, 1997) é explicada não somente pela sua facilidade de formar biofilmes, como também pela tolerância a sanitizantes (LANGSRUD et al., 2003). Estas e outras características citadas anteriormente proporcionam estas bactérias, especialmente quando em biofilmes, a capacidade de formar nichos onde micro-organismos patogênicos de outras espécies podem sobreviver (SIMÕES et al., 2008b).

Além disso, *P. fluorescens* pode ser uma bactéria isolada de hospitais, não apenas de água, mas também como uma constituinte da microbiota da epiderme ou orofaringe (PICOT et al., 2001). Este micro-organismo é, em geral, um patógeno presente em passáros (JACKSON; PHILLIPS, 1996), como causa de infecções no fígado. Entretanto, pelo menos um caso de lesão hepática já foi descrito em humanos (RAMIREZ et al., 1989). Há também relatos de casos de bacteremia e septicemia por causa desta bactéria (PICOT et al., 2001). Embora estas infecções não serem frequentes, o tratamento com antibióticos pode ser ineficaz e, em casos raros, podem ser fatais (NAGHMOUCHI et al., 2012).

2.1.4 Controle da adesão e formação de biofilmes

Bactérias patogênicas e deterioradoras são capazes de aderir em superfícies que entram em contato com o alimento (VOGEL et al., 1997) e permanecerem viáveis mesmo após as etapas de limpeza e sanitização (REIJ; DEN AANTREKKER, 2003). Assim, é fundamental que o profissional da área de alimentos tenha conhecimentos de processamento e microbiologia, de controle de qualidade e higiene industrial, para evitar que surtos de doenças de origem alimentar ocorram. Os estabelecimentos industriais têm responsabilidade direta sobre a segurança e qualidade de seus produtos.

Falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação (ZOTTOLA, 1994). Portanto, é fundamental que os profissionais da área de alimentos tenham em mente dois aspectos relevantes para o sucesso de um procedimento adequado: i) como fazer e b) como avaliar (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

Os processos de limpeza e sanitização de superfícies são mais difíceis na presença de micro-organismos aderidos. Isto tem tornado um problema com o aumento do uso de procedimentos automáticos de limpeza e equipamentos complexos, que podem apresentar locais que facilitam o desenvolvimento de processos de adesão (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

Uma estratégia de evitar a adesão e formação de biofilme microbiano é executar o procedimento de sanitização após a limpeza e antes do início do processamento, se há um intervalo grande entre os turnos de trabalho. Isso porque a fase inicial da aderência dos micro-organismos e a formação do biofilme à superfície ocorrem rapidamente, o que leva somente algumas horas. Além disso, é importante também conhecer o tipo e a natureza dos resíduos contaminantes, como, carboidratos, lipídeos, proteínas e sais minerais, e os micro-organismos a serem removidos (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

A higienização na indústria de alimentos insere-se dentro das Boas Práticas de Fabricação e da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o que visa à obtenção de alimentos seguros, particularmente sob os aspectos relacionados às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos, além de contribuir para a manutenção das características sensoriais e nutritivas

desses alimentos. Neste contexto, devem se destacar fatores relevantes como (WIRTANEN; SALO, 2005):

- *Design* de equipamentos e ambientes: devem ser projetados de modo a facilitar as etapas de higienização. Não só o *design*, mas também o *layout* dos equipamentos evitarão riscos de contaminação.

- Manutenção e limpeza do ambiente de processamento e equipamento: procedimentos devem ser desenvolvidos para que ocorra uma adequada higienização e efetivo monitoramento. Nestes procedimentos não se deve esquecer de destacar as atividades de controle de pragas e resíduos.

- Higiene pessoal: é necessário que os colaboradores recebam treinamentos constantes com o intuito de utilizarem vestimentas limpas e realizarem hábitos higiênicos adequados, como por exemplo, lavar as mãos. Vale ressaltar que visitantes também devem ser instruídos sobre estes aspectos.

- Transporte: Procedimentos de limpeza e sanitização devem ser estabelecidos e os veículos devem ser constantemente revisados.

- Treinamento: cada colaborador deve ter consciência da sua responsabilidade e conhecimento da importância de se produzir um alimento seguro com relação aos aspectos microbiológico, químico e físico.

O monitoramento correto dos procedimentos de higienização permite um controle microbiológico eficiente e, além disso, registros comprovam se um processo está em conformidade com o que foi estabelecido no plano APPCC. Em casos de desvios, devem-se adotar medidas corretivas. Os resultados dos testes devem ser comparados com as especificações ou recomendações de órgãos oficiais ou por entidades científicas conceituadas, como a *American Public Health Association* (APHA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS).

A utilização de uma combinação de metodologias é possível monitorar as condições higiênicas das superfícies durante processamento. Como exemplo, dois métodos que podem ser utilizados pela indústria encontram-se o teste do *swab*, considerado uma metodologia padrão pela APHA, e a técnica do ATP bioluminescência que avalia as condições higiênicas de processamento pela quantidade de ATP presentes na superfície. Como qualquer análise, o sucesso e a eficiência do método dependem do conhecimento prévio sobre distribuição e adesão

bacteriana, sobrevivência e recuperação de micro-organismos estressados (ANDRADE et al., 2008).

Deste modo, deve ser cuidadosamente realizada a descrição de um Procedimento Padrão de Higiene Operacional, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais, os agentes antimicrobianos e o tipo de superfície para que haja o controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. Afinal, todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a formação de biofilmes, que pode ocorrer até mesmo quando programas de higiene e sanitização são corretamente aplicados (NORTEMANS et al., 1991).

Assim, por este fato, pesquisadores realizam pesquisas com o intuito de modificar os materiais que entram em contato com alimentos, seja por meio da incorporação de antimicrobianos (TSIBOUKLIS et al., 2000; GOTTENBOS et al., 2001; THOUVENIN et al., 2003) ou por modificação das propriedades físico-química (WHITEHEAD et al., 2005; ROSMANINHO et al., 2007).

Atualmente, sensores são desenvolvidos como alternativa no controle da colonização bacteriana. Estes, por sua vez, permitem não só detectar a presença de resíduos de produtos na superfície após procedimento higienização, como também monitorar a qualidade da higienização realizada (PEREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2009).

A descoberta de que muitas bactérias utilizam *quorum sensing* pode representar outra estratégia de impacto significativo na formação de biofilme (DONG et al., 2002). A compreensão deste fenômeno de sinalização célula-célula, tal como em *L. monocytogenes*, pode ser usado para evitar a colonização da superfície pelo fato de se identificar compostos que podem atuar como antagonistas desta comunicação microbiana (SMITH et al., 2004).

Enzimas e detergentes estão sendo utilizados em conjunto para melhorar a eficácia dos processos de higienização e, conseqüentemente, evitar os problemas de formação de biofilme nas indústrias de alimentos (SIMÕES et al, 2010). Augustin et al. (2004) demonstraram o potencial da aplicação de produtos enzimáticos de limpeza no controle de biofilmes cujos micro-organismos foram encontrados em derivados de leite.

Além da utilização de enzimas, este controle também pode ocorrer por meio de interações ou metabólitos microbianos, sendo a competição por substrato, síntese de sideróforos e biosurfactantes alguns exemplos a serem considerados.

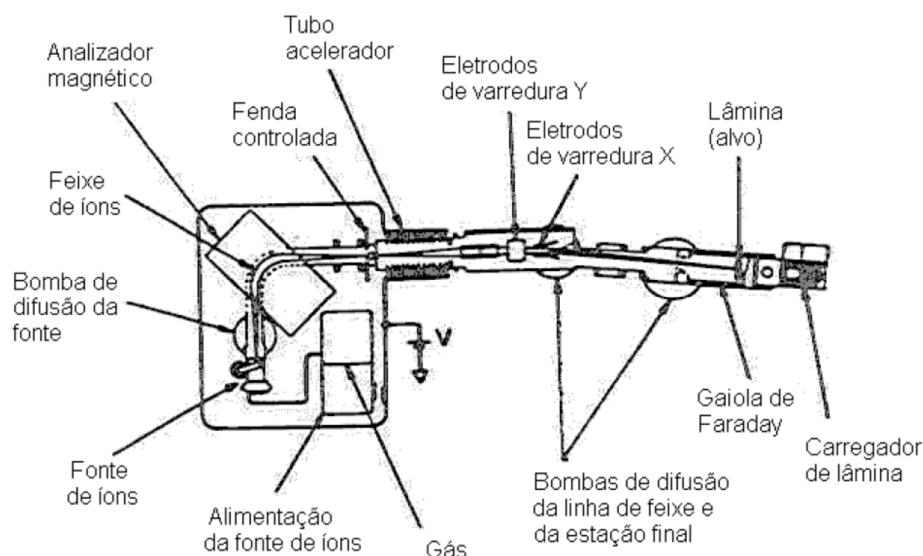
Pesquisadores relatam que bacteriocinas comumente utilizadas como biopreservativos, como nisina, lauricidina e pediocina apresentaram elevado potencial no controle de micro-organismo em biofilmes, incluindo *L. monocytogenes* (DUFOUR et al., 2004; MAHDAVI et al., 2007; GARCIA-ALMENDAREZ et al., 2008).

Por fim, vale ressaltar o controle realizado por meio da infecção com bacteriófagos. É também uma alternativa promissora uma vez que populações bacterianas apresentam-se resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado (SILLANKORVA et al., 2004).

2.2 Modificação da superfície pela técnica de implantação iônica

A implantação iônica é um processo caracterizado pela transferência de massa, por meio do bombardeamento de um material com átomos ou moléculas ionizadas com energia suficiente para penetrar além das camadas superficiais no material alvo (SEIDEL, 1983). Resumidamente, é um processo em que íons são acelerados em direção a uma superfície alvo, na presença de vácuo (DEARNALEY, 1974). Estes íons formam um feixe energético de uma determinada espécie química e é extraído de uma fonte, em seguida, purificado por um analisador de massa (espectrômetro), acelerado a uma determinada velocidade por um campo elétrico, direcionado por lentes eletrostáticas e, por fim, incidido em uma superfície alvo (Figura 4) (DINIZ, 1996).

Figura 4 - Esquema de um implantador iônico.



A espécie química gasosa presente na fonte de alimentação é, geralmente, originada por meio da injeção de gás ou evaporação de material sólido dentro de uma fonte aquecida a altas temperaturas (ZIEGLER, 1992). Entretanto, em alguns casos, são utilizados líquidos. Um filamento metálico (catódo), como por exemplo, de tungstênio, é aquecido, o que resulta no aparecimento de elétrons os quais são atraídos por um ânodo a um potencial elétrico. Durante o percurso entre o catódo e ânodo, os elétrons colidem com as moléculas do gás gerando íons (PISANI, 1990) que são, por sua vez, extraídos com a ajuda de uma diferença de potencial aplicada, geralmente, sendo a voltagem de 15 kV a 40 kV (RIMINI, 1995). O feixe iônico formado, além dos íons de interesse, possui diferentes moléculas e átomos provenientes de impurezas do elemento a ser implantado e de impurezas criadas na própria fonte (SILVA, 2000). Cada íon deixa o orifício com uma velocidade específica que depende da sua massa pode ser demonstrada conforme a Equação 5:

$$E_c = \frac{1}{2} m_{ion} v^2 = -q \cdot V \quad (5)$$

sendo que E_c é a energia cinética, m_{ion} a massa, v a velocidade, q é a carga apresentada por cada íon e V é a diferença de potencial da fonte de extração (ZIEGLER, 1992).

Em seguida, os íons passam por um ímã, onde recebem aplicação de um campo magnético (B) perpendicular a sua trajetória (R_{ion}) (Equações 6 e 7), fazendo que somente aqueles com uma determinada carga/massa sejam defletidos em um ângulo definido e passem por meio da fenda de seleção de massa (ZIEGLER, 1992; SILVA, 2000):

$$qvB = \frac{m_{ion}v^2}{R_{ion}} \quad (6)$$

Das equações acima se obtém:

$$R_{ion} = \frac{\sqrt{2 m_{ion} V/q}}{B} \quad (7)$$

Após o seletor de massa, o feixe iônico, que é constituído de um único tipo de elemento químico e isotopicamente puro, será acelerado por campos eletrostáticos, no tubo acelerador (SWART, 2008). Neste local, encontram-se anéis metálicos

isolados por separadores cerâmicos, os quais têm como finalidade primeiramente acelerar os íons com energia desejada e em seguida modificar sua trajetória nos eixos x e y, de modo evitar que a implantação se dê em um único ponto da superfície alvo, distribuindo-se uniformemente por toda sua parte (SWART, 2008).

Em termos de energia de interação íons/superfície alvo existem cinco regimes: (i) térmico (< 1 eV); (ii) hipertérmico (1 eV - 100 eV); (iii) baixa energia (0,1 keV - 10 keV); (iv) média energia (10 keV - 500 keV) e; (v) alta energia (> 500 keV) (FENG et al., 2006).

Por fim, o feixe de íons incide sobre o alvo que se encontra no interior de uma câmara de implantação. Neste local, há quatro copos de Faraday que se conectam a superfície com íons implantados com a finalidade de medir a corrente elétrica e, conseqüentemente, a obter a dose iônica bombardeada (SILVA, 2000).

Um detalhe importante é que todo processo ocorre em alto vácuo para garantir a pureza do feixe implantado (OLIVEIRA, 2007). A pressão na região da fonte deve ser da ordem de 10^{-3} torr (0,13 Pa) e na região da câmara é de 10^{-7} torr ($1,3 \cdot 10^{-3}$ Pa) (PISANI, 1990). Apesar de utilizar baixa pressão, uma pequena fração dos íons pode-se chocar com átomos do gás residual no sistema, o que resulta na neutralização de sua carga. Mesmo sem carga elétrica, esta fração iônica continuará sua trajetória com aproximadamente a mesma energia cinética, o que causará um erro na contagem dos dopantes implantados. Para reduzir este erro inclinou-se a parte final do tubo e criou-se um campo elétrico para defletir os íons, conforme anteriormente citado. Este campo elétrico além de corrigir a trajetória dos íons, não tem efeito sobre as partículas neutralizadas que irão se perder nas paredes do tubo do sistema, evitando assim o erro na contagem de íons (SWART, 2008).

A implantação iônica é uma técnica promissora, pois apresenta características relevantes como confiabilidade e reprodutibilidade. A espécie, energia, dose e densidade da corrente do feixe de íons são os principais parâmetros do processo (CUI; LUO, 1999). Entretanto, é ainda considerado um processo de elevado custo, devido ao preço do equipamento, e o período de implantação é longo (MIKKELSEN et al., 2002).

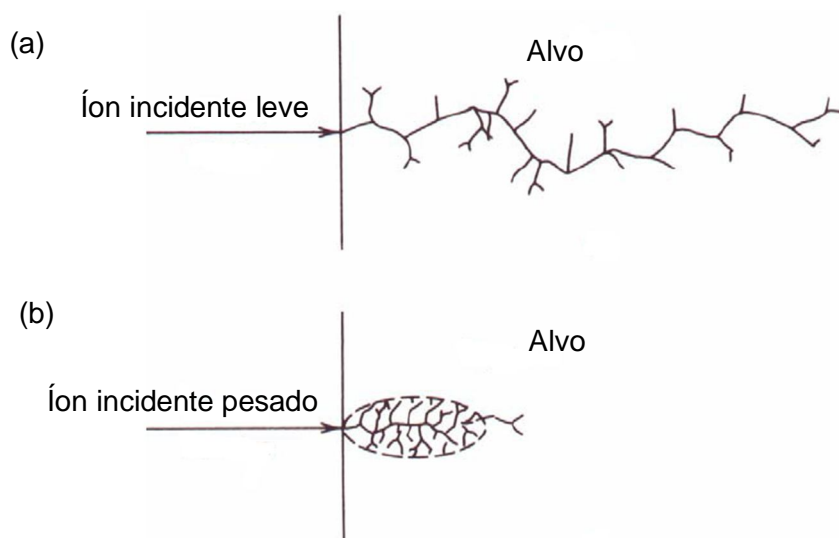
Os íons, ao colidirem com a superfície de interesse, como por exemplo, metais, cerâmicas e polímeros, penetram a uma profundidade de 10 nm a 1.000 nm. Entretanto, para amostras biológicas os íons podem penetrar a uma profundidade maior que dez microns. Novas ligações químicas são formadas entre os íons

implantados e o material bombardeado, o que resulta em uma nova região, com modificações químicas e físicas diferentes (CUI; LUO, 1999). Por causa destas modificações na superfície, haverá também alteração das propriedades mecânicas, elétricas, ópticas, dentre outras (GHANDHI, 1994), como por exemplo, molhabilidade e tensão de ruptura e de estiramento (SIOHANSI; TOBIN, 1996).

As novas ligações químicas formadas são consequência das colisões múltiplas dos íons implantados com os elétrons e núcleos dos átomos da estrutura do alvo. Estas colisões causam os chamados freamentos eletrônicos (*electronic stopping power*) e nuclear, o que resulta na redução da energia cinética iônica. O freamento eletrônico não influencia na trajetória iônica dentro da rede cristalina do substrato, pois é um mecanismo de transferência de energia do íon para os elétrons dos átomos alvo, por meio de colisões inelásticas (BOHR, 1948). Todavia, o freamento nuclear (*nuclear stopping power*) resulta no deslocamento dos átomos da rede, o que pode ocasionar danos na estrutura cristalina. Isso ocorre porque os íons incidentes transferem energia para os núcleos dos átomos do alvo por meio de colisões elásticas. O mecanismo de freamento eletrônico é predominante para as altas energias do íon incidente, enquanto que o freamento nuclear predomina para baixas energias iônicas (SEIDEL, 1983). É possível observar também colisões inelásticas entre íons e núcleos e colisões elásticas entre íons e elétrons, contudo desempenham papéis insignificantes quando comparadas às colisões elásticas com núcleos (freamento nuclear) e às colisões inelásticas com elétrons (freamento eletrônico) (RANGEL et al., 1999).

A natureza dos defeitos criados pelo íon incidente depende da massa do íon. Íons leves geralmente transferem uma pequena quantidade de energia durante cada colisão com o alvo e se defletem em grandes ângulos (Figura 5a). Cada átomo do alvo deslocado apresentará uma pequena quantidade de energia transferida, o que dificilmente ocasionará deslocamentos em cascata. Assim, a principal perda de energia do íon se dá por freamento eletrônico. Todavia, se o íon incidente é pesado, uma grande quantidade de energia é transferida após cada colisão, e cada átomo deslocado é capaz de produzir um grande número de deslocamentos. Portanto, a trajetória do íon incidente é pequena e a grande parte da energia é transferida para a rede por freamento nuclear, o que cria uma alta densidade de defeitos em um pequeno volume (Figura 5b) (GHANDHI, 1994).

Figura 5 - Esquema ilustrativo dos defeitos causados por íons leves (a) e pesados (b) após colisões na superfície alvo.



Fonte: Adaptado: Gandhi, 1994.

Colisões inelásticas entre íons e elétrons produzem excitações, ionizações e até mesmo rompimento de ligações químicas no material alvo. Entretanto, as colisões elásticas nucleares resultam no deslocamento de núcleos pesados de suas posições originais, o que gera desordem e degradação do material (RANGEL, 1999). Em metais, colisões eletrônicas e nucleares conduzem a formação de uma estrutura desordenada e, às vezes, amorfa na parte superior da superfície (CUI; LUO, 1999). Dependendo do átomo implantado, haverá formação de novos compostos e/ou formação de nanopartículas metálicas. Entretanto, as interações químicas e físicas entre os íons implantados e os átomos e ou elétrons da superfície alvo, que determinam a configuração final do sistema, ainda não foi completamente elucidada (MAZZOLDI; MATTEI, 2007).

O bombardeamento iônico de sólidos com partículas carregadas não é dependente dos limites de solubilidade termodinâmica do sólido, como é o caso da difusão. Há possibilidade de implantação de qualquer íon em qualquer material, mesmo em doses elevadas. Além disso, o bombardeamento pode ser efetuado com o alvo a diversas temperaturas. O processo é rápido, limpo e permite a obtenção de perfis bastante específicos através de implantações sucessivas com energias variadas (RANGEL, 1999).

Em materiais poliméricos, o bombardeamento iônico geralmente origina a fragmentação de ligações que ocorre em grupos laterais, também chamados de grupos pendentes, liberando espécies químicas do sólido como H, N, O, CH_x e CO, dentre outros. A estrutura polimérica ao redor da ligação pendente tende a se reorganizar de modo a “absorver” o radical, o que resulta na formação de ligações insaturadas (C=C e C≡C). Se há formação de radicais livres em cadeias adjacentes, há possibilidade de reação entre eles e união de cadeias vizinhas através de ligações covalentes. Este mecanismo de conexão é chamado de reticulação ou entrelaçamento e ocorre quando há proximidade suficiente para ocorrer reação entre os radicais livres. O alto grau de reticulação gera cadeias fortemente ligadas umas as outras e com pontos âncoras que retêm o movimento vibracional. Por sua vez, a estrutura polimérica torna-se compacta, rígida e de difícil penetração, melhorando propriedades como resistência ao desgaste, condutividade elétrica, resistência a solventes e estabilidade térmica. Por outro lado, se há domínio do freamento nuclear neste processo de implantação iônica, o polímero torna-se mecanicamente fragilizado e pouco resistente a ataques químicos, pois há energia suficiente para deslocar átomos ou segmentos moleculares de suas posições, o que gera a fragmentação da cadeia (RANGEL, 1999).

2.2.1 Aplicações

Durante muitos anos, a implantação iônica foi direcionada ao processo químico de *doping* (adição de íons) de semicondutores, especialmente silício que ainda hoje é de grande interesse para a indústria eletrônica (YARLING, 2000; BOURGOIN; CORBETT, 1972). Os íons mais utilizados para dopar este tipo de semicondutor são B⁺, P⁺ e As⁺ e a energia pode variar de 30 keV a 200 keV, sendo que alguns equipamentos permitem uma faixa maior que compreende valores de 5 keV a 1.000 keV. As doses empregadas variam de 10¹² íons.cm⁻² a 5 x 10¹⁵ íons.cm⁻², mas em aplicações especiais pode variar de 10¹¹ íons.cm⁻² a 10¹⁸ íons.cm⁻² (SWART, 2008). A principal aplicação desta técnica na indústria microeletrônica é a dopagem controlada dos dispositivos pela introdução de perfis precisos de impurezas dopantes, o que permite a planaridade das superfícies (PESENTI, 2004) (Tabela 2). Este processo chega a representar cerca de 90% de todos os processos envolvidos na fabricação de circuitos integrados (GUERRA, 1996).

Tabela 2 - Aplicações da implantação iônica na fabricação de dispositivos semicondutores.

Finalidades	
Dopagem de impurezas	Controle total das impurezas Controle do perfil de dopagem
Formação de compostos	Óxido de silício Nitreto de silício
Introdução de desordem	Captura de impurezas Controle da taxa de ataque ou oxidação do processo

Fonte: Adaptado: Pisani, 1990.

Após os dispositivos microeletrônicos, a segunda maior categoria em que há modificação de superfícies empregando processos com feixes iônicos é a de biomateriais (FENG et al., 2006) médicos ou odontológicos (YOSHINARI et al., 2001; PELLETIER et al., 1999; TANG et al., 2006) Entre estas superfícies incluem-se metais, cerâmicas, vidros e polímeros (FENG et al., 2006).

As características do biomaterial como tensão interfacial, rugosidade e composição química apresentam um importante papel durante as interações entre o material implantado e o tecido hospedeiro (NAYAB et al., 2005). Modificações são realizadas respeitando o *design*, a composição e fabricação para garantir que os dispositivos apresentem propriedade mecânica apropriada, compatibilidade, durabilidade e funcionalidade (FENG et al., 2006).

Assim, com finalidade de melhorar a biocompatibilidade, Li et al. (1999) bombardearam íons F^+ em lentes intraoculares de poli (metilmetaacrilato) (PMMA). Estes pesquisadores observaram que reduziram significativamente o número de plaquetas, granulócitos e macrófagos aderidos no biomaterial modificado. Atribuíram este fato ao aumento da hidrofobicidade que, conseqüentemente, relacionaram à redução do número de ligações C=O, o que contribui para o caráter hidrofílico, e ao aumento na formação do número de ligações C-F cujo caráter é hidrofóbico. Outro fator que também destacaram é a presença dos íons F^+ cuja carga elétrica influenciou na redução da adesão celular.

Em outro estudo, Fan et al. (2000) modificaram uma superfície de silício utilizada para confecção de implantes de *chip* intracranianos com íons hidroxila. Observaram que neurônios de ratos apenas foram capazes de aderir e formar sinapse nas superfícies que tiveram os íons bombardeados.

Resultados interessantes também foram observados por Li e Niu (2002). Os efeitos da implantação de íons carboxílicos (COOH^+) em biomateriais de polipropileno (PP) foram estudados *in vitro* para diferentes células: macrófagos de camundongos, fibroblastos de ratos e células epiteliais humanas. Estes pesquisadores observaram que houve maior adesão e proliferação dos fibroblastos e das células epiteliais nos biomateriais com íons COOH^+ implantados do que na superfície sem bombardeamento iônico. Entretanto, observaram que macrófagos apresentaram menor adesão nos biomateriais modificados. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que os íons COOH^+ provocaram um rearranjo das ligações químicas na superfície do biomaterial e a formação de novos grupos contendo oxigênio, o que melhorou a biocompatibilidade do polipropileno.

O tipo de superfície dos implantes, rugosa ou lisa, influencia o mecanismo de osseointegração. Em função disto, tem-se realizado trabalhos com a finalidade de se obter uma superfície ideal, que favoreça o mecanismo de osseointegração, sem modificar os tecidos adjacentes ou promover reações de rejeição. Alguns estudos mostram que superfícies rugosas aumentam a multiplicação de células ósseas ao redor do implante por favorecerem a deposição e melhor distribuição de proteínas na superfície do implante (HATANO et al., 1999). Outros autores afirmam que superfícies lisas favorecem a proliferação celular (STANFORD et al., 1994).

Outra importante propriedade de uma superfície é molhabilidade, capacidade relacionada à adsorção de água pela superfície (LIM et al., 2001). Como o sangue é o primeiro tecido que entra em contato com o implante, e este possui uma composição hídrica de aproximadamente 90%, esta capacidade de adsorção de água pela superfície torna-se fundamental para o sucesso da adesão celular e conseqüente osseointegração (KASEMO, 2002). A avaliação da molhabilidade de uma superfície pode ser realizada pela determinação do ângulo de contato. Quanto menor esse ângulo, mais molhável é a superfície (KWOK et al., 1998).

Além dos estudos acima apresentados, outras pesquisas também apresentaram como objetivo melhorar a biocompatibilidade de superfícies comercializadas para implantes médicos por meio da adesão de determinados grupos celulares (MURAYAMA et al., 1997; NAKAO et al., 1996; LHOEST et al., 1995; TJUSI et al., 1998; FAN et al., 2000; TJUSI et al., 2000; LI; NIU, 2002; COLWELL et al., 2003; NAYAB et al., 2005; TJUSI et al., 2007).

Entretanto, outras pesquisas têm como objetivo modificar biomateriais para reduzir a adesão microbiana, como, por exemplo, superfícies de aço inoxidável (DAN et al., 2005; WAN et al., 2007; ZHAO et al., 2008), titânio (WAN et al., 2007) e poli (etilenotereftalato) (LI et al., 2007).

Superfícies de titânio utilizadas para implantes orais apresentaram atividade antibacteriana quando apresentaram íons F^+ implantados (YOSHINARI et al., 2001).

Em outro um estudo Gallardo-Moreno et al. (2011) observaram que a implantação de Si^+ reduziu a contagem de células de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em superfícies de AISI 316LVM sem alterar a biocompatibilidade.

A implantação iônica é também uma importante técnica para a síntese e modificação de nanopartículas metálicas (MAZZOLDI; MATTEI, 2007) e apresenta diversas vantagens (XIAO et al., 2007), dentre elas o controle da dose e energia do elemento implantado (TSUJI et al., 2004).

Elementos químicos como cobre, níquel e ferro, são introduzidos nos diferentes estágios da produção de dispositivos microeletrônicos com a finalidade de alterar propriedades físicas e químicas (SILVA et al., 2004).

Dentre estas propriedades encontra-se a optoeletrônica. Nas duas últimas décadas, pesquisas são realizadas com o intuito de modificar substratos de silício visando resolver sua inabilidade física de agir como um bom emissor de luz. Assim, formação de nanopartículas no interior de camadas de óxido de silício/silício (SiO_2/Si), através da utilização da técnica de implantação iônica e posterior tratamento térmico, é uma alternativa bastante promissora para a produção de materiais luminescentes baseados em silício. Isso porque há elevado controle sobre o processo de fabricação e à compatibilidade da implantação iônica com a tecnologia de microeletrônica (LOPES et al., 2006). Estudos mostraram que as propriedades de luminescência do silício à temperatura ambiente podem ser melhoradas quando o mesmo se encontra na forma de nanoestruturados, como, nanocristais de Si (SIAS et al., 2004; LOPES et al., 2006; SIAS et al., 2006a, 2006b; NIKOLOVA et al., 2009).

Além de modificar as propriedades optoeletrônicas, Ramaswamy et al. (2005) relataram que a formação de nanopartículas em SiO_2 também modificou as propriedades magnéticas. Para isso, realizaram múltiplas implantações de íons Au^+

em intermediárias etapas de anelamento, o que resultou em nucleações isoladas e crescimento das partículas.

A implantação iônica permite a formação ou modificação de outras nanoestruturas, além de nanopartículas, como por exemplos: (i) nanotubos (IWASAKI et al., 2008), que podem ser utilizados em eletrônica molecular (TANS et al., 1998), sensores biológicos (STAR et al., 2003) e sistemas nano-eletromecânico (PONCHARAL et al., 1999); (ii) nanocavidades (SILVA et al., 2004). Átomos de Hélio são insolúveis em metais e semicondutores, assim, este elemento só pode ser incorporado nestas matrizes quando produzidos, por exemplo, via reações nucleares ou implantação iônica. Quando bombardeado em silício cristalino, os íons He^+ formam nanocavidades capazes de originar eficientes centros para o aprisionamento de impurezas metálicas (MYERS; FOLLSTAEDT, 1996), responsáveis pela mudança das propriedades optoeletrônicas, e, por fim; (iii) a modificação da topografia de superfícies por meio da produção de materiais nanotexturizados que apresentam importantes aplicações, como biosensores e dispositivos médicos e ópticos (BRACERAS et al., 2007).

Em meados da década de 80, efeitos biológicos, resultantes do bombardeamento iônico em sistemas vivos, foram reconhecidos e demonstrados experimentalmente (YU et al., 1991). Progressos importantes vêm sendo alcançados no que diz respeito ao entendimento e à utilização das interações entre os íons implantados e o material biológico, o que resulta na criação de novas biotecnologias (FENG et al., 2006).

Atualmente, a técnica de bombardeamento iônico com baixa energia em materiais biológicos é aplicada com sucesso para mutação de plantas agrícolas e hortícolas (NORARAT et al., 2009). A tecnologia de transferência de genes tem criado novas alternativas para a produção de plantas mais adaptadas ao ambiente de cultivo e com maior capacidade de produção (SANTARÉM, 2000).

A implantação iônica é também utilizada no estudo de alterações de materiais metálicos, principalmente, para reduzir corrosão e oxidação dos mesmos (WILLIAMS et al., 1991; RANGEL; PAIVA, 1996).

Aço inoxidável é um material com aplicações tecnológicas em diversas áreas, como nas indústrias automotiva, química, nuclear e de alimentos, construção civil e confecção de dispositivos médicos (LO et al., 2009). Contudo, esta superfície pode apresentar corrosões localizadas, principalmente do tipo pite que é provocado pela

presença de haletos, particularmente, os cloretos (ZHANG et al, 1993). Com o intuito de melhorar a resistência desta liga metálica ao ataque destes compostos, elementos químicos como, por exemplo, molibdênio, silício, titânio e vanádio, são adicionados, o que resulta na formação de uma estrutura mais estável e homogênea (PÉREZ et al., 1998; MARTÍNEZ et al., 2005). Como a corrosão é um fenômeno associado à estrutura e composição superficial do material, a técnica de bombardeamento iônico é empregada com sucesso na produção de novas ligas metálicas, uma vez que modificará as propriedades físicas e químicas da superfície (MARTÍNEZ et al., 2005).

Dentre os aços inoxidáveis cuja técnica de implantação iônica é utilizada encontra-se a classe AISI 304 (HERTING et al., 2008) liga metálica de cromo (17,5 a 19,5% p/p) e níquel (8 a 10,5% p/p) (BADDOO, 2008) comumente usada em equipamentos e utensílios para processamento de alimentos. Esta considerável concentração de níquel (8 a 10 % p/p) confere resistência à corrosão e, geralmente, um efeito de retardamento sobre a taxa de migração (libertação) de metal da liga para o meio. Entretanto, o níquel é relativamente caro no mercado e é questionado a partir do ponto de vista toxicológico. No entanto, esta resistência à corrosão pode ser obtida sem níquel, desde que o teor de cromo seja suficientemente elevado (12% p/p). Assim, ao se utilizar os aços inoxidáveis ferríticos, ligas sem níquel e que apresentam cromo como material base de maior concentração, como o AISI 430 (16 a 18% p/p de Cr), por exemplo, em utensílios para alimentos, os potenciais efeitos adversos à saúde devido à libertação de níquel são eliminados (HERTING et al., 2008).

Pesquisadores observaram que ao implantar íons N^+ , Ar^+ e Si^+ em aço inoxidável AISI 304 e AISI 430 diferentes resultados foram obtidos. Estes elementos implantados foram encontrados na camada passivadora de ambas as ligas metálicas. Os íons N^+ não apresentaram efeito relevante na estrutura e composição da camada passivadora e não foi encontrado formando nitrito de ferro e cromo. Já o principal efeito causado pelos íons Ar^+ foi o de aumentar a taxa de cromo e ferro na camada passivadora, o que resultou em uma maior resistência a corrosão dos aços bombardeados. Por fim, a camada passivadora com os íons de silício implantados apresentou diferente estrutura, sendo encontrado óxidos, dentre eles, óxido de silício (SiO_2), e hidróxidos fora de seu limite, a camadas mais profundas (CANO et al., 2006).

Outras propriedades de ligas metálicas como, resistência ao uso e dureza, também podem ser modificadas (KUKAREKO; BYELI, 2000; OLOFINJANA et al., 2005). Íons N_2^+ implantados em aço conduziram na formação de nitritos de carbono e silício (C-N-Si) que modificaram a superfície e, conseqüentemente, melhoraram a dureza do material (OLOFINJANA et al., 2005).

Outro estudo mostrou que o bombardeamento de N^+ em aço inoxidável AISI 8642 aumentou a dureza em 150% quando comparada ao material sem o tratamento. Entretanto, não houve modificação no coeficiente de fricção ao implantar N^+ (YOUSSEF et al., 2004).

Pesquisas também são realizadas com o propósito de entender detalhadamente os efeitos e mudanças que a implantação iônica causa em polímeros (SUN et al., 1998; SVORCÍK et al., 1998; ZHU et al., 2002; LIPINSKI et al., 2009). Com isso, busca-se tornar a estrutura do polímero mais compacta, rígida e de difícil penetração, melhorando propriedades, como resistência ao desgaste, condutividade elétrica, resistência a solventes, molhabilidade e estabilidade térmica (ALMEIDA; TABACNIKS, 2009). No caso de materiais cerâmicos, propõe-se a criação de superfícies mais resistentes à corrosão e ao desgaste (BRENSCHEIDT et al., 1998; ZHOU et al., 2009), que poderão ser empregadas na indústria metalúrgica (ALMEIDA; TABACNIKS, 2009).

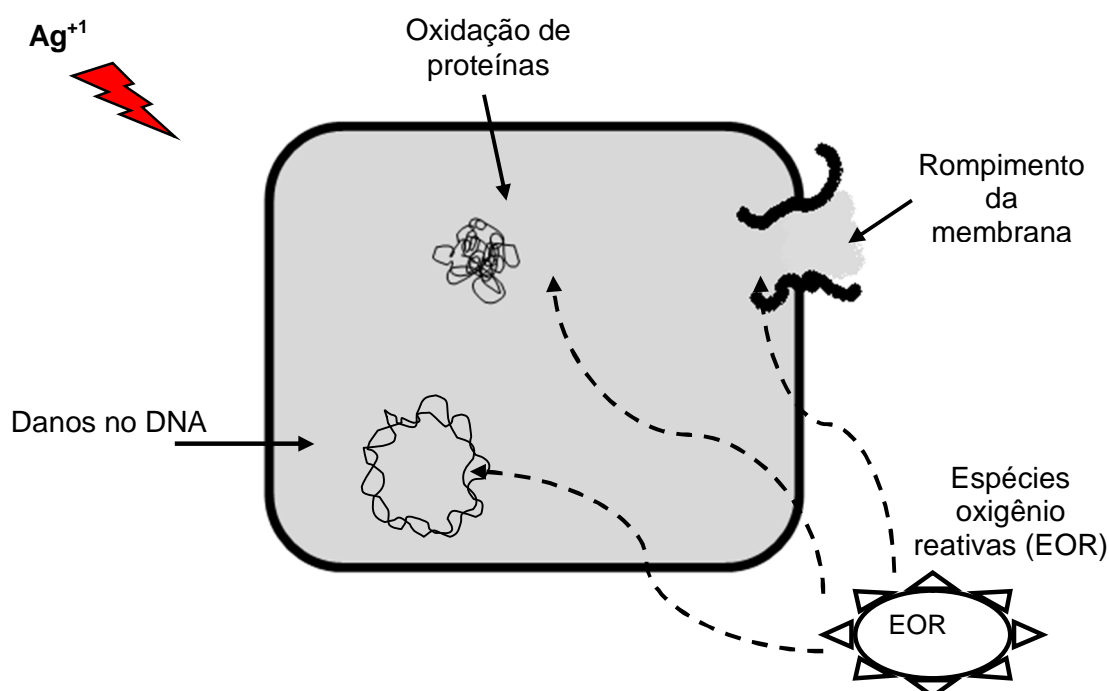
2.3 Uso de prata como agente antimicrobiano

Indústrias farmacêuticas e pesquisadores investigam novos agentes antimicrobianos pelo fato de muitas bactérias patogênicas apresentarem resistência aos antibióticos (RAI et al., 2008). Prata e cobre, especialmente prata, são exemplos destes novos agentes que têm chamado atenção por causa de suas propriedades antimicrobianas (WAN et al., 2007).

As propriedades antimicrobianas dos compostos e íons de prata são historicamente reconhecidas e apresentam uma ampla aplicação que vai deste a desinfecção e constituição de dispositivos médicos, creme para queimaduras até em tratamento de água (GUPTA; SILVER, 1998; BOSETTI et al., 2002; CHOU et al., 2005). Entretanto, o mecanismo de ação não está totalmente elucidado (LI et al., 2008). Segundo Matsumura et al. (2003), íons Ag^{+1} são capazes de interagir com grupos tióis de proteínas, o que resulta na inativação de enzimas respiratórias do

metabolismo microbiano e conduzem a síntese de espécies de oxigênio reativas. Estudos também demonstraram que os íons Ag^{+1} evitam a replicação do DNA, afetam a estrutura e permeabilidade da membrana celular (FENG et al., 2000), além de serem compostos foto ativos na presença de radiação UVA e UVC, o que promove o aumento da inativação de vírus e bactérias por UV (Figura 6) (RAHN et al., 1973).

Figura 6 - Mecanismos de ação de íons Ag^{+1} .



Fonte: Adaptado: Li et al., 2008.

A prata iônica (Ag^{+1}) é considerada efetiva contra muitos micro-organismos e apresenta atividades terapêuticas quando utilizada em baixas concentrações. O seu grande emprego em produtos para cuidados com a saúde deve-se ao fato de sua ação antimicrobiana, mas também a sua baixa toxicidade às células humanas (PERCIVAL et al., 2005). Segundo Venugopal e Luckey (1978), os valores de dose letal (DL_{50}) oral para a ingestão de prata coloidal e nitrato de prata, em camundongos, foram de 100 mg.kg^{-1} e 129 mg.kg^{-1} . A dose de referência (RfD), quando em exposições crônicas e subcrônicas, é de $0,005 \text{ mg/kg/dia}$, sendo calculada a partir do menor efeito adverso observado (LOAEL) de $0,014 \text{ mg/kg/dia}$, em pacientes que receberam injeções de arsfenammina de prata (U.S. EPA, 1994a, 1994b).

Entretanto, a resistência a biocidas pode ser adquirida via mutações em genes de células normais, plasmídeos ou ainda transposons (DAVIES, 1997). Silver (2003) sugere que o uso incontrolável de Ag^{+1} pode resultar em um maior desenvolvimento de bactérias resistentes a estes compostos. Mas a probabilidade de transferência dos genes de resistência a prata é considerada pequena, além de serem instáveis (MCHUGH et al., 1975).

Biocidas, como prata, e antibióticos apresentam diferentes modos de ação. Diferentemente dos antibióticos que têm sítio de ação específico e são empregados em concentrações próximas à inibitória mínima (MIC), os biocidas apresentam espectro de ação mais amplo, muitos alvos na célula microbiana para sua ação antimicrobiana e são empregados em concentrações superiores a mínima dose inibitória. Por isso, a resistência à sua ação é bem menor do que a encontrada para os antibióticos (PERCIVAL et al., 2005). Em concentrações entre (10^{-9} a 10^{-6}) mol.L^{-1} , íons Ag^{+1} são efetivos contra bactéria, fungos e vírus (RUSSEL; HUGO, 1994).

2.4 Utilização de bacteriófagos no controle de patógenos alimentares

Os vírus de bactérias foram descobertos por Frederick Twort, um bacteriologista inglês, e por Félix d'Herelle, um microbiologista Franco-Canadense do Instituto Pasteur, há aproximadamente 100 anos. Contudo, foi d'Herelle quem dedicou-se as pesquisas com estes vírus e os nomeou, em 1916, como bacteriófagos, ou seja, "vírus que come bactéria" (SILLANKORVA, 2008).

Em 1917, d'Hérelle publicou procedimentos gerais de isolamento destes vírus. Pouco tempo depois, após alguns ensaios, este pesquisador isolou fagos de bactérias causadoras de doenças relevantes, como cólera e difteria, desenvolvendo assim o método principal para quantificação de vírus e outras teorias, nomeadamente o do ciclo de replicação dos fagos (LEVINE, 1939; SILLANKORVA, 2004).

Os fagos não apresentam metabolismo próprio e, por esse motivo, necessitam dos recursos energéticos e materiais dos seus hospedeiros para se replicarem (DUCKWORTH, 1987). São vírus ubiqüitários na natureza, encontrados em solo, água, pele, saliva, fezes, (SILLANKORVA, 2008) e até mesmo em alimentos (DEL RIO et al., 2007). Além disso, são muito específicos e não são

patogênicos para homens e animais e apenas se replicam nos locais aonde se encontra a infecção (SILMÕES et al., 2010).

Bacteriófagos foram utilizados pela primeira vez com sucesso para tratar infecções bacterianas uma década antes da descoberta da penicilina. No início do século 20, estudos foram realizados tanto com humanos como com animais. Mas somente em 1940 sete preparações fágicas para diferentes doenças bacterianas, por exemplos por *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia*, foram produzidas pela companhia Eli Lilly (Indianapolis, Ind.) (SILLANKORVA, 2004).

No entanto, a excitação que sucedeu o sucesso inicial foi de curta duração, por causa da falta de conhecimento sobre a biologia básica dos fagos e, como consequência, a biocontrole com bacteriófagos foi abandonada (HANLON, 2007).

Recentemente, o interesse pela utilização de fagos aumentou, uma vez que bactérias estão cada vez mais resistentes aos antibióticos (HAGENS; LOESSNER, 2007) e outros antimicrobianos, como sanitizantes, principalmente quando em biofilmes (SUTHERLAND et al., 2004).

São diversas as áreas de aplicação de fagos, como por exemplos agentes de controle de bactérias, nomeadamente na produção animal, horticultura e agricultura e, como citado, na medicina (SILLANKORVA, 2008).

Estudos com animais como aves, peixes e bovinos foram realizados com o objetivo de reduzir a população bacteriana patogênica, na tentativa de minimizar doenças (LOC CARRILLO et al., 2005; ATTERBURY et al., 2007).

A infecção viral de células em biofilmes é condicionada pela composição química e concentração do fago e fatores ambientais como temperatura, estágio de multiplicação e meio (CHAIGNON et al., 2007). É importante também destacar que a ligação vírus e célula ocorrerá se esta apresentar sítios receptores de ligações disponíveis. A integridade do biofilme pode ser rapidamente afetada se o fago sintetiza enzimas polissacarídicas degradantes (SIMÕES et al., 2010).

Estudos mostram que fagos utilizados para infectar diferentes biofilmes bacterianos foram capazes de reduzir o número final de células microbianas (HUGHES et al., 1998; HANLON et al., 2001; SHARMA et al., 2005; CURTIN; DONLAN, 2006; SILLANKORVA, 2008).

Apesar de haver anos da descoberta dos fagos, há muito que se pesquisar. Novos estudos estão sendo conduzidos, principalmente por causa do crescente interesse e investimento econômico por parte de um grande número de empresas

mundiais que reconhecem a notável capacidade de controle bacteriano pelos bacteriófagos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho contou com o apoio de diversas instituições. Este, por sua vez, foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Engenharia Biológica, da Universidade do Minho (UM), Braga, Portugal; no Laboratório de Nanoscopia, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais; no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e no Laboratório de Física de Superfícies, Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.1 Preparo e caracterização dos cupons de aços inoxidáveis modificados pela técnica de implantação iônica

3.1.1 Superfícies implantadas

Cupons teste de aço inoxidável austenítico AISI 304 e ferrítico AISI 430, com diferentes acabamentos nº 2B, 4, 6 e 8 (Brinox, Brasil) (Tabela 3), com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm, foram utilizados para avaliar a adesão de células de *Listeria monocytogenes*, antes e após, a implantação de íons Ag⁺¹. As superfícies foram avaliadas também quanto às características de hidrofobicidade, topografia e composição.

Tabela 3 - Características das superfícies de aço inoxidável e dos acabamentos n° 2B, 4, 6 e 8.

Tipos de acabamento	Características dos acabamentos e das superfícies
N° 2B	O aço inoxidável é laminado a frio, recozido e decapado. Em seguida, há laminação com cilindros brilhantes (<i>skin pass</i>). A superfície apresenta um brilho superior ao acabamento 2D, cuja superfície não é laminada com cilindros.
N° 4	O aço inoxidável é lixado em uma direção com abrasivos de grana de 120 mesh a 150 mesh. É um acabamento com rugosidade menor que o n° 3 (acabamento com abrasivos de grana de 100 mesh).
N° 6	O material com acabamento n° 4 passa por panos embebidos com pastas abrasivas e óleos. Assim, resulta em uma superfície com aspecto fosco, satinado e com refletividade inferior a do acabamento n° 4.
N° 8	A superfície é polida com abrasivos cada vez mais finos com o objetivo que as linhas de polimento desapareçam. É considerado o acabamento mais fino e permite que os aços inoxidáveis sejam usados como espelhos.

Fonte: Carbó, 2001.

3.1.2 Implantação dos íons de prata em aço inoxidável

Um acelerador Tandem 3 MV (High Voltage Engineering Europa, Holanda) foi empregado para a implantação dos íons Ag^{+1} nos cupons de aço inoxidável.

Os cupons foram higienizados em banho ultrassônico (40 kHz; Unique, Brasil) com acetona, por 10 min. Em seguida, foram imersos em água destilada durante 10 min (ZHAO et al., 2007). Os íons Ag^{+1} foram implantados à temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma dose de $2,0 \times 10^{16}$ íons. cm^{-2} , corrente de $1,0\text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e energia de 200 keV, para todas as superfícies, ou 70 keV, apenas para aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento 2B.

3.1.3 Avaliação química das superfícies

As análises dos cupons implantados com íons Ag^{+1} foi realizada por espectrometria de retroespalhamento de Rutherford (RBS), empregando-se implantador de íons de 500 kV e acelerador tipo Tandem de 3 MV (High Voltage Engineering Europa, Holanda), com feixes monoenergéticos de partículas (He^{+2}), com energia de 1,2 MeV para os cupons implantados com 200 keV e 1,5 MeV para aqueles com 70 keV. Os íons de He^{+2} retroespalhados foram detectados por meio de um sistema de dois detetores de silício de barreira de superfície, localizados a 165° à direção de incidência do feixe (ARAUJO, 2000).

O estado químico dos íons Ag^{+1} implantados no cupom de aço inoxidável foram avaliados por espectroscopia fotoeletrônica de raio-X (XPS) (VG-Escalab 220-ixL, França) cujos parâmetros utilizados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados para análise de espectroscopia fotoeletrônica de raio-X (XPS).

Parâmetros	Espectro varredura *	Espectro para detecção da prata (Ag 3d)
Energia de ligação (eV)	0 a 1.000	365 a 377
Energia de passagem (eV)	50	20
Número de varreduras	1	20
Tempo por canal (ms)	200	200

*espectro de fotoemissão

3.1.4 Microscopia de força atômica (MFA)

Antes de cada análise, com exceção da avaliação química das superfícies (Item 3.1.3), os cupons de aço inoxidável foram higienizados por meio de imersão em solução aquosa de detergente neutro líquido comercial (Sonazol Loiças, Portugal) a 0,2% (v/v), por 5 min, enxaguados com água ultrapura (Milli-Q Biocel, Millipore, Estados Unidos) por duas vezes e imersos em etanol (P.A.), por 15 min para remoção de gordura. Após, foram enxaguados com água ultrapura, secos em estufa (Memmert Model 600, Alemanha) a 60°C e autoclavados (Sanyo Labo

Autoclave, Estados Unidos) a 121 °C, por 1 h. Por fim, foram secos em estufa, a 60 °C, por 1 h (RODRIGUES, 2010).

A topografia dos cupons teste foi caracterizada pela técnica de microscopia de força atômica, em equipamento Universal SPM System Ntegra Prima (NT-MDT, Russia). As imagens foram obtidas usando-se a técnica de contato intermitente, de acordo com metodologia proposta por Silva et al. (2003). Em síntese, nesta técnica, uma ponta, com raio de curvatura de 5 mm a 10 mm, foi conectada a um oscilador piezoeletrônico, forçada a vibrar perto de sua frequência de ressonância sobre a superfície da amostra em, aproximadamente, 500 vezes por ponto. As medidas de alterações na frequência de vibração de acordo com a altura da amostra foram traduzidas com auxílio de um software específico para determinar a variação de altura na forma de imagem da amostra. Os parâmetros obtidos foram R_a , média aritmética do somatório de todos os valores da altura de pontos utilizados em dado perfil, e R_z , a diferença de altura entre a média de cinco picos mais altos e a média de cinco vales mais baixos, ao longo de um dado perfil. Foram realizadas 3 medidas em pontos diferentes para cada cupom de um mesmo material.

3.1.5 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade dos cupons higienizados (Item 3.1.4) foi determinada pela medida do ângulo de contato (VAN OSS et al., 1987; 1989) com o goniômetro OCA 20 (Dataphysics, Alemanha). Em temperatura ambiente (24 °C \pm 1 °C), foram realizadas, no mínimo, 25 medidas com cada um dos líquidos: α -Bromonaftaleno (AppliChem, Alemanha), Formamida (AppliChem, Alemanha) e água ultrapura (Milli-Q Biocel, Millipore, Estados Unidos).

3.2 Avaliação da adesão de *Listeria monocytogenes* em cupons de aços inoxidáveis modificados pela técnica de implantação iônica

Utilizou-se a metodologia descrita por Rodrigues (2010) com modificações. Os testes foram realizados em triplicada e três repetições.

3.2.1 Micro-organismos

Listeria monocytogenes CECT 4031T da *Spanish Type Culture Collection* (CECT), estirpe que corresponde a *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, sorotipo 1/2a da *American Type Culture Collection* (ATCC), foi utilizada para realização desta parte da pesquisa. A cultura microbiana foi mantida, em ultrafreezer (Cryocell, Portugal), a - 80 °C, em tubo Eppendorf® contendo caldo triptona de soja (TSB; Merck, Alemanha) e glicerol (AppliChem, Alemanha) (30%, v/v) até sua utilização.

3.2.2 Preparo da suspensão de células vegetativas

A cultura pura de *L. monocytogenes* CECT 4031T mantida conforme descrito no Item 3.2.1 foram repicadas em uma placa de Petri contendo ágar triptona de soja (TSA; Merck, Alemanha) enriquecido com 0,6% (m/m) de extrato de levedura (YE, Merck, Alemanha) e incubadas a 37 °C (Binder BD-115, Estados Unidos), por 24 h. Desta placa, colônias foram retiradas, em seguida, repicadas em 20 mL de caldo TSB e incubadas (Stuart Scientific Orbital Incubator SI50, Inglaterra), a 37 °C, por 18 h, a 120 rpm. Após este período, o conteúdo foi centrifugado (Sigma 3-16K, Alemanha) por 5 min, a 9.000 g, a 4 °C para lavagem das células em tampão fosfato-salino (PBS, 0,1 mol/L, em pH = 7,4). Este procedimento foi realizado por duas vezes e as células foram ressuspendidas em 20 mL de PBS. Um volume de 200 µL de solução de cada micro-organismo foi pipetado para uma microplaca de 96 poços (Orange Scientific, Bélgica) para padronização da densidade ótica ($OD_{640\text{ nm}} = 0,3$), em um leitor de microplacas (Sunrise-basic TECAN, Suíça). Como branco utilizou-se tampão PBS, para obtenção de uma concentração de $1,0 \times 10^9$ células.mL⁻¹ (RODRIGUES, 2010).

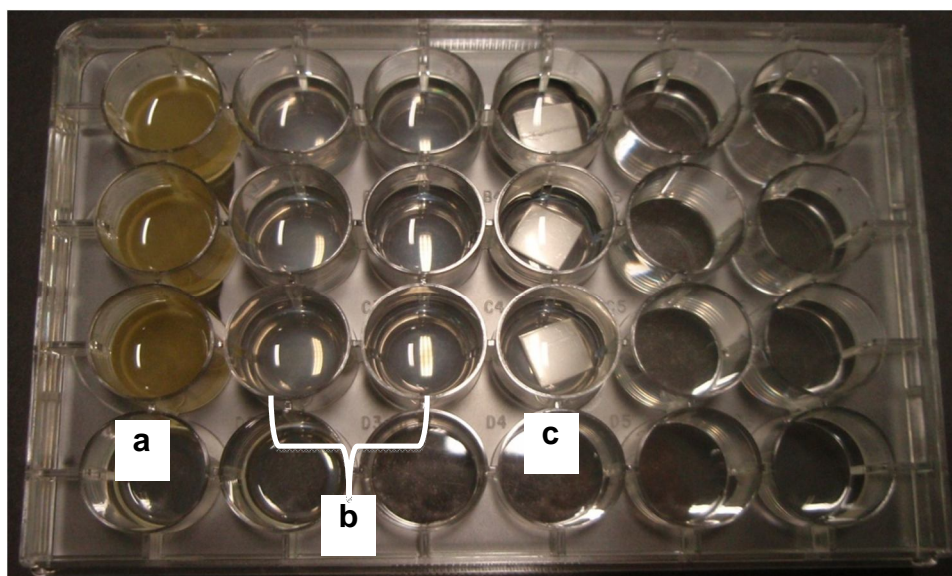
3.2.3 Adesão do micro-organismo nas superfícies

Após higienização (Item 3.1.4), cada cupom foi colocado em uma placa de cultura de tecidos de 24 poços (Orange Scientific, Bélgica), com 970 µL com TSB enriquecido com YE e 30 µL da suspensão celular descrita no Item 3.2.2 em cada poço. Por fim, as placas foram incubadas a 4 °C, por 2 h, a 120 rpm.

3.2.4 Determinação do número de células aderidas

À temperatura ambiente ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), os cupons teste foram retirados dos poços da placa de cultura de tecido (Figura 7) contendo *L. monocytogenes* e TSB enriquecido com YE e imersos, cuidadosamente, em poços limpos com $1.000\text{ }\mu\text{L}$ de meio mínimo, MM ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona [Merck, Alemanha], $8,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl [Applichem, Alemanha]), por 20 s. Este procedimento de rinsagem foi realizado por duas vezes com o objetivo de retirar as células planctônicas. Em seguida, os cupons foram imersos em $1.000\text{ }\mu\text{L}$ de meio mínimo (MM) para retirada das células aderidas. Esta etapa foi realizada pela realização do esfregaço de ponteiras ($200\text{ }\mu\text{L}$), para utilização em pipeta automática, em toda superfície de ambos os lados de cada cupom. Alíquotas de $10\text{ }\mu\text{L}$ foram coletadas e plaqueadas pela técnica de microgotas em placas de Petri com ágar seletivo *Listeria* Oxford (LOA, Merck, Alemanha). Por sua vez, as placas de Petri foram incubadas (Binder BD-115, Estados Unidos) por 24 h, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, apenas colônias negras foram contadas.

Figura 7 - Placa de cultura de tecido com poços preenchidos com diferentes soluções, sendo que na coluna (a), há caldo triptona de soja (TSB) enriquecido com extrato de levedura (YE) e células de *Listeria monocytogenes* CETC 4031T; na coluna (b), meio mínimo para retirada das células planctônicas e; na coluna (c), cupons de aço inoxidável não implantados de íons Ag^{+1} imersos em meio mínimo.



3.2.5 Determinação da hidrofobicidade da superfície bacteriana

As medidas do ângulo de contato da superfície de células de *L. monocytogenes* foram realizadas de acordo com Busscher et al. (1984). Sucintamente, a suspensão de bactérias foi depositada sobre uma membrana de acetato celulose de 0,45 μm (Frilabo, Portugal) por filtração da suspensão sob vácuo (Vacuubrand, Alemanha). Após, as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar-ágar ($w_{\text{ágar}} = 1\%$; m/v) (AppliChem, Alemanha) e glicerol ($\varphi_{\text{glicerol}} = 10\%$; v/v).

A hidrofobicidade da superfície microbiana foi avaliada conforme aproximação de van Oss et al. (1987; 1989). Realizaram-se no mínimo 25 medidas, à temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), com cada líquido que, neste caso, foram α -bromonaftaleno (AppliChem, Alemanha), formamida (AppliChem, Alemanha) e água ultrapura, utilizando o goniômetro OCA 20 (Dataphysics, Alemanha).

3.3. Estudo da formação de biofilmes de células de *L. monocytogenes* em cultura simples e cultura mista com células de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável e seu controle biológico

3.3.1 Micro-organismos e bacteriófago

Foram utilizados os micro-organismos *Listeria monocytogenes* 747, isolado de queijo (Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal), sorotipo 1/2b, *Listeria monocytogenes* 994 isolado de leite de cabra (Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal), sorotipo 4ab e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663, durante a etapa de formação de biofilmes de aço inoxidável, seguida da infecção por bacteriófago $\phi\text{IBB-PF7A}$ (SILLANKORVA, 2008). As estirpes bacterianas foram mantidas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubo Eppendorf[®] contendo caldo TSB e glicerol (30%, v/v) e o bacteriófago em tampão *Saline Magnesium*, SM ($5,8\text{ g.L}^{-1}$ NaCl, 2 g.L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de Tris-HCl 1 M [pH = 7,5]) (Applichem, Alemanha), a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, até utilização.

3.3.2 Superfície metálica e de vidro e preparo

Foram utilizadas superfícies de aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento 4, dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm (diferente origem do aço AISI 304, nº 4 do Item 3.1.1) para avaliar a formação de biofilme de *L. monocytogenes* em cultura simples e cultura mista com *P. fluorescens*, a infecção com o bacteriófago e a hidrofobicidade das superfícies. Cupons testes de vidro com dimensões iguais aos de aço inoxidável foram empregadas para avaliação dos biofilmes formados por microscopia de epifluorescência, sendo as células de *L. monocytogenes* coradas pela técnica hibridização *in situ* por fluorescência (*Peptide Nucleic Acid fluorescence in situ hybridization; PNA fish*) e de *P. fluorescens* por 4', 6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ALMEIDA et al., 2011).

3.3.3 Determinação da hidrofobicidade

A avaliação da hidrofobicidade das superfícies higienizadas (Item 3.1.4) do aço inoxidável e das estirpes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* foi realizada conforme descrito nos Itens 3.1.5 e 3.2.5.

3.3.4 Determinação da produção do bacteriófago

A solução de fago concentrada foi produzida, utilizando-se placas de lise e o método de eluição proposto por Sambrook e Russel (2001), com modificações.

Em 15 placas de Petri contendo TSA, inocularam-se 100 µL de *P. fluorescens* que foram espalhados manualmente por toda a superfície. Em seguida, foram adicionados 3 mL de *top* agar (TSB; 0,6% [p/v] agar agar). Após a solidificação do meio, imergiu-se a ponta de uma fita de papel estéril (1 cm x 5 cm) em uma solução de bacteriófagos ϕ IBB-PF7A (SILLANKORVA, 2008) de concentração desconhecida e, cuidadosamente, umedeceu-se com conteúdo da fita a superfície do *top* agar. Posteriormente, as placas foram incubadas (Certomat HK, Inglaterra) por 18 h, a 25 °C.

Depois deste período, foram adicionados 3 mL de tampão SM em cada placa e incubadas a 4 °C, por 5 h, 80 rpm. Estas placas foram retiradas da refrigeração e o líquido nelas presente foi recolhido em tubos de centrífuga de 50 mL (Orange

Scientific, Bélgica) e adicionados 0,584 g de NaCl para cada 10 mL de solução, com o objetivo de remover possíveis bactérias e seus metabólitos por elas sintetizados. As amostras imersas em banho de gelo, por 1 h e, a seguir, centrifugadas a 11.000 g, por 10 min, a 4 °C. A cada 10 mL de sobrenadante foi adicionado 1 g de polietileno glicol (PEG 8.000; Applichem, Alemanha). Os frascos foram incubados a 4 °C, por 18 h, a 120 rpm e, então, centrifugados a 11.000 g, a 4 °C, por 10 min. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos invertidos sobre papéis, por 5 min, para retirada do líquido residual.

A cada 10 mL do volume inicial obtido após incubação das 15 placas com 3 mL de tampão SM adicionou-se nos tubos 160 µL do mesmo tampão e, em seguida, agitados. Após homogeneização, 1 mL de clorofórmio (Applichem, Alemanha) para cada 3 mL de tampão SM foi adicionado. Os frascos foram novamente agitados em vortex (Biovortex V1 – BIOSAN, Letônia), por 30 s e, em seguida, centrifugados a 3.500 g, por 15 min, a 4 °C. Por fim, a fração menos densa foi separada e filtrada em filtros de acetato de celulose (0,2 µm; Frilabo, Portugal) e armazenada a 4 °C até utilização.

3.3.5 Preparação da suspensão de células microbianas

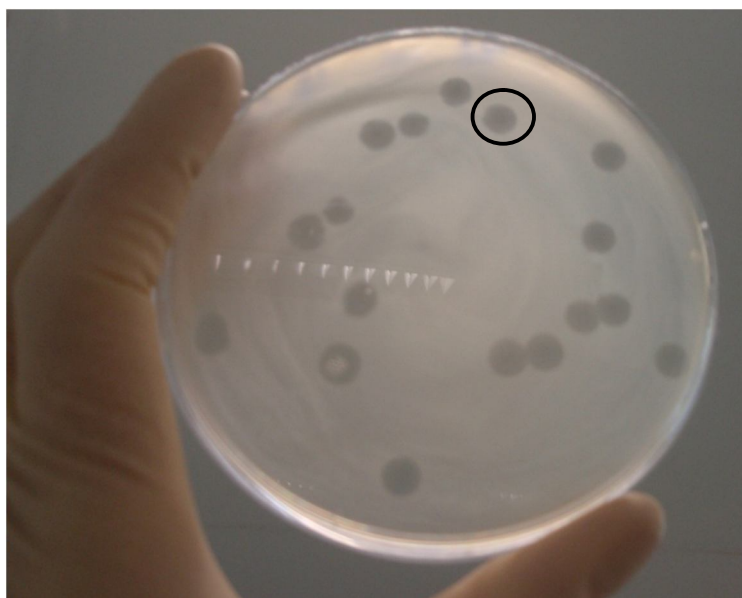
Esta etapa foi realizada conforme protocolo descrito por Rodrigues (2010) com modificações. As culturas puras de *L. monocytogenes* 747, *L. monocytogenes* 994 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663, mantidas conforme descrito no Item 3.3.1, foram repicadas em uma placa de Petri contendo ágar TSA enriquecidas com extrato de levedura e incubadas a 37 °C, para *L. monocytogenes*, ou a 25 °C, para *P. fluorescens*, por 24 h. Colônias obtidas de cada placa foram inoculadas em 20 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Merck, Alemanha) e incubadas a 37 °C ou 25 °C, a 120 rpm, por 18 h. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado por 5 min, a 9.000 g, a 4 °C, para lavagem das células em solução salina (NaCl; 0,9%, m/v) (AppliChem, Alemanha), por duas vezes, e as células ressuspendidas em 20 mL da mesma solução. Um volume de 200 µL de solução de cada micro-organismo foi pipetado para uma microplaca de 96 poços para padronização da densidade ótica (OD) em Elisa. No caso de *L. monocytogenes*, a leitura foi realizada a 640 nm sendo a OD de 0,3 e para *P. fluorescens* a OD foi de 0,1 a 600 nm. Utilizou-se como branco 200 µL de solução salina. A concentração final de cada bactéria foi de $1,0 \times 10^9$

células de *L. monocytogenes*.mL⁻¹ (RODRIGUES, 2010) e $1,0 \times 10^8$ células de *P. fluorescens*.mL⁻¹ (SILLANKORVA, 2008). Realizou-se uma diluição da solução de *L. monocytogenes* com o objetivo de inocular a mesma concentração celular na etapa de avaliação da formação de biofilme em aço inoxidável (Item 3.3.7).

3.3.6 Titulação da solução estoque de bacteriófago

A titulação da solução estoque de bacteriófagos (Item 3.3.4) foi analisada conforme Adams (1959). Diluições seriadas foram preparadas à partir da solução estoque. Um volume de 100 µL de cada diluição foi adicionado à três placas de Petri com TSA (Merck, Alemanha) contendo 100 µL de solução salina com células de *P. fluorescens* (Item 3.3.5). Em seguida, adicionaram-se 3 mL de *top agar* (Item 3.3.4), espalhando sobre a superfície com TSA. As placas foram incubadas a 25 °C, por 18 h. Após este período, as unidades formadoras de placas (PFU) (Figura 8) foram calculadas.

Figura 8 - Contagem do número de unidades formadoras de placas (PFU). O halo preto indica a presença de uma unidade formadora de placa.



3.3.7 Avaliação da formação de biofilmes bacterianos nas superfícies

Os cupons higienizados (Item 3.1.4) foram colocados um a um em cada poço das placas de cultura de tecidos de 24 orifícios, contendo 970 µL com BHI e 30 µL

da suspensão celular descrita no Item 3.3.5, no caso de formação de biofilmes de cultura microbiana simples. Contudo, para a formação de biofilmes de cultura microbiana mista houve adição em cada poço de 940 µL de BHI e 30 µL de cada estirpe. As placas foram incubadas a 4 °C, 25 °C e 37 °C, por 72 h, a 120 rpm, com troca do meio cada 24 h. Este procedimento foi realizado cuidadosamente com retirada do meio de cultura e adição de um volume de 1.000 µL de BHI pela lateral de cada poço.

Este teste foi realizado em triplicata, em três repetições, para biofilme de cultura simples de cada estirpe bacteriana e para biofilme de cultura mista de ambas as estirpes de *L. monocytogenes* com *P. fluorescens*, com e sem infecção fágica (Item 3.3.8).

3.3.8 Determinação do número de células nos biofilmes

Os cupons testes (Item 3.3.7) foram retirados dos poços da placa de cultura de tecido contendo BHI com células microbianas e imersos, cuidadosamente, por duas vezes seguidas, em poços limpos e diferentes contendo 1.000 µL de solução salina por 20 s para retirar as células planctônicas. Em seguida, os cupons foram imersos em outro poço com 1.000 µL de solução salina para retirada das células aderidas. Esta etapa foi realizada por meio da realização de esfregaço de ponteiros de 100 µL em toda superfície em ambos os lados de cada cupom. Alíquotas de 10 µL foram coletadas e plaqueadas pela técnica de microgotas em placas de Petri contendo ágar seletivo *Listeria Oxford* (LOA, Merck, Alemanha), para quantificação de *L. monocytogenes*, e ágar Cetrimide (Merck, Alemanha), para quantificação de *P. fluorescens*. Por sua vez, as placas de Petri com LOA foram incubadas por 24 h, a 37 °C e aquelas contendo ágar Cetrimide foram incubadas a 25 °C, por 48 h. Após o período de incubação, enumerou-se as unidades formadoras de colônia (CFU), sendo as colônias negras em ágar LOA determinadas como *L. monocytogenes* e as amarelas-esverdeadas em ágar Cetrimide determinadas como *P. fluorescens*.

3.3.9 Infecção fágica dos biofilmes

Após a obtenção do número de fagos na solução estoque, conforme descrito no Item 3.3.6, diluições foram realizadas com o intuito de obter uma multiplicidade de

infecção (MOI) igual a 1, ou seja concentrações equivalentes do número de fagos e de células de *P. fluorescens*.

Os cupons (Item 3.3.7), em placas de cultura de tecido com biofilmes simples de *P. fluorescens* ou biofilmes mistos de *P. fluorescens* com *L. monocytogenes* 747, foram lavados, cuidadosamente, por duas vezes seguidas, em poços limpos contendo 1.000 µL de solução salina, por 20 s, para retirada das células planctônicas. Em seguida, os cupons foram imersos em outro poço com 500 µL de BHI e 500 µL da solução estoque fágica diluída para obtenção de um MOI igual a 1. As placas de cultura de tecido com os cupons foram incubadas a 4 °C e removidas para temperatura ambiente após 2 h, 6 h e 24 h com intuito de determinar as unidades placas fágicas do biofilme ou da solução (fagos em suspensão) e após 6 h e 24 h para contagem das unidades formadoras de colônia (células planctônicas). O tempo zero foi determinado de acordo com o Item 3.3.8. Por fim, o experimento controle foi realizado sem adição de fago, apenas com 500 µL de BHI e 500 µL de tampão SM.

3.3.10 Determinação das unidades formadoras de colônia e placas fágicas

As unidades formadoras de colônia (CFU) de células planctônicas de *L. monocytogenes* 747 e *P. fluorescens* em biofilme foram determinadas conforme descrito no Item 3.3.8. Entretanto, as unidades de placas fágicas (PFU) foram determinadas conforme descrito no Item 3.3.6.

3.3.11 Fluorescência de hibridização *in situ* de peptídeo de ácidos nucleicos (PNA FISH) e coloração com DAPI das células em biofilme

Biofilmes simples de *L. monocytogenes* 747 e *P. fluorescens* e biofilmes mistos de ambas as estirpes foram obtidos a 25 °C conforme procedimentos descritos nos Itens 3.3.5 e 3.3.7, após 4 h de infecção com os fagos (Item 3.3.9), contudo em superfícies de vidro, uma vez que a utilização do aço inoxidável não foi possível (ALMEIDA et al., 2011).

A coloração das células de *L. monocytogenes* foi realizada pela técnica de hibridação por PNA FISH e coloração das células de *P. fluorescens* com DAPI. A metodologia empregada foi a descrita por Almeida et al. (2011). Os cupons contendo

biofilmes simples de *L. monocytogenes* 747 e biofilme misto de *P. fluorescens* foram colocados sobre um papel filtro dentro de um recipiente (pequena caixa acrílica envolvida com papel alumínio) e secos a 60 °C (Termaks, Noruega), por 15 min. Em seguida, adicionou-se metanol (100%, v/v; Applichem, Alemanha), por 10 min, para desidratação das células. Após esta etapa, os micro-organismos foram fixados por 1 h com paraformaldeído 4% (m/v; Applichem, Alemanha) e poros foram criados na membrana com acréscimo de etanol 50% (m/v; Applichem, Alemanha), por 20 min a - 20 °C. Este procedimento permitiu a penetração da solução de hibridização (10% sulfato de dextrano [m/v], 10 mM NaCl; 30% formamida [v/v], 0,1% pirofosfato de sódio [m/v], 0,2% polivinilpirrolidona [m/v], 0,2% ficol [p/v], 5 mM EDTA, 0,1% [v/v] Triton X-100; 50 mM Tris-HCl [pH = 7,5]; 200 nM sonda PNA) na célula. A hibridização ocorreu a 57 °C (Termaks, Noruega), por 30 min. A sonda utilizada foi a LmPNA1253 (ALMEIDA et al., 2011) cuja sequência do oligômero em que ocorreu a hibridização foi a 5'- GAT CCT TTG TAC TAT-3', posições 1253 e 1257, região 16 SrRNA. Uma solução de lavagem (5 mM Tris-Base; 15 mM NaCl; 1% Triton X-100 [pH = 10, v/v]) foi adicionada aos cupons, por 30 min.

Biofilmes simples de *P. fluorescens* foram corados seguindo o mesmo protocolo até a etapa de fixação com paraformaldeído, depois se adicionou DAPI (100 µg.mL⁻¹), por 10 min, no escuro, à temperatura ambiente (21 °C ± 3 °C). Tomou-se o cuidado para que os cupons se mantivessem sempre umedecidos, após adição de qualquer solução.

Após coloração com DAPI, os cupons secos à temperatura ambiente (21 °C ± 3 °C) foram cobertos com óleo de imersão (Merck, Alemanha) e visualizados em aumento de 1.000 vezes em microscópio de epifluorescência (BX51, Olympus, Alemanha) equipado com uma câmera CCD (DP71, Olympus, Alemanha).

3.4 Análises dos resultados

Os experimentos de adesão microbiana em cupons com ou sem implantação de Ag⁺ (Item 3.2), os de formação de biofilmes simples ou mistos com ou sem infecção com bacteriófagos (Item 3.3) e as características de rugosidade, hidrofobicidade qualitativa dos cupons (Θ_w) ou estirpes bacterianas foram conduzidos segundo o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo

teste Tukey ($\alpha= 5\%$). As análises de variância foram realizadas utilizando-se procedimentos do programa *Statistical Analysis System – SAS 9.0* (1988).

Além da realização dos testes estatísticos, os ângulos de contato das superfícies dos cupons e micro-organismo que caracterizaram a hidrofobicidade (medida com água) foram analisados de acordo com a metodologia proposta por Vogler (1998), na qual uma superfície hidrofílica é classificada como aquela cujo ângulo de contato com a água é menor que 65° ou hidrofóbica, aquela com ângulo de contato maior que 65° . A hidrofobicidade foi também quantificada pelo cálculo de ΔG_{SWS}^{TOT} , conforme Equações 1, 4 e 5 e Tabela 1.

A profundidade média dos íons Ag^{+1} nos cupons de aço inoxidável foi determinada com o empregando do software *Simulation Program for the Analysis of NRA, RBS and ERDA* (SIMNRA 6.06) (MAYER, 1997) por meio dos espectros obtidos após análise de RBS.

Os resultados obtidos por RBS, XPS e topografia foram analisados de forma descritiva.

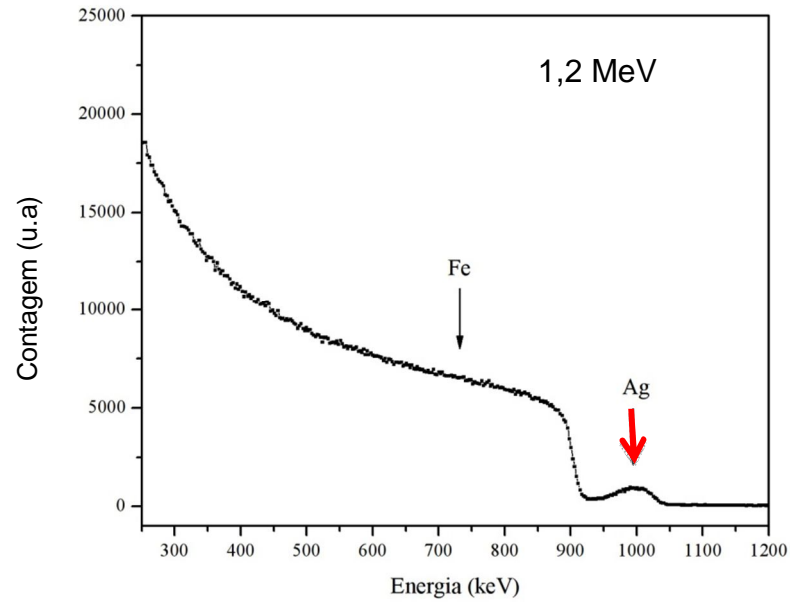
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Implantação iônica Ag^{+1} em aços inoxidáveis

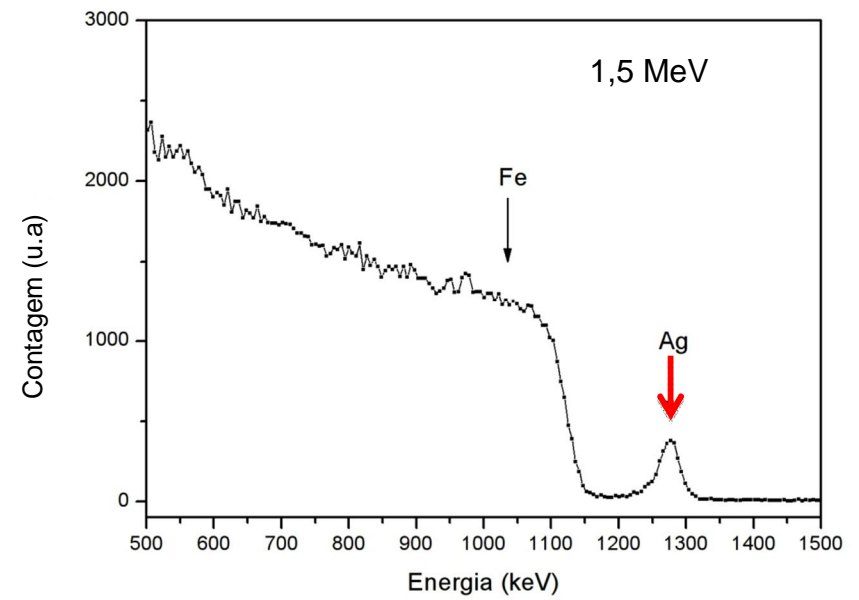
4.1.1 Avaliação química das superfícies

A implantação e distribuição de Ag^{+1} nas superfícies de aço inoxidável austenítico AISI 304 e ferrítico AISI 430 foi caracterizada por RBS. Observou-se por meio dos espectros (Figura 9) que os íons foram implantados nos diversos tipos aços inoxidáveis, ressaltando-se que o pico característico da prata nos cupons implantados com energia de 200 keV apresentou valor de 1.000 keV (Figura 9a) ou de 1.250 KeV para os cupons implantados com energia de 70 keV (Figura 9b).

Figura 9- Espectros de RBS de amostras de aços inoxidáveis: (a) austenítico AISI 304, acabamento 8, com Ag^{+1} implantada na energia 200 keV (seta vermelha) e (b) ferrítico AISI 430, acabamento 2B, com Ag^{+1} implantada na 70 keV (seta vermelha).



a

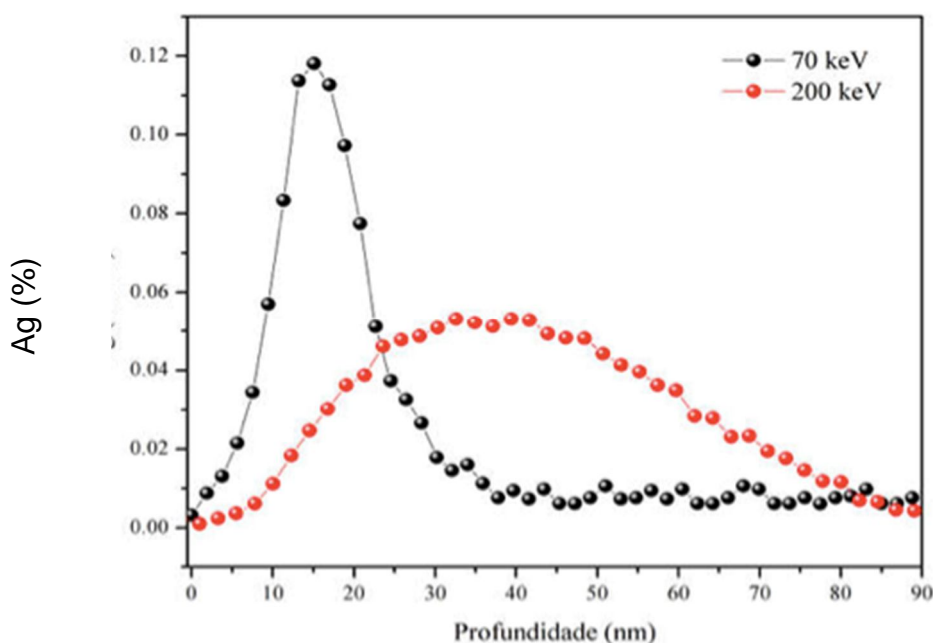


b

Verificou-se que o perfil de profundidade da prata implantada foi o Gaussiano, ou seja, a distribuição na amostra ocorreu desde a superfície até uma profundidade limite e o centro desta Gaussiana foi o pico de concentração. Com base na análise submetida ao software SIMNRA 6.06 (MAYER, 1997), este pico de concentração de prata na amostra implantada com 200 keV foi de uma profundidade de 30 nm da superfície e de 15 nm ao utilizar a energia de 70 keV, para ambos os tipos de aço inoxidável. Entretanto, observou-se a presença de prata desde a superfície até uma profundidade de 60 nm para 200 keV, e à profundidade de 30 nm para 70 keV (Figura 10).

Observou-se uma diferença máxima de 2 nm de profundidade entre a prata implantada nos cupons de AISI 304 e AISI 430. Esta diferença, provavelmente, associa-se à rugosidade e composição do aço.

Figura 10- Espectros de RBS para amostras de aços inoxidáveis com íons Ag^{+1} implantados para amostras de aço inoxidável AISI 304, acabamento n° 2B.



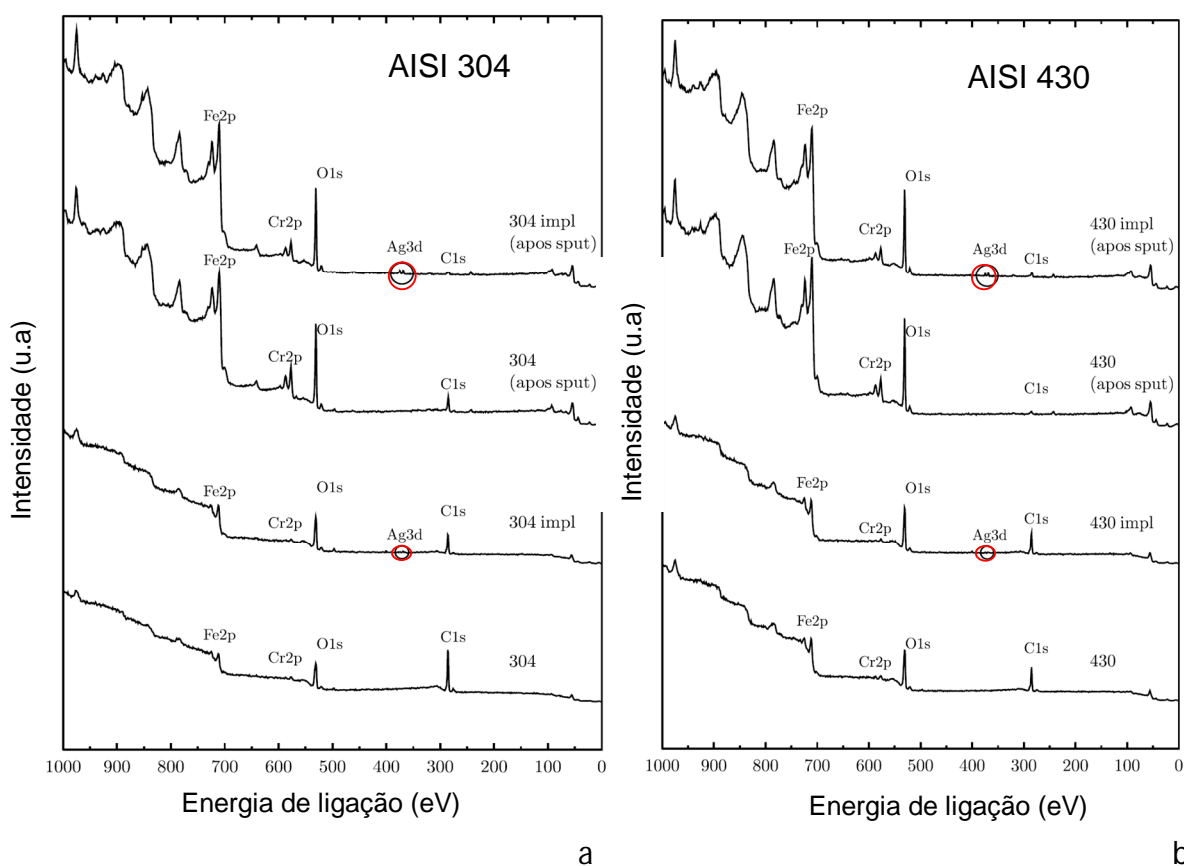
Os resultados da análise de RBS corroboram com os resultados das análises de XPS (Figura 11a e 11b), uma vez que foi possível observar que os cupons apresentaram Ag^{+1} implantados.

Foi possível identificar picos de energia característicos das ligações Fe 2p, Cr 2p, C 1s e O 1s (Figura 11), sendo correspondentes as faixas de ligação C=C ou C-

sp² (284,5 ± 0,1 eV); -CHO ou C-sp³ (285,3 ± 0,2 eV); -COH (286,5 ± 0,7 eV); C=O (287,2 ± 0,7 eV); -COOH (288,9 ± 0,6 eV); -COO (290,3 ± 1,3 eV); O=C (531,8 ± 0,2 eV) e O-C (533,6 ± 0,3 eV) (MOULDER et al.,1992).

Observou-se também picos de energia para a prata (Figura 11a e 11b), sendo encontrada no estado Ag 3d, com valor de 370 eV, o que confirma a presença deste elemento químico no estado reduzido (Ag⁰) (MOULDER et al.,1992). Além disso, é possível que este elemento esteja na forma AgO que, por sua vez, tende a se decompor em Ag₂O e Ag, como resultado das seguintes reações: (i) 2 AgO → 2 Ag + O₂ e (ii) AgO + Ag → Ag₂O. A primeira reação conduz à formação de Ag não solúvel no aço (FENG et al., 2011).

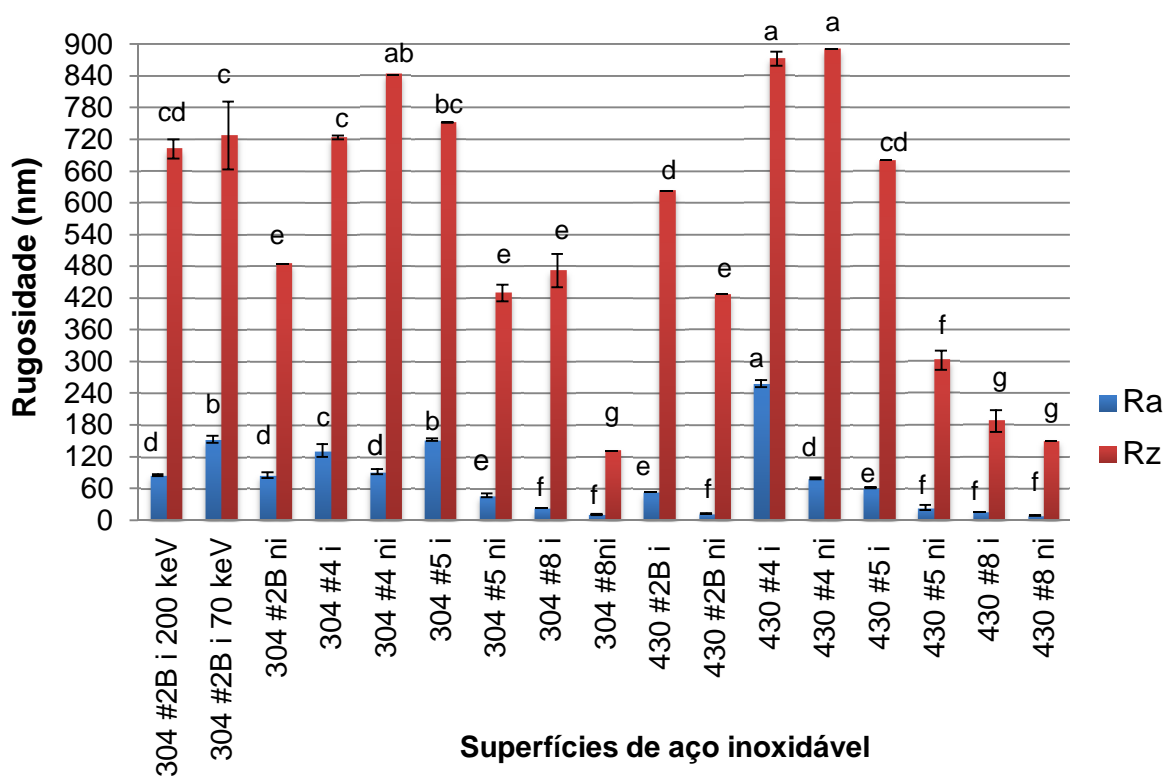
Figura 11 - Espectro de XPS de amostras de aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 8 (a) e ferrítico AISI 430 (b), acabamento n° 8, com e sem implantação de íons Ag⁺¹, após o *sput* (calibração).



4.1.2 Microscopia de força atômica (MFA)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 12, observou-se que as superfícies de aço inoxidável apresentaram diferentes valores ($p < 0,05$) de R_a e R_z , sendo o AISI 430, acabamento n° 4, com implantação de íons Ag^{+1} com os maiores valores de rugosidade e o AISI 430, acabamento n° 8, com e sem implantação, com menores valores.

Figura 12 – Parâmetros de rugosidade (R_a e R_z) para as diferentes superfícies de aço inoxidável (304 e 430), com diferentes acabamentos (n° 2B, 4, 5 e 8) e com (i) e sem (ni) implantação com íons de Ag^{+1} .



*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$). R_a , média aritmética do somatório de todos os valores da altura de pontos utilizados em dado perfil; R_z , diferença de altura entre a média de cinco picos mais altos e a média de cinco vales mais baixos, ao longo de um dado perfil.

Algumas superfícies após implantação iônica apresentaram rugosidade diferente ($p < 0,05$) (Figura 12). Esta diferença pode ser atribuída à assimetria superficial das chapas metálicas antes dos cortes para confecção dos cupons. Isso pode ser verificado pelo fato de a superfície de AISI 304, acabamento n° 2B,

implantada com íons a 200 keV apresentar menor valor de R_a comparada à superfície implantada com 70 keV.

Segundo Dürr (2007) o parâmetro R_z (a diferença de altura entre a média de cinco picos mais altos e a média de cinco vales mais baixos, ao longo de um dado perfil) é um indicador mais efetivo da rugosidade do que R_a . Este pesquisador concluiu que R_a não representa a profundidade da superfície como um todo, mas a média da rugosidade de uma dada linha do perfil. Assim, sugeriu-se que é apropriado incluir os parâmetros R_z e R_t (máximo R_z em cinco medidas sucessivas) para análise da rugosidade da superfície.

Flint et al. (1997) recomendam que o valor de R_a seja inferior a 800 nm. Portanto, mesmo que as superfícies de AISI 304 e AISI 430 tenham apresentado valores de R_a inferiores a 800 nm, o que indicaria superfícies menos rugosas, os valores de R_z são altos, o que se trata de uma superfície irregular com a presença de nanofissuras, ou cavidades. Estas irregularidades, por sua vez, podem alojar um ou mais micro-organismos, protegendo-os e impedindo-os da remoção durante processos de higienização, o que pode resultar na adesão microbiana e consequente formação de biofilmes.

Equipamentos usados para processar alimentos podem ser fontes potenciais de micro-organismos patogênicos (MIDELET; CARPENTIER, 2004). Haeghebaert et al. (2002) demonstraram que a contaminação de equipamentos foi associada como causa de 59% de surtos de doenças de origem alimentar investigadas na França, durante o ano de 2001. Consequentemente, é importante melhorar o conhecimento dos fatores envolvidos na transferência de micro-organismos de equipamentos para os alimentos, especialmente durante o contato.

Careli (2005) avaliou a microtopografia de nove tipos de materiais comerciais representados por cupons (10 x 10) mm de poliuretano liso em dupla face, silicone, granito, mármore, poli (cloreto de vinila) com revestimentos finos ou grossos e aço inoxidável AISI 304, acabamento nº 4, foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Diversas imperfeições que podem diminuir a eficiência da higienização foram observadas de acordo com o material analisado: i) protuberâncias e fissuras que apresentavam diâmetros de 5,1 μm (5100 nm) e 8,8 μm (8800 nm) ; ii) elevações com 27,1 μm (27100 nm), microfuros de 6,5 μm (6500 nm); iii) ondulações

com tamanhos entre 5,6 μm (5600 nm) e 12,6 μm (12600 nm) e de depressões com diâmetros de 7,9 μm (79000 nm) e 27,4 μm (27400 nm).

Por meio das Figuras 13 e 14 é possível verificar que as superfícies utilizadas neste experimento apresentaram irregularidades que corroboram com o que foi exposto por Careli (2005).

Figura 13 – Topografia das superfícies de aço inoxidável AISI 304 com diferentes acabamentos (n° 2B, 4, 5 e 8) e com (i) e sem implantação (ni) de íons Ag^{+1} : (a) AISI 304, n° 2B, i, a 200 keV; (b) AISI 304, n° 2B, i, 70 keV; (c) AISI 304, n° 2B, ni; (d) AISI 304, n° 4, i, a 200 keV; (e) AISI 304, n° 4, ni; (f) AISI 304, n° 5, i, a 200 keV; (g) AISI 304, n° 5, ni; (h) AISI 304, n° 8, i, a 200 keV; (i) AISI 304, n° 8, ni.

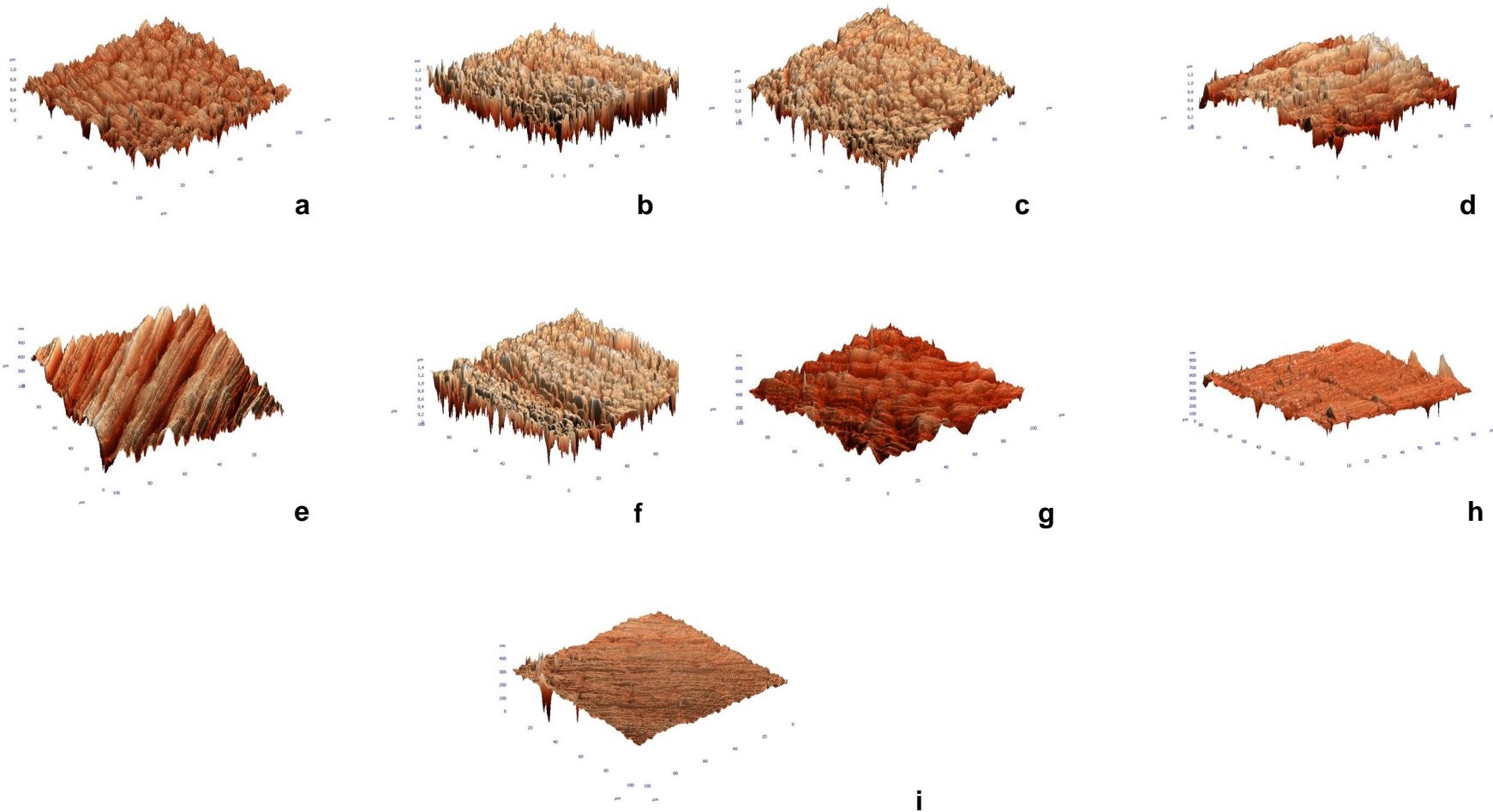
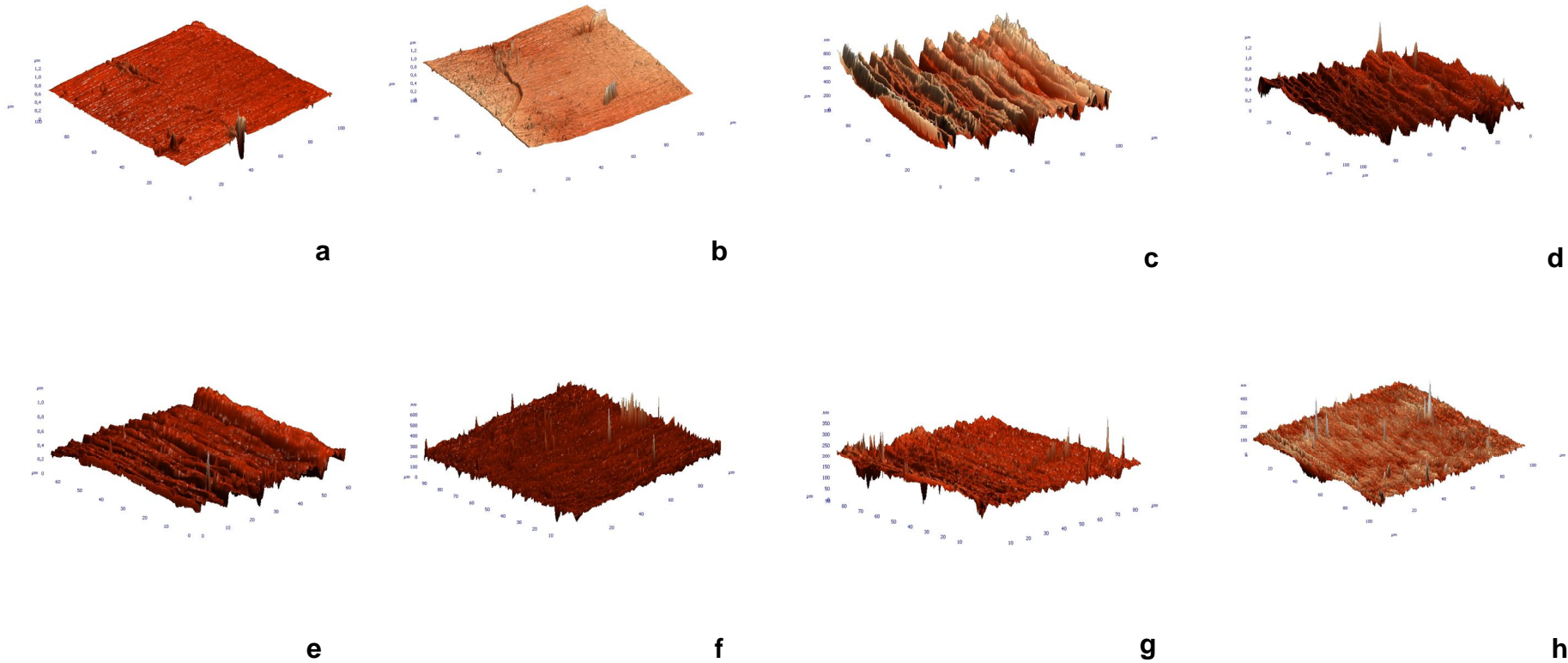


Figura 14 – Topografia das superfícies de aço inoxidável AISI 430 com diferentes acabamentos (n° 2B, 4, 5 e 8) e com (i) e sem implantação (ni) de íons Ag^{+1} , a 200 keV: (a) AISI 430, n° 2B, i; (b) AISI 430, n° 2B, ni; (c) AISI 430, n° 4, i; (d) AISI 430, n° 4, ni; (e) AISI 430, n° 5, i; (f) AISI 430, n° 5, ni; (g) AISI 430, n° 8, i; (h) AISI 430, n° 8, ni.



Além disso, nas Figuras 13 e 14 é possível verificar a diferença na topografia existente entre as amostras de aço inoxidável e, conseqüentemente, dos parâmetros R_a e R_z (Figura 12), após realização de diferentes acabamentos que podem auxiliar ou reduzir a adesão microbiana.

As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado (HAYES, 1993). Materiais utilizados nas indústrias de alimentos apresentam diferentes topografias de superfície, podem exibir fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar micro-organismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização, o que favorece a multiplicação microbiana e o desenvolvimento de micro-organismos (BOWER et al., 1996).

4.1.3 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade das superfícies é uma das propriedades superficiais que apresenta um papel fundamental no processo de adesão (AZEREDO; OLIVEIRA, 2000). Existem várias formas e métodos para avaliar, sendo a medida de ângulos de contato uma das técnicas universalmente utilizadas para determinar a hidrofobicidade de materiais, de uma forma qualitativa (FOWKES et al., 1980).

Observou-se por análise qualitativa que as superfícies dos aços inoxidáveis utilizadas apresentam-se como hidrofóbicas e seu ângulo de contato com a água (θ_w) foi superior a 65° (VOGLER, 1998). As superfícies AISI 430, acabamento n° 2B, com prata implantada, foi a menos hidrofóbica ($p < 0,05$) com um θ_w de $64,91^\circ \pm 3,65^\circ$. Verificou-se também que houve redução ($p < 0,05$) dos valores de θ_w após a implantação de Ag^{+1} , com exceção para as superfícies AISI 304, acabamento n° 5 (Tabela 5).

A hidrofobicidade das superfícies pode ser avaliada também por medidas quantitativas, sendo expressas em variação da energia livre de interação (ΔG_{SWS}^{TOT}). A análise quantitativa para os diferentes tipos de aço inoxidável apresentou um resultado semelhante com aqueles observados na análise qualitativa. Os valores indicaram que as superfícies eram hidrofóbicas ($\Delta G_{SWS}^{TOT} < 0$). O aço AISI 430, acabamento n° 8, sem íons Ag^{+1} implantados (ni), foi a superfície mais hidrofóbica (-

64,67 mJ.m^{-2}) e a menos hidrofóbica o aço AISI 430, acabamento nº 2B, ni (- 7,64 mJ.m^{-2}) (Tabela 5).

Tabela 5 - Ângulo de contato, componentes da tensão superficial e variação da energia livre de interação entre materiais iguais imersos em água (ΔG_{SWS}^{TOT}).

Superfícies	Ângulo de contato \pm desvio padrão ($^\circ$)			Componentes da tensão superficial (mJ.m^{-2})					ΔG_{SWS}^{TOT} (mJ.m^{-2})
	Θ_w^*	$\Theta_{\alpha-B}$	Θ_F	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	γ_s^{AB}	γ_s^{TOT}	
AISI 304 n° 2B i 200 keV	83,32 \pm 3,01 ef	33,10 \pm 3,29	44,70 \pm 4,24	37,49	2,64	0,567	2,47	39,96	-62,99
AISI 304 n° 2B i 70 keV	86,27 \pm 2,98 e	46,90 \pm 1,47	75,50 \pm 2,84	31,45	0,28	9,11	3,19	34,64	-38,50
AISI 304 n° 2B ni	90,68 \pm 2,26 d	44,60 \pm 2,41	87,50 \pm 3,36	32,53	2,90	12,61	12,10	44,63	-22,20
AISI 304 n° 4 i 200 keV	82,32 \pm 3,84 fg	42,00 \pm 1,98	69,80 \pm 1,94	33,73	0,09	9,68	1,93	35,66	-39,34
AISI 304 n° 4 ni	93,09 \pm 2,52 d	53,50 \pm 2,60	81,60 \pm 3,38	28,23	0,35	6,23	2,94	31,18	-46,37
AISI 304 n° 5 i 200 keV	101,28 \pm 1,55 a	44,90 \pm 2,00	48,40 \pm 2,50	32,39	6,19	3,81	9,72	42,11	-33,82
AISI 304 n° 5 ni	100,69 \pm 1,82 ab	52,90 \pm 3,02	84,90 \pm 2,91	28,53	0,44	2,55	2,13	30,66	-61,43
AISI 304 n° 8 i 200 keV	79,78 \pm 1,96 g	32,10 \pm 1,14	58,30 \pm 1,65	37,87	0,11	6,08	1,63	39,50	-53,19
AISI 304 n° 8ni	92,00 \pm 1,48 d	61,50 \pm 2,75	91,30 \pm 2,46	24,17	1,57	13,43	9,19	33,36	-21,15
AISI 430 n° 2B i 200 keV	64,91 \pm 3,65 i	40,50 \pm 2,94	44,70 \pm 2,56	34,40	1,41	13,36	8,68	43,07	-24,42
AISI 430 n° 2B ni	81,17 \pm 1,60 fg	46,14 \pm 1,01	83,00 \pm 3,23	31,81	2,37	21,53	14,29	46,11	-7,64
AISI 430 n° 4 i 200 keV	82,69 \pm 2,15 fg	42,30 \pm 2,53	64,90 \pm 1,98	33,59	0,04	6,61	1,00	34,59	-50,67
AISI 430 n° 4 ni	97,34 \pm 0,95 c	54,40 \pm 2,13	84,50 \pm 2,02	27,78	0,47	4,40	2,78	30,65	-52,28
AISI 430 n° 5 i 200 keV	80,16 \pm 1,91 fg	40,30 \pm 2,17	56,50 \pm 3,09	34,48	0,63	4,92	3,51	38,00	-51,13
AISI 430 n° 5 ni	96,57 \pm 2,92 c	52,20 \pm 3,31	91,60 \pm 3,21	28,88	2,46	8,90	9,37	38,24	-29,76
AISI 430 n° 8 i 200 keV	74,31 \pm 2,65 h	33,70 \pm 1,86	58,60 \pm 1,95	37,25	0,02	11,36	0,97	38,22	-37,08
AISI 430 n° 8 ni	97,96 \pm 1,18 bc	51,90 \pm 2,95	80,90 \pm 2,32	29,02	0,16	2,65	1,30	30,33	-64,67
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 4031T	29,4 \pm 1,85	44,5 \pm 2,40	32,4 \pm 2,52	32,58	1,29	50,01	16,09	48,68	29,48

Θ_w , ângulo de contato com a água; $\Theta_{\alpha-B}$, ângulo de contato com α -bromonaftaleno; Θ_F , ângulo de contato com formamida; γ_s^{LW} Tensão superficial relativa a componente de Lifshitz – van der Waals; γ_s^+ a tensão superficial relacionada ao componente acceptor de elétrons do componente ácido-base; γ_s^- a tensão superficial relacionada ao componente doador de elétrons do componente ácido-base; γ_s^{AB} , a tensão superficial relacionada as forças de interação ácido-base de Lewis e; γ_s^{TOT} , a tensão superficial total. Aço inoxidável ferrítico AISI 430 ou austenítico AISI 304, acabamentos de números n° 2B, 4, 5 e 8, com (i) e sem (ni) implantação de Ag^{+1} a energia de 70 keV ou 200 keV. *Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Constatou-se que os valores da variável γ_s^- (Tabela 5), um dos componentes da tensão superficial para calcular a variação de energia livre de interação total, foram superiores aos valores da variável γ_s^+ para quase todos os tipos aços inoxidáveis, com exceção da amostra AISI 304, acabamento nº 2B, com Ag^{+1} implantada (i) a 200 keV e AISI 304, acabamento nº 5, i a 200 keV. Deste modo, pode-se afirmar que 15 das 17 amostras utilizadas são doadoras de elétrons e apresentam caráter negativo.

Os resultados para amostras de AISI 304, acabamento nº 4, sem íons Ag^{+1} (Tabela 5) são semelhantes aqueles apresentados por Silva et al. (2008) e Teixeira et al. (2007) cujas superfícies foram caracterizadas como hidrofóbicas ($\Delta G_{sWS}^{TOT} < 0$).

Em estudos realizados (TSUJI et al., 1998; YANG et al., 2001; LI et al., 2007; SHAO; ZHAO, 2010; DONG et al., 2011) foram demonstrados que, além da atividade antimicrobiana ou melhoria das propriedades intrínsecas dos materiais, houve redução do ângulo de contato com a água e, em consequência, aumento da hidrofiliabilidade após modificação das superfícies com prata.

As células de *L. monocytogenes* ATCC 4031T apresentam-se como hidrofílicas (Tabela 5), característica confirmada não apenas pela medida qualitativa, obtida pelo ângulo de contato ($29,4^\circ \pm 1,85^\circ$), mas também pela medida quantitativa, resultante do cálculo de ΔG_{sWS}^{TOT} ($29,48 \text{ mJ.m}^{-2}$). De acordo com os valores das componentes das tensões superficiais foi possível verificar que esta bactéria apresenta carga negativa, pois $\gamma_s^- = 50,01 \text{ mJ.m}^{-2} > \gamma_s^+ = 1,29 \text{ mJ.m}^{-2}$, e é uma doadora de elétrons. Estes resultados corroboram com os encontrados por Silva et al. (2008) ao pesquisar a adesão de diferentes estirpes de *L. monocytogenes* em superfícies utilizadas para processamento de alimentos.

Os resultados observados estão de acordo com o relato de Marshall (1980) ao se referir que a maior parte dos micro-organismos apresenta uma membrana celular com carga superficial negativa em solução aquosa.

A partir dos valores das componentes da tensão superficial (Tabela 5) foi possível calcular a variação da energia livre total (Tabela 6) pela teoria termodinâmica, $\Delta G_{adesão}$, entre duas superfícies imersas em meio aquoso (meio de cultura), neste caso *L. monocytogenes* ATCC 4031T e cupons de aço inoxidável. A obtenção desta variação de energia permitiu realizar uma previsão teórica da adesão da estirpe bacteriana nos cupons que foi calculada de acordo com as Equações 12 a 16:

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{b|s}^{LW} + \Delta G_{b|s}^{AB} = \gamma_{bs} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad (12)$$

$$\Delta G_{b|s}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} \quad (13)$$

$$\Delta G_{b|s}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} \quad (14)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_s^{LW} + \gamma_b^{LW} - 2 \cdot (\sqrt{\gamma_s^{LW} \cdot \gamma_b^{LW}}) \quad (15)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_s^+ \cdot \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_b^+ \cdot \gamma_b^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \cdot \gamma_b^-} - \sqrt{\gamma_s^- \cdot \gamma_b^+}) \quad (16)$$

sendo a variação da energia livre total de interação ($\Delta G_{adesão}$) entre as células de *L. monocytogenes* ATCC 4031T (b) e os cupons de adesão de aço inoxidável (s) em meio aquoso (l) e as suas componentes apolares ($\Delta G_{b|s}^{LW}$) e polares ($\Delta G_{b|s}^{AB}$); γ^{LW} a tensão superficial relacionada às forças de interação de Lifshitz - van der Waals entre bactéria/cupom (γ_{bs}^{LW}), cupom/líquido (γ_{sl}^{LW}), bactéria/líquido (γ_{bl}^{LW}), ou apenas da superfície (γ_s^{LW}) e bactéria (γ_b^{LW}); γ^{AB} a tensão superficial relacionada as forças de interação ácido-base de Lewis da interação bactéria/cupom (γ_{bs}^{AB}), cupom/líquido (γ_{sl}^{AB}), bactéria/líquido (γ_{bl}^{AB}); γ^+ a tensão superficial relacionada ao componente acceptor de elétrons do componente ácido-base da bactéria (γ_b^+) ou cupons (γ_s^+); γ^- a tensão superficial relacionada ao componente doador de elétrons do componente ácido-base da bactéria (γ_b^-) ou cupons (γ_s^-).

Tabela 6 - Valores da variação da energia livre total de interação ($\Delta G_{adesão}$) entre as células de *Listeria monocytogenes* ATCC 4031T e as superfícies de adesão de aços inoxidáveis AISI 304 e 430 em meio aquoso, com diferentes acabamentos (nº 2B, 4, 5 e 8), antes (ni) e após (I) a implantação de íon Ag^{+1} a 200 keV.

Superfícies AISI 304	Variação da energia livre total de interação (mJ.m ⁻²)		
	ΔG_{bls}^{LW}	ΔG_{bls}^{AB}	$\Delta G_{adesão}$
2B i 200 keV	-3,02	-19,78	-22,80
2B i 70 keV*	-1,95	2,38	0,44
2B ni	-2,15	1,80	-0,35
4 i	-2,37	3,99	1,63
4 ni	-1,34	-1,96	-3,30
5 i	-2,11	-13,89	-16,00
5 ni	-1,40	-9,29	-10,69
8 i	-3,08	-1,14	-4,23
8 ni	-0,51	4,51	4,00
Superfícies AISI 430			
2B i	-2,49	4,70	2,22
2B ni	-2,02	10,99	8,97
4 i	-2,34	0,23	-2,11
4 ni	-1,25	-5,46	-6,71
5 i	-2,50	-4,95	-7,45
5 ni	-1,46	-2,10	-3,56
8 i	-2,98	-7,18	-10,96
8 ni	-2,16	31,66	29,50

* A superfície AISI 2B foi a única implantada a 70 keV.

Segundo a teoria termodinâmica se a interação conduzir a uma diminuição da energia livre total, traduzida pela equação de Dupré (Equação 12), ou seja, se a variação de energia livre de interação é negativa ($\Delta G_{adesão} < 0$), a adesão é favorável. Portanto, com base nos dados apresentados na Tabela 5 foi possível verificar que teoricamente a adesão de *L. monocytogenes* ATCC 4031T em 11 cupons, seis deles implantados com prata, é termodinamicamente favorável. As outras sete superfícies, três delas com íons implantados, apresentaram $\Delta G_{adesão} > 0$ e, portanto, um processo de adesão termodinamicamente desfavorável.

Constatou-se que as interações hidrofóbicas são determinadas, predominantemente, pelas forças atrativas, considerando-se que a componente apolar da energia livre de interação entre as moléculas da superfície celular imersa

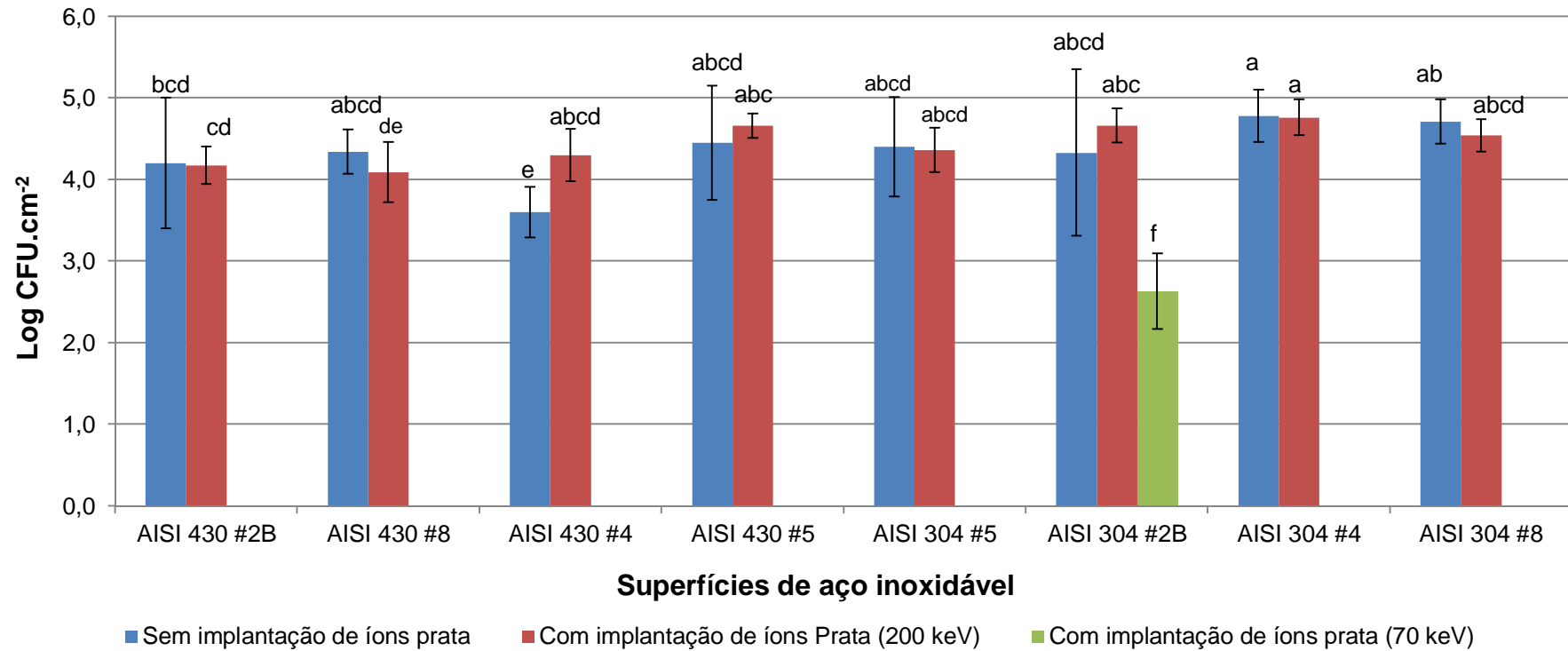
em água é sempre atrativa ($\Delta G_{b/ls}^{LW} < 0$) e que a componente polar pode ser atrativa ($\Delta G_{b/ls}^{AB} < 0$) ou repulsiva ($\Delta G_{b/ls}^{AB} > 0$).

Busscher et al. (1990) relataram que para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies em meio aquoso, o filme de água que as separa deve ser removido. A hidrofobicidade célula/substrato contribui para essa remoção. Contudo, a adesão bacteriana trata-se de um processo complexo (SILVA et al., 2008) e, portanto, nem sempre ocorre quando os valores da energia livre total indicam valores negativos ($\Delta G_{adesão} < 0$).

4.2 Número de células aderidas de *Listeria monocytogenes* em cupons de aços inoxidáveis modificados pela técnica de implantação iônica

Houve diferença ($p < 0,05$) entre o número de células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 4031T em superfícies de aço inoxidável austenítico AISI 304 e ferrítico AISI 430, a 4 °C (Figura 15). A superfície de aço AISI 304, acabamento nº 2B, com íons Ag^{+1} a 70 keV apresentou menor número de células aderidas ($2,63 \pm 0,32 \log CFU.cm^{-2}$).

Figura 15 - Logaritmo do número de células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 4031T (CFU) em diferentes superfícies de aço inoxidável antes e após implantação com íons Ag^+ .



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Tang et al. (2007a) também observaram que superfícies de carbono pirolítico com íons Ag^{+1} implantados, utilizadas para confecção de válvulas cardíacas, apresentaram atividade antimicrobiana. Além disso, estes pesquisadores verificaram que não houve modificação da principal estrutura química do carbono o que garantiu a biocompatibilidade do material (TANG et al., 2007b).

Contudo, considerando as superfícies de aço inoxidável de mesmos pares e composição (Figura 15), AISI 304 ou AISI 430, observou-se que não houve redução no número de células aderidas ($p > 0,05$) nos cupons tratados a 200 keV, com exceção do material AISI 430, acabamento n° 4, em que houve maior número de células aderidas para o aço modificado com íons Ag^{+1} ($4,30 \pm 0,32 \log \text{CFU.cm}^{-2}$) ($p < 0,05$), comparado com seu par AISI 430, acabamento n° 4, sem Ag^{+1} ($3,60 \pm 0,31 \log \text{CFU.cm}^{-2}$). Estes resultados podem ser explicados pela diferença de profundidade dos íons Ag^{+1} . Nos cupons cujo tratamento foi de 200 keV, a prata apresentou-se a uma profundidade de 25 nm da superfície, enquanto que as amostras tratadas a 70 keV foram de 15 nm.

A superfície em que os íons de prata foram implantados com 70 keV resultou nas seguintes características: (i) a maior ação antimicrobiana da prata; (ii) a alteração das forças presentes durante adesão do micro-organismo, neste caso com prevalência das forças de repulsão e; (iii) aumento da hidrofiliidade, o que favoreceu a ligação entre superfície/água e micro-organismo/água, ao invés da ligação micro-organismo/superfície. Assim, a adesão de *L. monocytogenes* em superfície de aço AISI 304, acabamento n° 2B, com prata implantada a 70 keV, tornou-se termodinamicamente desfavorável ($\Delta G_{\text{adesão}} = 0,44 \text{ mJ. m}^{-2}$).

Vale ressaltar que as características acima sugeridas, possivelmente, atuaram em conjunto, uma vez que mesmo havendo redução da hidrofiliidade para a maioria dos cupons após implantação dos íons Ag^{+1} a 200 keV, não houve redução do número de células bacterianas aderidas ($p > 0,05$). Portanto, não há uma relação direta entre hidrofobicidade e número de células aderidas. Estes resultados são semelhantes aos observados por Silva et al. (2008) e Szlavik et al. (2012) que também não observaram relação direta entre o número de células de estirpes de *L. monocytogenes* aderidas e a hidrofobicidade das superfícies utilizadas na pesquisa.

Contudo, há pesquisas que demonstraram que as propriedades antibacterianas são influenciadas pela hidrofiliidade, rugosidade e a configuração do elemento químico da superfície. Bactérias aderem de maneira diferente nas

variadas superfícies (AN; FRIEDMAN, 1998; ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007). O aumento da hidrofiliidade pela implantação da prata pode ser a causa da alteração no processo de adesão bacteriana (LI et al., 2007). Em geral, materiais hidrofílicos apresentam maior resistência à adesão bacteriana que os hidrofóbicos. Estudos de Wang et al. (2004) e Li et al. (2007) demonstraram a relação entre estes fatores.

Segundo a Teoria Termodinâmica, a adesão, em solução aquosa, entre um micro-organismo e um substrato, deve ultrapassar a barreira de energia imposta pelas interações repulsivas, passando atuar interações de curto alcance que assumirá um papel dominante na interação total (ABSOLOM et al., 1983). Assim, as características das superfícies observadas podem ter apresentado importante influência no processo de adesão microbiana, sendo o efeito antiadesão ou inibitório dos íons Ag^{+1} relacionados à redução das interações atrativas entre a bactéria e o substrato, principalmente para as superfícies cuja prata foi implantada a 70 keV.

Não foi possível verificar uma relação direta entre rugosidade (R_a ou R_z) e adesão microbiana. Superfícies que apresentaram maior rugosidade não apresentaram maior número de células de *L. monocytogenes* aderido. Silva et al. (2008) também não verificaram relação direta entre os valores de R_a e número de bactérias aderidas em diferentes superfícies utilizadas na indústria de alimentos.

Entretanto, em alguns estudos demonstrou-se que a microtopografia da superfície de processamento é um fator que influencia na adesão bacteriana, ou seja, a redução no número de bactérias aderidas pode ser observada em superfícies com menores valores de R_a (HILBERT et al., 2003; BARNES et al., 1999; MEDILANSKI et al., 2002).

Deve-se ressaltar que a influência da microtopografia na adesão bacteriana também é um fator considerado importante em regulamentações para a indústria de alimentos. Recomendam-se que a rugosidade não apresente valores de R_a superior a 800 nm (FLINT et al., 1997).

Medilanski et al. (2002) observaram que a adesão de quatro espécies de bactérias dependeram da rugosidade, sendo que a menor contagem de células aderidas obtida foi em superfícies com R_a igual a 0,16 μm (160 nm).

A área de contato entre o micro-organismo e a superfície influencia na taxa e padrão de retenção da célula (FLINT et al., 2000; MEDILANSKI et al., 2002;

WHITEHEAD et al., 2005;). Sugere-se que há um valor ótimo de rugosidade para retenção do micro-organismo (VERRAN; BOYD, 2001) determinado por um número de fatores que incluem o tamanho e a forma da bactéria (WHITEHEAD; VERRAN, 2006). Assim, a rugosidade da superfície pode acentuar a retenção de micro-organismos quando associada ao aumento da área de contato entre as superfícies envolvidas (VERRAN; BOYD, 2001). A rugosidade, portanto, afetará a energia total de ligação entre a bactéria e o substrato. Em princípio, para aumentar a área de contato da superfície microbiana e o substrato, a bactéria muda de forma para aumentar o contato, em consequência, há aumento da energia de ligação (EDWARDS; RUTENBERG, 2001).

4.3 Estudo da formação de biofilmes de células de *L. monocytogenes* em cultura simples e mista com células de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável e seu controle biológico

4.3.1 Hidrofobicidade

Os valores observados das medidas do ângulo de contato permitiram concluir que todas as estirpes presentes nesta etapa do experimento eram hidrofílicas ($\Theta_w < 65^\circ$), com variação de $22,6^\circ \pm 1,40^\circ$ (*L. monocytogenes* 747) a $46,89^\circ \pm 2,49^\circ$ (*P. fluorescens* ATCC 27663) (Tabela 7). Estes resultados foram confirmados pela análise quantitativa da hidrofobicidade, as células de *L. monocytogenes* 747 foram mais hidrofílicas ($\Delta G_{sWS} = 29,36 \text{ mJ.m}^{-2}$). Observam-se também que todas as estirpes são elétrons doadoras, uma vez que apresentaram valores altos de γ_s^- e baixos valores de γ_s^+ . Os valores encontrados neste trabalho corroboram com pesquisas realizadas com estirpes de *L. monocytogenes* (MAFU et al., 1991; ABSOLOM, 1988; SILVA et al., 2008) e *P. fluorescens* (CHAVES, 2004; YEO; CHUA, 2004; MACHADO, 2005; SIMÕES et al., 2008a; CARELI, 2009).

Tabela 7 - Ângulo de contato, componentes da tensão superficial e variação da energia livre de interação entre materiais iguais imersos em água (ΔG_{sWS}^{TOT}).

Superfícies	Ângulo de contato \pm desvio padrão ($^\circ$)			Componentes da tensão superficial (mJ.m^{-2})					ΔG_{sWS}^{TOT} (mJ.m^{-2})
	Θ_w	$\Theta_{\alpha-B}$	Θ_F	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	γ_s^{AB}	γ_s^{TOT}	
AISI 304 n ^o 4	$87,9 \pm 1,20$	$30,2 \pm 2,80$	$56,4 \pm 2,21$	38,58	0,58	0,93	1,47	40,05	- 74,78
<i>L. monocytogenes</i> 747	$22,6 \pm 1,40$	$31,2 \pm 1,80$	$23,0 \pm 2,09$	38,21	1,00	51,05	14,31	52,52	29,36
<i>L. monocytogenes</i> 994	$35,8 \pm 1,20$	$42,6 \pm 1,78$	$25,6 \pm 1,45$	33,45	2,39	37,94	19,05	52,50	13,06
<i>P. fluorescens</i> ATCC 27663	$46,89 \pm 2,49$	$47,7 \pm 2,16$	$42,7 \pm 2,05$	31,07	1,08	35,31	12,34	43,40	12,68

Θ_w , ângulo de contato com a água; $\Theta_{\alpha-B}$, ângulo de contato com α -bromonaftaleno; Θ_F , ângulo de contato com formamida; γ_s^{LW} Tensão superficial relativa a componente de Lifshitz – van der Waals; γ_s^+ a tensão superficial relacionada ao componente aceptor de elétrons do componente ácido-base; γ_s^- a tensão superficial relacionada ao componente doador de elétrons do componente ácido-base; γ_s^{AB} , a tensão superficial relacionada as forças de interação ácido-base de Lewis e; γ_s^{TOT} , a tensão superficial total; a- amostra diferente daquelas empregadas na primeira etapa (Item 4.1).

O processo de adesão de *L. monocytogenes* 747, ou *L. monocytogenes* 994, ou *P. fluorescens* ATCC 27663 em superfícies de aço inoxidável (Tabela 8) foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} < 0$) e governado, principalmente, por interações hidrofóbicas atrativas ($\Delta G_{bls}^{AB} < 0$). A energia livre total de interação calculada para o processo de adesão de *P. fluorescens*/substrato foi a de maior valor em módulo ($\Delta G_{adesão} = - 27,91 \text{ mJ.m}^{-2}$) e, conseqüentemente, com maior possibilidade de ocorrência do processo.

Tabela 8 - Valores da variação da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre as células de *L. monocytogenes* 747 ou *L. monocytogenes* 994 ou *P. fluorescens* ATCC 27663 (b) e a superfície de adesão de aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4 (s) em meio aquoso (l; considerou-se água; Tabela 1) e as suas componentes apolares (ΔG_{bls}^{LW}) e polares (ΔG_{bls}^{AB}).

Micro-organismos	Variação da energia livre total de interação (mJ.m^{-2})		
	ΔG_{bls}^{LW}	ΔG_{bls}^{AB}	$\Delta G_{adesão}$
<i>L. monocytogenes</i> 747	-4,66	-15,22	-19,79
<i>L. monocytogenes</i> 994	-3,44	-19,11	-22,55
<i>P. fluorescens</i> ATCC 27663	-2,79	-25,11	-27,91

A superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento n° 4 apresentou característica hidrofóbica ($\Theta_w = 87,9^\circ \pm 1,20^\circ$; $\Delta G_{sws} = - 74,78 \text{ mJ.m}^{-2}$) (Tabela 7). Os valores observados para qualificar e quantificar a hidrofobicidade desta amostra de aço foi semelhante a aqueles encontrados no Item 4.1.3 ($\Theta_w = 93,09^\circ \pm 2,52^\circ$; $\Delta G_{sws} = - 46,37 \text{ mJ.m}^{-2}$) (Tabela 5) e com o de outros estudos, $\Theta_w = 68^\circ$ (WANG et al., 2012), $\Theta_w = 90,4^\circ$ (SILVA et al., 2008), $\Theta_w = 81,3^\circ$ (TEIXEIRA et al., 2007). Embora os autores relatem algumas variações nestes valores apresentados, em todos os resultados encontrados o aço AISI 304, acabamento n° 4, era uma superfície hidrofóbica.

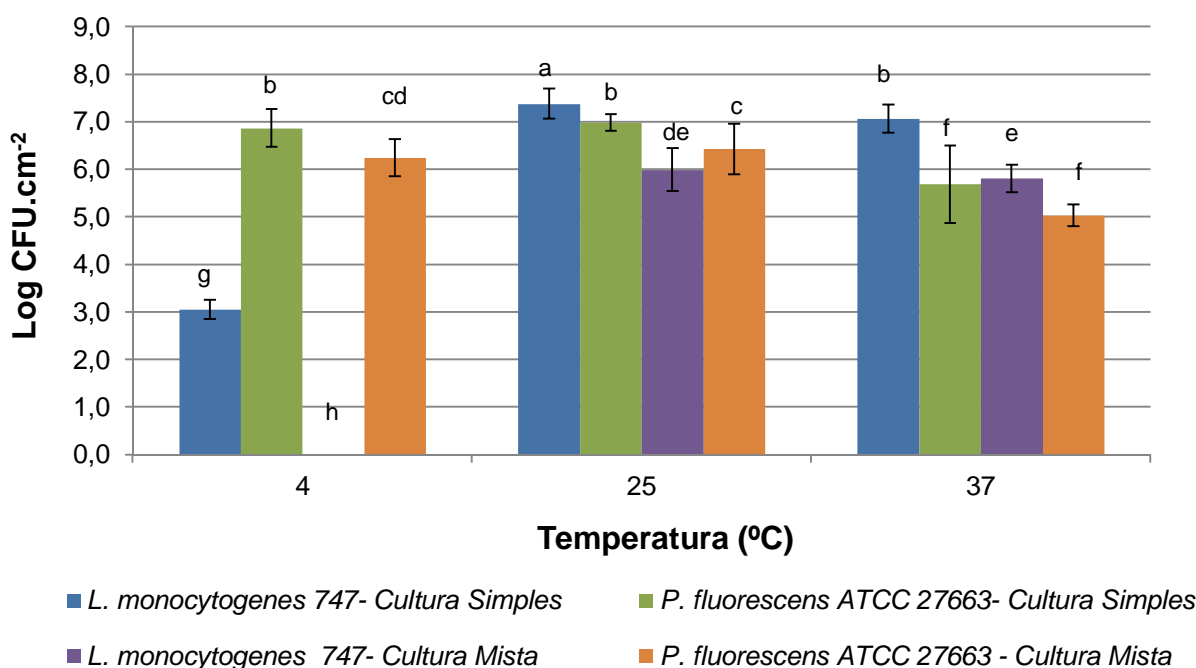
4.3.2 Determinação do número de células em biofilme

Observou-se que células de *L. monocytogenes* 747 (Figura 16) em cultura simples foram capazes de aderir (4 °C) e formar biofilme, a 25 °C e 37 °C, em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4. Embora a temperatura ótima de

multiplicação celular ser entre a faixa de 30 °C a 37 °C (PETRAN; ZOTTOLA, 1989), a maior contagem de células viáveis desta estirpe foi observada a 25 °C (7,60 log CFU.cm⁻²) (p < 0,05). Entretanto, verificou-se que considerável número de células foi capaz de aderir e multiplicar em aço a 4 °C (3,31 log CFU.cm⁻²).

Verificou-se nas Figuras 16 e 17 diferença (p < 0,05) no número de células viáveis em biofilme de *P. fluorescens* ATCC 27663, quando em cultura simples, nas diferentes temperaturas testadas, com variação nas contagens variaram de 7,26 log CFU.cm⁻² (25 °C) a 5,26 log CFU.cm⁻² (37 °C). Embora a temperatura ótima de multiplicação para este micro-organismo seja próxima de 25 °C, o número de células viáveis não diferiu (p > 0,05) a 25 °C e a 4 °C (7,00 log CFU.cm⁻²).

Figura 16 - Logarítmo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* 747 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 em biofilmes (CFU) em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4, em diferentes temperaturas.

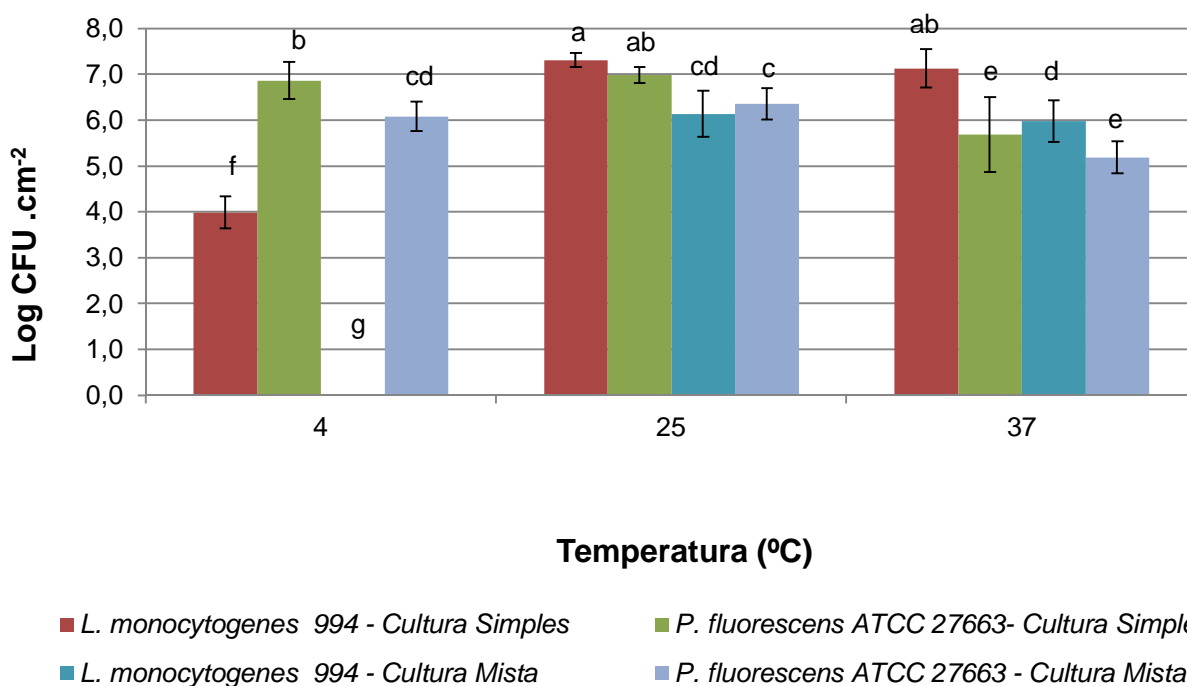


Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (p > 0,05).

Apesar de *L. monocytogenes* 994 ser diferente de *L. monocytogenes* 774, os números de células viáveis dessas estirpes em biofilme foram semelhantes para as diferentes temperaturas. As médias das contagens foram de 4,15 log CFU.cm⁻², a 4 °C, 7,45 log CFU.cm⁻², a 25 °C, e 7,23 log CFU.cm⁻², a 37 °C, portanto, houve

diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de maior média em relação à menor média (Figura 17).

Figura 17 - Logarítmo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* 994 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 em biofilmes (CFU) em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento n° 4, em diferentes temperaturas.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados acima discutidos diferem daqueles relatados por Herald e Zottola (1988) ao referirem que *L. monocytogenes* cultivada em laboratório em cultura simples, em meios de cultivo como TSB e BHI, não apresentaram alto potencial de formação de biofilmes e, em geral, não formam microcolônias em superfícies utilizadas para o processamento de alimentos, como aço inoxidável.

Entretanto, no presente trabalho, como em outros estudos (MAFU et al., 1990, 1991; HELKE; WONG, 1994; SMOOT; PIERSON, 1998; NORWOOD; GILMOUR, 1999; BERESFORD et al., 2001; SILVA et al., 2008; RODRIGUES, 2010), *L. monocytogenes* aderiu e formou biofilme em diferentes materiais e condições de multiplicação (atividade de água [a_w], temperatura e pH), até mesmo em temperatura de refrigeração, em condições laboratoriais quando em cultura simples.

Esta capacidade de sobrevivência e multiplicação a baixas temperaturas pode ser relacionada com mudanças na fluidez da membrana celular. De acordo com

Gandhi e Chikindas (2007), estas mudanças ocorrem no aumento do grau de insaturação, na redução do número de carbonos (de C_{17:0} para C_{15:0}) e isomeria da cadeia principal. Possivelmente, estas modificações na membrana também causem diferenças na sua hidrofobicidade.

Segundo Mai e Conner (2007), a hidrofobicidade celular está relacionada com a temperatura, sendo que o estresse causado pela sua modificação possivelmente alterou a hidrofobicidade em células de *L. monocytogenes*. Esta explicação pode ser uma possível justificativa para a diferença ($p < 0,05$) na contagem de células aderidas ou em biofilme, afinal as bactérias podem ter apresentado modificação na hidrofobicidade nas diferentes temperaturas (Tabela 7).

L. monocytogenes pode aderir rapidamente e firmemente a superfícies inertes utilizadas na indústria de alimentos e sabe-se que esta bactéria apresenta mecanismos de proteção contra estresse físico e químico quando aderida ou quando em biofilme. Além disso, observa-se que diferentes estirpes apresentam diferentes capacidades de adesão e formação de biofilme (HARVEY et al., 2007).

Rodrigues (2010), ao estudar a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* 747 e 994 em diferentes tempo (12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) e temperatura de multiplicação (4 °C, 25 °C, 37 °C), também observou diferença de contagem celular ($p < 0,05$). Os seus resultados apontaram aumento de biomassa (medida por densidade ótica) em maiores temperaturas. Mai e Conner (2007), após cultivarem células de *L. monocytogenes* ATCC 19.111 em BHI ou em um meio mínimo (10% de um filtrado de água de lagoa; 90% água destilada esterilizada), relataram que a adesão bacteriana foi favorecida não somente pelo aumento de temperatura como pelo meio de cultivo enriquecido (BHI). Ambos os estudos corroboram com os resultados da presente pesquisa.

Ao contrário do que foi observado para as estirpes de *L. monocytogenes*, a adesão de células viáveis de *P. fluorescens*, em cultura simples não foi favorecida pelo aumento de temperatura (Figuras 16 e 17).

A adesão das estirpes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em aço inoxidável em diferentes condições de temperaturas confirmou a previsão teórica calculada por meio da variação de energia de interação total de um processo termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} < 0$).

O número de células aderidas, após 72 h de incubação, de *L. monocytogenes* e de *P. fluorescens* foi menor quando cultivadas em cultura mista, comparado aos resultados quando em cultura pura ($p < 0,05$) (Figuras 16 e 17).

A 4 °C não foi observada a formação de colônias em placa por nenhuma das estirpes de *L. monocytogenes*, entretanto houve uma contagem de 6,30 log CFU.cm⁻² para *P. fluorescens* ($p < 0,05$) (Figuras 16 e 17). Já a 37 °C, maiores valores de contagens foram constatados para as estirpes de *L. monocytogenes* que atingiu 6,06 log CFU.cm⁻². Por fim, a 25 °C, *P. fluorescens* apresentou-se em maior número que *L. monocytogenes* 747 ($p < 0,05$), mas igualmente aderida ($p > 0,05$) quando em cultura mista com *L. monocytogenes* 994. Estes resultados podem contradizer ou confirmar relatos da literatura, uma vez que trabalhos afirmam que a presença de células de *P. fluorescens* favorecem a adesão de *L. monocytogenes* (MARSHALL; SCHMIDT, 1988; FARRAG; MARTH, 1989b; MARSHALL et al., 1992; GUÐBJÖRNSDÓTTIR et al., 2005); ou inibem (FARRAG; MARTH, 1989a; FREEDMAN et al., 1989; CHENG et al. 1995; BUCHANAN; BAGI, 1999; GUÐBJÖRNSDÓTTIR et al., 2005); ou, ainda, não apresentam nenhum efeito (FARRAG; MARTH, 1989c; MARSHALL et al., 1992; GUÐBJÖRNSDÓTTIR et al., 2005), ressaltando-se que as condições de multiplicação bacteriana favorecem as três possibilidades (GUÐBJÖRNSDÓTTIR et al., 2005).

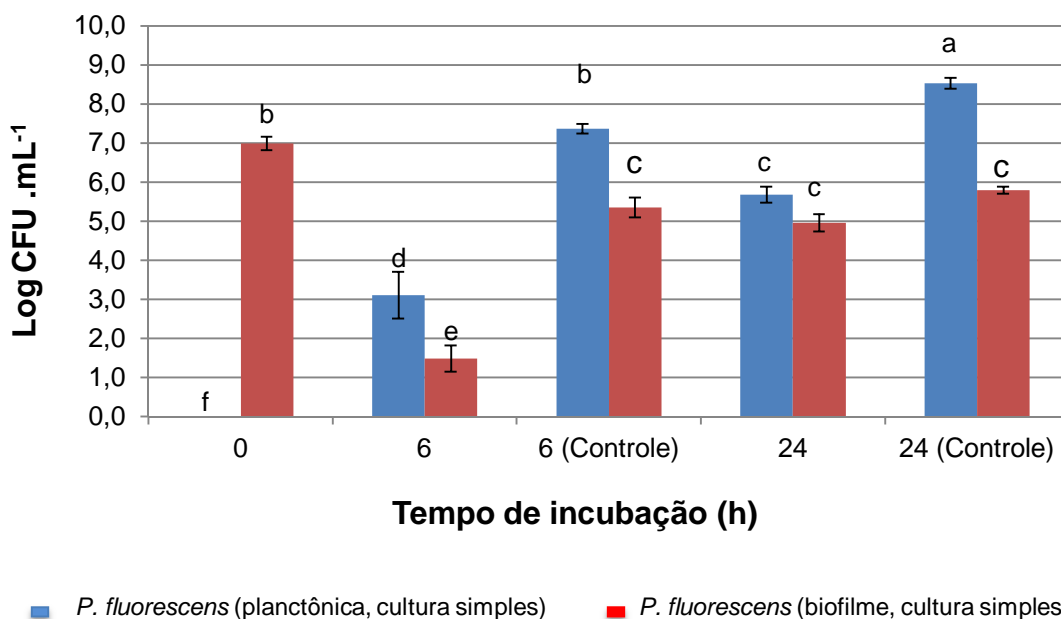
Segundo Guðbjörnsdóttir et al. (2005), a inibição da adesão de *L. monocytogenes*, em geral, está associada a baixas temperaturas (4 °C) e concentrações de cloreto de sódio (NaCl; 5 g.L⁻¹ a 25 g.L⁻¹) durante incubação. Além disso, estes pesquisadores relataram que a síntese de sideróforos por *P. fluorescens*, ou algum outro mecanismo, aumentou a aquisição de ferro por este micro-organismo e, portanto, originou uma competição por micronutrientes com *L. monocytogenes*. Esta pode ser uma possível explicação para a inibição de *L. monocytogenes*, a 4 °C, quando aderida em cupons de aço inoxidável em cultura mista com *P. fluorescens* (Figura 16 e 17).

4.3.3 Controle fágico das células microbianas em biofilmes

Observou-se que o número de células viáveis de *P. fluorescens* ATCC 27663 planctônicas ou em biofilme simples em aço inoxidável austenítico AISI 304,

acabamento nº 4, foi diferente ($p < 0,05$) após 24 h de contato com o bacteriófago ϕ IBB-PF7A (Figura 18).

Figura 18 - Logarítmo do número de células viáveis de *P. fluorescens* ATCC 27663 planctônicas ou aderidas (CFU), quando em biofilmes simples, em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento nº 4, após infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A.



Verificou-se que o fago promoveu a redução da população microbiana de *P. fluorescens* em biofilme, com redução em 6 h de 5,5 ciclos logarítmicos e, após 24 h, de 2,03 ciclos logarítmicos (Figura 18). Resultados semelhantes foram encontrados por Sillankorva (2008) nos quais a ação fágica de ϕ IBB-PF7A não foi efetiva para células *P. fluorescens* em biofilmes após 4 h de contato. O aumento no número de células após 6 h de infecção pode ser atribuído à resistência celular ao bacteriófago. Segundo Buckling e Rainey (2002), a interação fago/bactéria durante longos períodos de tempo pode resultar em bactérias resistentes.

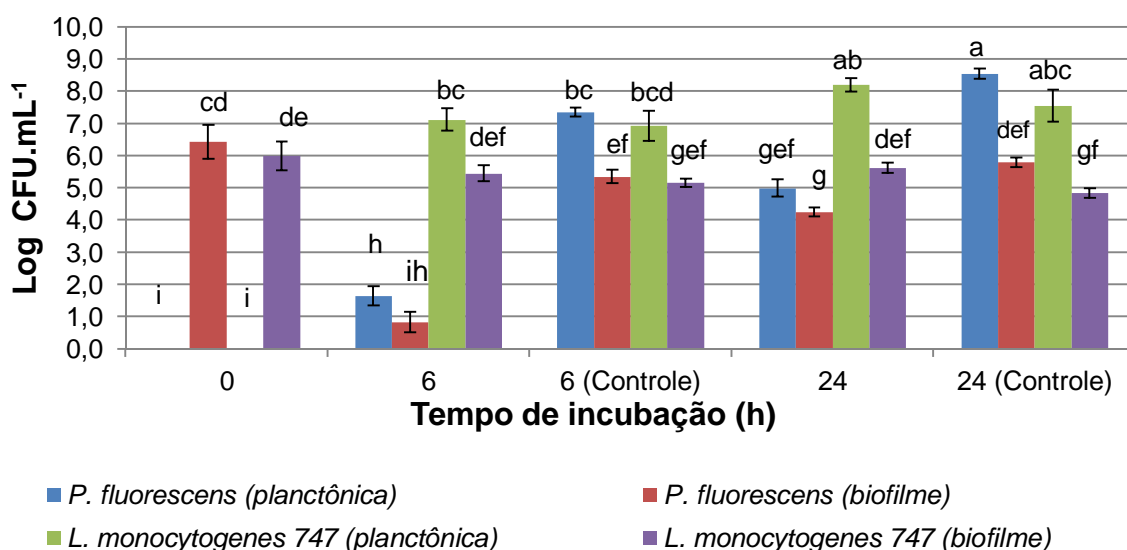
Ocasionalmente, mutações nas bactérias hospedeiras podem ocorrer e impossibilitar a síntese de receptores na parede necessários à adsorção do fago. Assim, células mutantes adquirem resistência ao vírus e, em consequência, esta população resistente sobrevive à infecção fágica e continua a replicar-se podendo, eventualmente, sobrepor-se como a estirpe dominante (LEVINE, 1939).

De acordo com Hyman e Abedon (2010) há dois tipos de fenômenos que podem ocorrer durante a resistência a adsorção. O primeiro é descrito como

restrição sendo que neste caso bactérias vivem, mas fagos morrem. O segundo são as infecções abortivas, em que fagos e bactérias morrem. Relatam também que a resistência a adsorção inclui a perda de moléculas receptoras de fagos pelo hospedeiro, assim como a perda de barreiras físicas que escondem receptores moleculares, como, por exemplo, cápsulas.

A resistência ao fago parece se iniciar nas células planctônicas, pois há um aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem microbiana em 6 h de tratamento (Figura 19). Estes resultados corroboram com os encontrados por Pires et al. (2011) que estudaram o controle de biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1 com fagos ϕ IBB-PAP21.

Figura 19 - Logarítmo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* 747 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 planctônicas ou aderidas (CFU), quando em biofilmes misto, em aço inoxidável austenítico AISI 304, acabamento nº 4, antes e após infecção com bacteriófago ϕ IBB-PF7A.



Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) no número de células viáveis de *P. fluorescens*, em biofilme misto com *L. monocytogenes* 747, após 6 h (5,6 ciclos logarítmicos) de tratamento com o bacteriófago ϕ IBB-PF7A (Figura 19). Entretanto, esta redução não foi significativa após 24 h ($p > 0,05$) (2,19 ciclos logarítmicos). A partir deste tempo verificou-se aumento da população, sendo atribuída também à resistência bacteriana ao vírus, possivelmente em células planctônicas.

O número de células de *L. monocytogenes* 747 em biofilmes, ao longo do tempo (0 h, 6 h e 24 h), não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) após

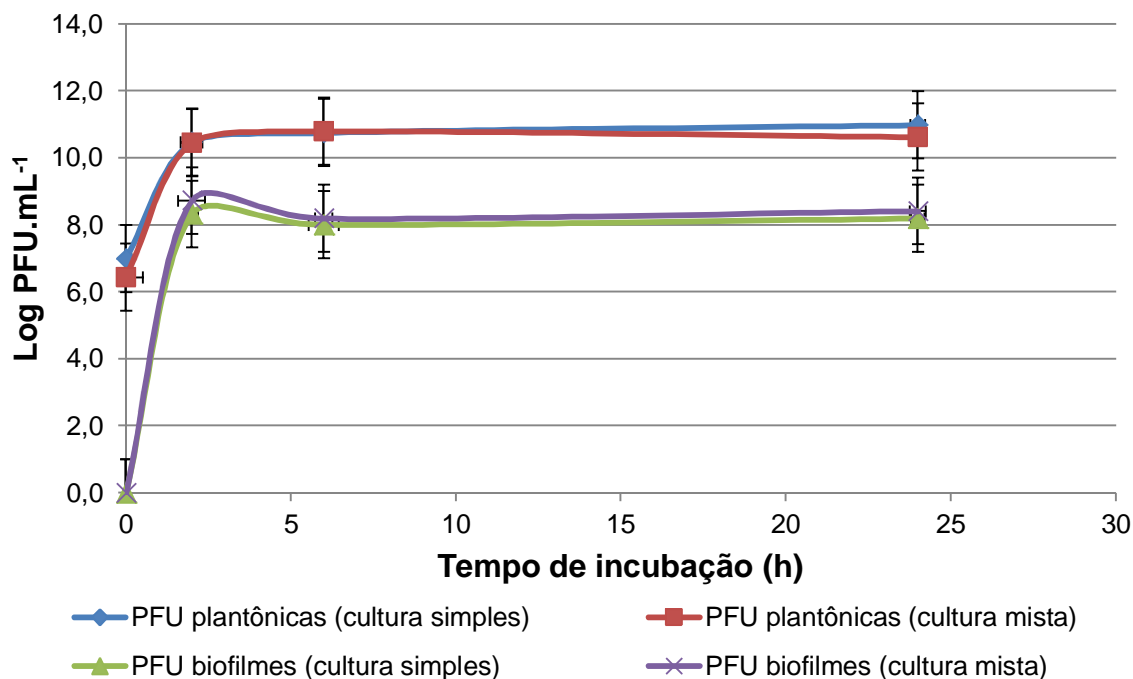
infecção fágica (Figura 19). Entretanto, o número de células na fase planctônica aumentou em, aproximadamente, 8 ciclos logaritmos após 24 h ($p < 0,05$). Possivelmente, estas células desprenderam-se do biofilme e multiplicaram-se mais rapidamente em solução, pelo fato de o número de células de *P. fluorescens* apresentar-se menor em 24 h de teste e, portanto, menor a competição existente entre ambas as espécies.

Estes resultados são semelhantes aos observados por Sillankorva (2008) que, ao realizar a infecção de células de *Staphylococcus lentus* e *P. fluorescens* em biofilme misto, observou que não houve redução de *P. fluorescens* por bacteriófagos ϕ IBB-PF7A, após 24 h e 72 h. Segundo Sillankorva (2008), *S. lentus* pode ter protegido *P. fluorescens* contra o ataque destes fagos.

Verificou-se que o número de placas fágicas planctônicas (PFU), em biofilme simples e biofilme misto, não apresentou diferença ($p < 0,05$) (Figura 20). O mesmo foi também observado para o número de PFU em biofilmes (simples ou misto).

Por fim, observou-se que os números de PFU nos tempos de 6 h e 24 h (Figura 20) não apresentaram diferenças ($p > 0,05$). Entretanto, entre 0 h e 2 h houve um grande aumento ($p < 0,05$) de fagos. Este resultado corrobora com os apresentados nas Figuras 18 e 19, uma vez que durante 6 h de teste houve uma grande redução no número de células em biofilme de *P. fluorescens*, o que indicou multiplicação viral.

Figura 20 - Logarítmo do número de bacteriófagos ϕ IBB-PF7A (PFU) em suspensão e em biofilme simples ou misto, de *P. fluorescens* ATCC 27663 com *L. monocytogenes* 747.



4.3.4 Fluorescência de hibridização in situ de peptídeo de ácidos nucleicos (PNA FISH) e coloração com DAPI das células em biofilme

Observou-se nas imagens obtidas foi possível observar que as células de *L. monocytogenes* 747 e de *P. fluorescens* ATCC 27663 aderiram e formaram biofilme em superfícies de vidro, quando em cultura simples, a 25 °C (Figura 21).

Constatou-se que, após infecção com fagos, a maioria das células de *P. fluorescens* apresentou cor azul mais clara e menor tamanho (Figuras 21c), comparada à cor das células antes da infecção (Figura 21b). Esse resultado pode ser associado a destruição de ácidos nucleicos, o que impediu a ação do fluorocromo DAPI.

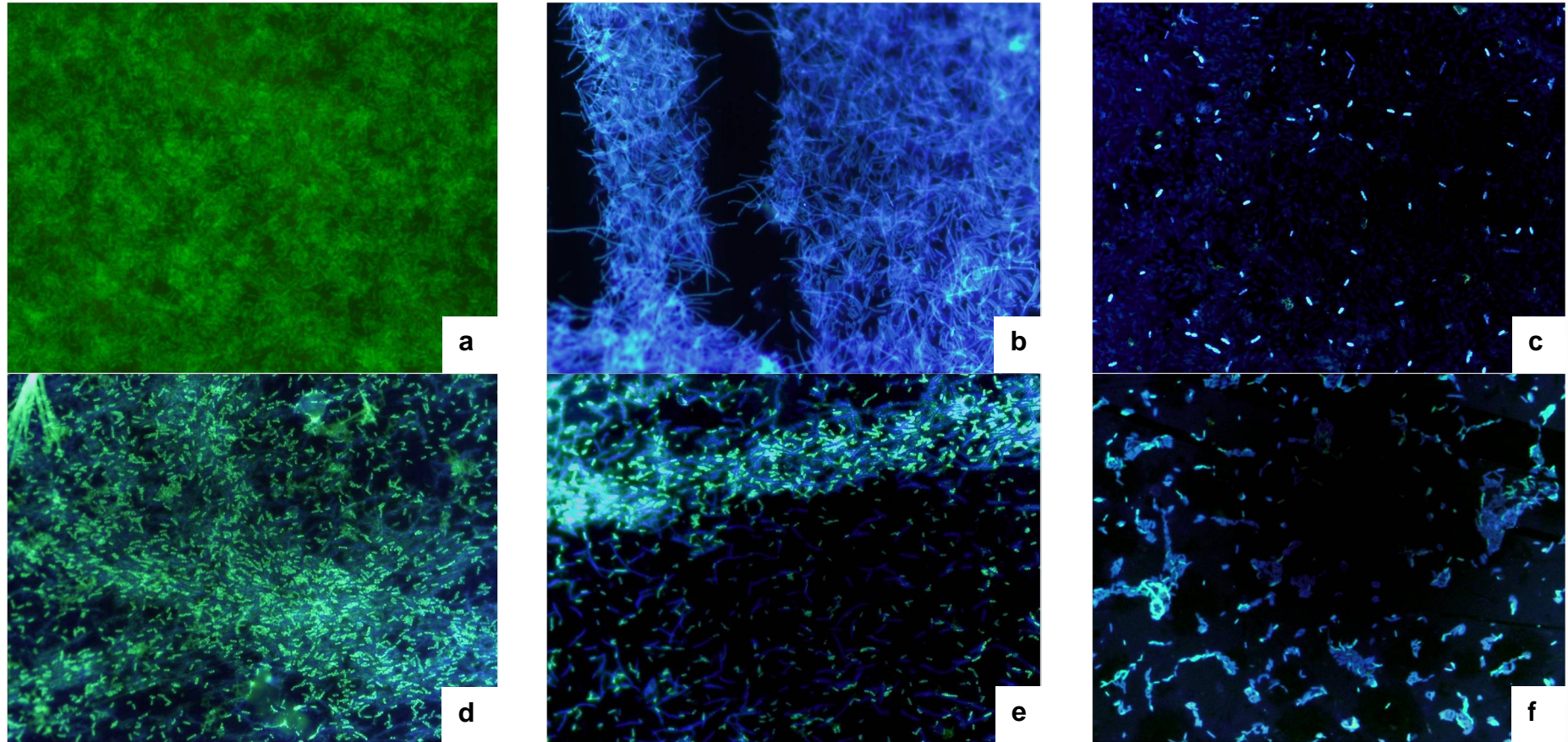
Por meio da Figura 21 (a e b) foi possível observar que a estrutura formada do biofilme contendo células de ambos os micro-organismos, ressaltando-se que *P. fluorescens* e *L. monocytogenes* formaram uma monocamada onde houve uma mistura dos micro-organismos. Contudo, verificou-se também a presença de células aderidas unicamente, fora da estrutura do biofilme. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Almeida et al. (2011), em que o biofilme formado

por *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* apresentou junto à superfície uma monocamada de células de *L. monocytogenes* e *S. enterica* e na parte superior uma outra monocamada de apenas células de *E. coli*. Os pesquisadores atribuíram este fato a uma possível competição microbiana por espaço e nutrientes.

Após infecção com fago, verificou-se que o número de células de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* foi menor na Figura 21f, comparado com o número de células visualizadas nas Figuras 21d e 21e, realizadas antes da adição de fagos. Este fato pode ser atribuído à morte das células de *P. fluorescens* e ao despreendimento das células de *L. monocytogenes*. As imagens corroboram com os resultados das contagens microbianas (CFU) e fágicas (PFU) (Figuras 18 a 20).

A técnica de *PNA fish* foi eficiente para análise de biofilmes constituídos de multiespécies bacterianas.

Figura 21- Imagens de microscopia de epifluorescência de biofilmes de *L. monocytogenes* 747 (cor verde) utilizando a sonda LmPNA1253 (a) e *P. fluorescens* ATCC 27663 coradas com fluorocromo DAPI (cor azul) (b), em superfícies de vidro, a 25 °C, em cultura simples; biofilmes simples de *P. fluorescens* ATCC 27663 em superfícies de vidro após infecção com bacteriófagos ϕ IBB-PF7A (c); biofilme misto de *P. fluorescens* ATCC 27663 e *L. monocytogenes* 747, sem infecção (d) e (e) e com fágica (f).



5. CONCLUSÃO

A modificação das superfícies de aço inoxidável austenítico AISI 304 e ferrítico AISI 430, com diferentes acabamentos, pela técnica de implantação iônica com Ag^{+1} apresentou-se como uma alternativa no controle da adesão de *L. monocytogenes*. A utilização de baixa energia de implantação dos íons (70 keV) fez com que a prata atingisse uma profundidade menor e, em consequência, melhor ação.

A implantação de íons Ag^{+1} contribuiu para a redução da hidrofobicidade das superfícies de aço inoxidável. Contudo, nenhuma relação foi obtida entre o número de células de *L. monocytogenes* aderidas e a hidrofobicidade do material. A adesão microbiana é um processo complexo, sendo que vários fatores podem contribuir para seu acontecimento.

Houve modificação da rugosidade após implantação dos íons Ag^{+1} . Contudo, esta modificação parece ser atribuída à assimetria das superfícies metálicas antes dos cortes para confecção dos cupons. Ressalta-se que, assim como a hidrofobicidade, não se obteve relação direta entre adesão de *L. monocytogenes* e rugosidade.

L. monocytogenes foi capaz de aderir nas superfícies de aço inoxidável austenítico AISI 304 em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 37 °C). Em temperaturas mais elevadas, 25 °C e 37 °C, este micro-organismo aderiu e formou biofilme, tanto em cultura simples, como em cultura mista com *Pseudomonas fluorescens*. Maiores contagens bacterianas foram obtidas próximas às temperaturas de multiplicação ótima.

O biocontrole com bacteriófago reduziu a contagem de *P. fluorescens*, em cultura simples ou mista com *L. monocytogenes*, em seis horas de contato com o

bacteriófago. Entretanto, após este tempo as células de *P. fluorescens* apresentaram resistência, não sendo eliminadas do meio.

Além do biocontrole de *P. fluorescens*, também observou-se o biocontrole de *L. monocytogenes*, quando em biofilme misto. Isso ocorreu pelo fato de haver o desprendimento e morte de células de *P. fluorescens* do biofilme, o que, conseqüentemente, ocasionou o desprendimento de *L. monocytogenes* para a solução.

Apesar de novas tecnologias serem empregadas para impedir o processo de adesão e formação de biofilme, o desafio é grande uma vez que os microorganismos são capazes de se modificar, criando mecanismos que os auxiliam a sobreviver em condições adversas, como por exemplo, alteram suas moléculas receptoras presentes na parede ou membrana celular impedindo a adsorção do bacteriófago.

Alguns estudos podem ser propostos como trabalho futuro. Dentre eles, podem-se citar, estudos que implantem íons Ag^{+1} com energia inferior a 70 keV, com o intuito de verificar se há maior redução do número de células aderidas de *L. monocytogenes*; estudos que verifiquem o desprendimento da prata implantada, principalmente, após contato com soluções ácidas e básicas, que apresentem o mesmo pH que alguns alimentos industrializados ou soluções para higienização, ou ainda, após ação de forças que simulem o atrito do esfregado ou forças de cisalhamento durante procedimentos de limpeza manual ou “clean in place (cip)”.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSOLOM, D.R. Measurement of surface properties of phagocytes, bacteria and other particles. **Methods in Enzymology**, v.132, p. 16-95, 1988.

ABSOLOM, D.R.; LAMBERTI, F.V.; POLICOVA, Z.; ZING, W.; VAN OSS, C.J. NEUMAN; A.W. Surface Thermodynamics of Bacterial Adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 90-97, 1983.

ADAMS, M.H. **Bacteriophages**. New York: Interscience Publishers, 1959. Disponível em: <<http://www.archive.org/stream/bacteriophages00adam#page/n5/mode/2up>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

ADAMSON, A.W. **Physical chemistry of surfaces**. New York: Wiley-Interscience, 1982.

ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P.; STEINBERG, C. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. **Journal of Pest Science**, v. 37, p. 365-373, 1993.

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

ALMEIDA, A.E.P.; TABACNIKS, M.H. **Implantação Iônica**. Disponível em: <<http://www2.if.usp.br/~lamfi/implanta.htm>>. Acesso em: 06 jan. 2012.

ALMEIDA, C.; AZEVEDO, N.F.; SANTOS, S.; KEEVIL, C.W.; VIEIRA, M.J. Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). **Plos One**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2011.

AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **Journal of Biomedical Materias Research Part B: Applied Biomaterial**, v. 43, p. 338-348, 1998.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos**. Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Editora Varela, p. 181-286, 2008.

ARAUJO, L.L. **Estudo da difusão de Ag e Al em α -Ti utilizando as técnicas de espectrometria de retroespalhamento Rutherford e reação nuclear.** Porto Alegre, RS: UFRGS, 2000. 145p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2000.

ATTERBURY, R.J.; VAN BERGEN, M.A.; ORTIZ, F; LOVELL, M.A.; HARRIS, J.A.; DE, B.A.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M; BARROW, P.A. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4543-4549, 2007.

AUGUSTIN, M.; ALI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 55-64, (2004).

AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; NOVELLO, J. Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. In: AZEVEDO, N.F.; CERCA, N. (Eds.). **Biofilmes – na saúde, no ambiente, na indústria.** Porto: Publindustria Ltda, in press, 2011.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The Role of Exopolymers in the Attachment of *Sphingomonas paucimobilis*. **Biofouling**, v. 16, p. 59-67, 2000.

BADDOO, N.R. Stainless steel in construction: a review of research, applications, challenges and opportunities. **Journal of Constructional Steel Research**, v. 64, p. 1199-1206, 2008.

BAGGE-RAVN, D.; N.G.; Y.; HJELM, M.; CHRISTIANSEN, J.N.; JOHANSEN, C.; GRAM, L. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries e analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 239-250, 2003.

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

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, n. 3, v. 1, p. 1-20, 2004.

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

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

BESSE, N.G.; AUDINET, N.; KÉROUANTON, A.; COLIN, P.; KALMOKOFF, M. Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 123-134, 2005.

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

BOHR, N. The penetration of atomic particles through matter. **Matematisk-fysiske Meddelelser Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab**, v. 18, n. 8, 1948.

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 Review**, v. 23, p. 179-230, 1999.

BOSETTI, M.; MASSE, A.; TOBIN, E.; CANNAS, M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 887-892, 2002.

BOULANÉ-PETERMANN, L. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, v. 10, n. 4, p. 275-300, 1996.

BOURGOIN, J.C.; CORBETT, J.W. A new mechanism for interstitial migration. **Physics Letters A**, v. 38, p. 135-137, 1972.

BOURION, F., CERF, O. Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. **Sciences des Aliments**, v. 16, p. 151-166, 1996.

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

BRACERAS, I.; ALAVA, J.I.; GOIKOETXEA, L.; MAEZTU, M.A.; ONATE, J.I. Interaction of engineered surfaces with the living world: Ion implantation vs. Osseointegration. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 8091-8098, 2007.

BREMER, P.J.; MONK, I.; OSBORNE, C.M. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1369-1376, 2001.

BRENSCHEIDT, F.; MATZ, W.; WIESER, E.; MÖLLER, W. Tribological properties and hardness of silicon nitride ceramics after ion implantation and subsequent annealing. **Surface and Coatings Technology**, v. 110, p. 188-193, 1998.

BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.16, p. 523-529, 1999.

BUCHENAUER, H. Biological control of soilborne disease by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 105, p. 329-348, 1998.

BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 269, p. 931- 936, 2002.

BUSSCHER, H. J., WEERKAMP, A. H.; VAN DER MEI, H. C.; VAN PELT, A. W. J.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurements of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 980-983, 1984.

BUSSCHER, H.J.; SJOLLEMA, J.; VAN DER MEI, H. **Relative Importance of Surface Free Energy as a Measure of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion to Surfaces**. In: DOYLE, R.J.; ROSENBERG, M. (Eds). Microbial cell surface hydrophobicity. Washington: American Society of Microbiology. 1990.

BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 165-173, 1987.

CANO, E.; MARTÍNEZ, L.; SIMANCAS, J.; PÉREZ-TRUJILLO, F.J.; GÓMEZ, C.; BASTIDAS, J.M. Influence of N, Ar and Si ion implantation on the passive layer and corrosion behaviour of AISI 304 and 430 stainless steels. **Surface and Coatings Technology**, v. 200, p. 5123-5131, 2006.

CARBÓ, H.M. **Aço Inoxidável: aplicações e especificações**. 2001. Disponível em: http://www.nucleinox.org.br/upfiles/arquivos/downloads/Acesita_Aplica_Especificapdf. Acesso em: 02 jul. 2012.

CARELI, R.T. **Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2005.

CARELI, R.T. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de alface (*Lactuca sativa* L.), sua captura e retenção por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* e seu controle por surfactantes**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 154 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 1-8, 2011.

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

CENTER FOR DISEASE CONTROL, (CDC). **Table 1 Provisional cases of infrequently reported notifiable diseases. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 58, n. 9, p. 221-248, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5809.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2011.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2007. v. 57, n. 14, p.336-370, 2008. **Disponível em:** <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5714a2.htm>>. Acesso em: 18 dez. 2011.

CERCA, N.; PIER, G.B.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Comparative evaluation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) adherence to acrylic by a static method and a parallel-plate flow dynamic method. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 755-760, 2004.

CERF, O.; CARPENTIER, B. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 1-8, 2011.

CERF, O.; CARPENTIER, B.; SANDERS, P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts. "Resistance" has different meanings. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 247-254, 2010.

CHAIGNON, P.; SADOVSKAYA, I.; RAGUNAH, C.H.; RAMASUBBU, N.; KAPLAN, J. B.; JABBOURI, S. Susceptibility of Staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 125-132, 2007.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G.; ADRIAO, A. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, p. 116, p. 52-63, 2007.

CHAMBERLAIN, A.H.L. **The Role of Adsorbed Layers in Bacterial Adhesion**. In: Melo, L. F.; Bott, T. R.; Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilms – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 59-67, 1992.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. (Eds.). **Biofilms**. New York: John Wiley & Sons, 1990.

CHARACKLIS, W.G. Fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnology Bioengineering**, v. 23, p. 1923-1960, 1981.

CHAVANT, P., MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.-N.; M. HEBRAUD. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 728-737, 2002.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável**. Minho, Braga: Universidade de Minho, 2004. 186 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Minho.

CHENG, C.-M.; DOYLE, M.P.; LUCHANSKY, J.B. Identification of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 58, 1340-1344, 1995.

CHOU, W.L.; YU, D.G.; YANG, M.C. The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. **Polymer. Advances Technology**, v. 16, n. 8, p. 600-607, 2005.

COLWELL, J.M.; WENTRUP-BYRNE, E.; BELL, J.M.; WIELUNSKI, L.S. A study of the chemical and physical effects of ion implantation of micro-porous and nonporous PTFE. **Surface and Coatings Technology**, v. 168, p. 216-222, 2003.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, CALDWELL, Z.; D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

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

CUI, F.Z.; LUO, Z.S. Biomaterials modification by ion-beam processing. **Surface and Coating Technology**, v. 112, p. 278-285, 1999.

CURTIN, J.J.; DONLAN, R.M. Using bacteriophages to reduce formation of catheter associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1268-1275, 2006.

DAN, Z.G.; NI, H.W.; XU, B.F.; XIONG, J.; XIONG, P.Y. Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted copper ions. **Thin Solid Films**, v. 492, p. 93-100, 2005.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.O. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, J.E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **Ciba Foundation Symposium**, v. 207, p. 15-27, 1997.

DEARNALEY, G. Ion implantation. **Annual Review of Materials Science**, v. 4, p. 93-123, 1974.

DEL RIO, B.; BINETTI, A.G.; MARTÍN, M.C.; FERNÁNDEZ, M.; MAGADÁN, A.H.; ALVAREZ, M.A. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. **Food Microbiology**, v. 24, p. 75-81, 2007.

DEWANTI, R.; WONG, A.C.L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, 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**, v. 154, p. 9-16, 2003.

- DINIZ, J.A. **Formação de filmes finos de óxinitreto de silício (SiO_xN_y) por implantações de íons de nitrogênio (N₂⁺) e de óxido nítrico (NO⁺)**. Campinas, SP: UNICAMP, 1996. 148p. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 130-138, 2003.
- DONG, Y.-H.; GUSTI, A.R.; ZHANG, Q., XU, J.-L.; Zhang, L.-H. Identification of quorum-sensing N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1754-1759, 2002.
- DONG, Y.; LI, X.; TIAN, L.; BELL, T.; Sammons, R.L.; Dong H. Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. **Acta Biomaterialia**, n. 7, p. 447-457, 2011.
- DOYLE, M.P. A new generation of foodborne pathogens. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 12, n. 8, p. 490-493, 1992.
- DOYLE, R. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 391-400, 2000.
- DUCKWORTH, D. **History and basic properties of bacterial viruses**. In: GOYAL, S. M.; GERBA, C.P.; BITTON, G. Phage Ecology. New York: John Wiley & Sons. 1987. p. 1-44.
- DUFOUR, M., SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1438-1443, 2004.
- DUNNE, W.M. Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.
- DÜRR, H. Influence of surface roughness and wettability of stainless steel on soil adhesion, cleanability and microbial inactivation. **Food and Bioproducts processing**, v. 85, n. C1, p. 49-56, 2007.
- EDWARDS, K.J.; RUTENBERG, A.D. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localised mineral dissolution, **Chemical Geology**, v. 180, p. 19-32, 2001.
- ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; JIA, X.; WILLIAMS, R. **Particle Deposition and Aggregation-Measurements, Modelling and Simulation**. New York: Oxford. Colloid and Surface Engineering Series, Butterworth-Heinemann Ltd., 1995.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods and the related risk for human illness. **The EFSA Journal**, v. 599, p. 1-42, 2007.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BELLON-FONTAINE, M.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 8, p. 728-738, 2002.

FAN, Y.W.; CUI, F.Z.; CHEN, L.N.; ZHAI, Y.; XU, Q.Y. Improvement of neural cell adherence to silicon surface by hydroxyl ion implantation. **Surface and Coatings Technology**, v. 131, p. 355-359, 2000.

FARRAG, S.A.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* when incubated together with *Pseudomonas* species in tryptose broth at 7 and 13 °C. **Journal Food Protection**, v. 52, p. 536-539, 1989a.

FARRAG, S.A.; MARTH, E.H. Variation in initial populations of *Pseudomonas fluorescens* affects behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk at 7 or 13 °C. **Milchwissenschaft**, v. 46, p. 718-721, 1989c.

FARRAG, S.E.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7 or 13 °C in skim milk. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 852-855, 1989b.

FENG, H.; YU, Z.; CHU, P.K. Ion implantation of organisms. **Materials Science and Engineering R**, v. 54, p. 49-120, 2006.

FENG, K.; LI, Z.; CAI, X.; CHU P.K. Silver implanted 316L stainless steel as bipolar plates in polymer electrolyte membrane fuel cells. **Materials Chemistry and Physics**, v. 126, p. 6-11, 2011.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000.

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

FLETCHER, M. **Microbial adhesion to surfaces**. Chichester: Ellis Horwood, 1980.

FLINT, S.H.; BREMER, P.J.; BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant - description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v. 11, n. 1, p. 81-87, 1997.

FLINT, S.H.; BROOKS, J.D.; BREMER, P.J. Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo resistant *Streptococci*. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p. 235-242, 2000.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. por GUIMARÃES, M.C.M.; LEONHARDT, C. Consultoria, supervisão e revisão técnica: Tondo, E.C. Porto Alegre: Artmed, p. 151-154, 2002.

FOWKES, F.M.; MCCARTH, W.A.; MOSTAFA, M.A. Contact angles and equilibrium spreading pressure of liquids on hydrophobic solids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 78, p. 200-206, 1990.

FREEDMAN, D.J.; KONDO, J.K.; WILLRETT, D.L. Antagonism of foodborne bacteria by *Pseudomonas* spp.: a possible role for iron. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 484-489, 1989.

GALLARDO-MORENO, A.M.; MULTIGNER, M.; CALZADO-MARTÍN, A.; MÉNDEZ-VILAS, A.; SALDAÑA, L.; GALVÁN, J.C.; PACHA-OLIVENZA, M.A.; PERERA-NÚÑEZ, J.; GONZÁLEZ-CARRASCO, J.L.; BRACERAS, I.; VILABOA, N.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.L. Bacterial adhesion reduction on a biocompatible Si⁺ ion implanted austenitic stainless steel. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 1567-1576, 2011.

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.

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

GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.

GASANOV U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 851-875, 2005.

GELLING, B.G.; BROOME, C.V., 1989. Listeriosis. **Journal of the American Medical Association**, 261, 1313–1320, 1989.

GHANDHI, S.K. **VLSI Fabrication principles: silicon and gallium arsenide**. 2^a ed. New York: John Wiley, 1994.

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

GIWERCMAN, B.; JENSEN, E.T.; HOIBY, N.; KHARAZMI, A.; COSTERTON, J.W. Induction of β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**, v. 35, p. 1008-1010, 1991.

GOTTENBOS, B.; VAN DER MEI, H.C.; KLATTER, F.; NIEUWENHUIS, P.; BUSSCHER, H.J. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. **Biomaterials**, v. 23, p. 1417-1423, 2001.

GUÐBJÖRNSDÓTTIR, B.; EINARSSON, H.; THORKESSON, G. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of Gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 55-61, 2005.

GUDMUNDSDÓTTIR, S.; GUÐBJÖRNSDÓTTIR, B.; EINARSSON, H.; KRISTINSSON, K.G.; KRISTJÁNSSON, M. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1304-1311, 2006.

GUERRA, C.P. **Modificação estrutural em sílica vítrea e quartzo cristalino por implantação de He⁺ para guiamento óptico**. Campinas, SP: UNICAMP, 1996. 124p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas, 1996.

GUNDUZ, G.T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 3-4, p. 329-336, 2006.

GUPTA, A.; SILVER, S. Silver as a biocide: will resistance become a problem? **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 888, 1998.

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

HAGENS, S.; LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 3, p. 513-519, 2007.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HANLON, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 118-128, 2007.

HANLON, G.W.; DENYER, S.P.; OLLIFF, C.J.; IBRAHIM, L.J. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 1, n. 67, 2746-2753, 2001.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v. 24, p. 380-392, 2007.

HASSAN, A.N.; BIRT, D.M.; FRANK, J.F. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 322-327, 2004.

HATANO, K.; INOUE, H.; KOJO, T.; MATSUNAGA, T.; TSUJISAWA, T.; UCHIYAMA, C.; UCHIDA, Y. Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. **Bone**, v. 25, p. 439-445, 1999.

HAYES, P.R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Trad. por PÉREZ, B.S. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 187-196.

HELKE, D.M.; WONG, A.C.L. Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 963-968, 1994.

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 445-448, 1988.

HERTING, G.; WALLINDER, I.O.; LEYGRAF, C. Corrosion-induced release of chromium and iron from ferritic stainless steel grade AISI 430 in simulated food contact. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 291-300, 2008.

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 & Biodegradation**, v. 52, p.175-185, 2003.

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

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

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

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Isolation and identification of adherent gram-negative microorganisms from four meat-processing facilities. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9p. 1135-1138, 1997.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 424-434, 2010.

HYMAN, P.; ABEDON, S.T. Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, p. 217-248, 2010.

IWASAKI, T.; MEJIMA, S.; KOIDE, T.; MORIKANE, R.; NAKAYAMA, H.; SHINADA, T.; OHDOMARI, I.; KAWARADA, H. Vertically aligned carbon nanotube growth from Ni nanoparticles prepared by ion implantation. **Diamond and Related Materials**, v. 17, p. 1443-1446, 2008.

JACKSON, M.K.; PHILLIPS, S.N. Necrotizing hepatitis in pet birds associated with *Pseudomonas fluorescens*. **Avian Disease**, v. 40, p. 473-476, 1996.

JANZTEN, M. M.; NAVAS, J.; CORUJO, A.; MORENO, R.; LÓPEZ, V.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n.3, p. 235-247, 2006.

JESSEN, B. LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 265 - 269, 2003.

JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S.P., SON, R.; FARINAZLEEN, M.G.; CHEAH, Y.K. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 1-11, 2010.

JOHANSSON, T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 77-85, 1998.

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

KASEMO, B. Biological surface science. **Surface Science** 500, p. 656-677, 2002.

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

KLAUSEN, M.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 61-68, 2003.

KUKAREKO, V.A.; BYELI, A.V. Dose rate and microstructure of nitrogen ion-implanted chromium steels. **Surface and Coatings Technology**, v. 127, p. 174-178, 2000.

KUUSELA, P.; MORAN, A.P.; VARTIO, T.; KOSUNEN, T.U. Interaction of *Campylobacter jejuni* with extracellular matrix components. **Biochimica et biophysica acta**, v. 993, n. 2-3, p. 297-300, 1989.

KWOK, D.Y.; LEUNG, A.; LAM, C.N.C.; LI, A.; WU, R.; NEUMANN, A.W. Low-Rate Dynamic Contact Angles on Poly(methyl methacrylate) and the Determination of Solid Surface Tensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 206, n. 1, p. 44-51, 1998.

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

- LAW, B.A.; ANDREW, A.T.; SHARPE, M.E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 44, p.145-148, 1977.
- LEAR, J.C.; MAILLARD, J.Y.; DETTMAR, P.W.; GODDARD, P.A.; RUSSELL, A.D. Chloroxylenol and triclosan-tolerant bacteria from industrial sources. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 238-242, 2002.
- LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 179-184, 2003.
- LEREBOUR, G.; CUPFERMAN, S.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin[®] reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 7-16, 2004.
- LEVINE, J.A. **Viruses**. Library of congress. Scientific American Library, 1939.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LHOEST, J.B.; DEWEZ, J.L.; BERTRAND, P. PMMA surface modification under keV and MeV ion bombardment in relation to mammalian cell adhesion. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 105, p. 322-327, 1995.
- LI, D.J.; NIU, L.F. Cell attachment of polypropylene surface-modified by COOH⁺ ion implantation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 192, p. 393-401, 2002.
- LI, J.X.; WANG, J.; SHEN, L.R.; XU, Z.J.; LI, P.; WAN, G.J.; HUANG, N. The influence of polyethylene terephthalate surfaces modified by silver ion implantation on bacterial adhesion behavior. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p. 8155-8159, 2007.
- LI, J.X.; WANG, J.; SHEN, L.R.; XU, Z.J.; LI, WAN, P.G.J., HUANG, N. The influence of polyethylene terephthalate surfaces modified by silver ion implantation on bacterial adhesion behavior. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 8155-8159, 2007.
- LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D.Y.; BRUNET, L.; LIGA, M.V.; LI, D.; ALVAREZ, P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, p. 4591-4602, 2008.
- LIM, Y.J.; OSHIDA, Y.; ANDRES, C.J.; BARCO, M.T. Surface characterizations of variously treated titanium materials. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 16, n. 1, p. 333-342, 2001.
- LIMA, J.C. **Ocorrência de *Staphylococcus* sp. Em ambiente hospitalar, caracterização de superfícies e adesão de *Staphylococcus aureus* em sondas nasoentéricas de poliuretano e silicone**. Viçosa-MG: UFV, 2007. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

LIPINSKI, P.; BIELINSKI, D.; OKRÓJ, W.; JAKUBOWSKI, W.; KLIMEK, L.; JAGIELSKI, J. Biomedical aspects of ion bombardment of polyethylene. **Vacuum**, v. 83, p. S200-S203, 2009.

LO, K.H.; SHEK, C.H.; LAI J.K.L. Recent developments in stainless steels. **Materials Science and Engineering R**, v. 65, p. 39-104, 2009.

LOC CARRILLO, C.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A. CONNERTON, I.F. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71: p. 6554-6563, 2005.

LOPES, J.M.J.; KREMER, F.; FICHTNER, P.F.P.; ZAWISLAK, F.C. Correlation between structural evolution and photoluminescence of Sn nanoclusters in SiO₂ layers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 242, p. 157-160, 2006.

LUNDE´N, J. M.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1129-1133, 2002.

MACHADO, S.M.O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcónio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis.** Universidade do Minho, 2005. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Portugal, 2005.

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

MAFU, A.A.; ROY,D.; GOULET, J.; SAVOIE, L.. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1969-1973, 1991.

MAHDAVI, M.; JALALI, M.; KERMANSHAHI, R.K. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 113-118, 2007.

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

MARQUES, M.S.G.T.C. **Monitorização de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*.** Braga, PT: UM, 2004. 181p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, 2004.

- MARSHALL, D.L., ANDREWS, L.S.; WELLS, J.H.; FARR, A.J. Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. **Food Microbiology**, v. 9, p. 303-309, 1992.
- MARSHALL, D.L.; SCHMIDT, R.H. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in milk preincubated with selected pseudomonads. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 277-282, 1988.
- MARSHALL, K.C. **Adsorption of Microorganisms to Surfaces**. New York: John Wiley and Sons. 1980. 439p.
- MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society Microbiology News**, v. 58, p. 202-207, 1992.
- MARSHALL, K.C. **Interfaces in microbial ecology**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1976.
- MARSHALL, K.C.; BLAINEY, B. L. **Role of Bacterial Adhesion in Biofilm Formation and Biocorrosion**. In: Flemming, H-C; Geesey, G G (eds) *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg, p. 29-45, 1990.
- MARTÍNEZ, L.; GÓMEZ, C.; PÉREZ, F.J. Sinergistic effect of ion implantation as a surface modification technique to improve localised corrosion of AISI 304 austenitic stainless steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 195, p. 70-80, 2005.
- MASSON, Y., AINSWORTH, P., FULLER, D., BOZKURT, H., IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 125-131, 2002.
- MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4278-4281, 2003.
- MAYER, M. **Simulation Program for the Analysis of NRA, RBS and ERDA (SIMNRA)**. Report IPP 9/113, Max-Planck-Institut für Plasmaphysik, Garching: Alemanha, 1997. Disponível em: <<http://home.rzg.mpg.de/~mam/>>. Acesso em: 31 jan. 2012.
- MAZZOLDI, P.; MATTEI, G. Some aspects of ion implantation technique in nanostructured materials. **Physica Status Solidi A**, v. 204, n. 3, p. 621-630, 2007.
- MCHUGH, G.L.; MOELLERING, R.C.; HOPKINS, C.C.; SWARTZ, M.N. *Salmonella* Typhimurium resistance to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. **Lancet**, v. 1, p. 235-240, 1975.
- MCLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 9, p. 210-213, 1990.

MCLEAN, J.J.C.; WHITELEY, M.; STRICKLER, D.J.; FUQUA, W.C. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v.154, p. 259–263, 1997.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MEDILANSKI, E.; KAUFMANN, K.; WICK, L.Y.; WANNE, O.; HARMS, H. Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. **Biofouling**, v. 18, n. 3, p.193-203, 2002.

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

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4015-4024, 2002.

MIKKELSEN, N.J.; PEDERSEN, J.; STRAEDE, C.A. Ion implantation-the job coater's supplement to coating techniques. **Surface and Coatings Technology**, v. 158-159, p. 42-47, 2002.

MITTELMAN, M.W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2760-2764, 1998.

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

MOULDER, J.F.; STICKLE, W.F.; SOBOL, P.E.; BOMBEN, P.E. **Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy**, 2^{ed.}, Perkin-Elmer: Eden Prairie, 1992.

MURAYAMA, Y.; SUZUKI, Y.; VIIIUELA, F.; MASSOUD, T.F.; DO, H.M.; GUGLIELMI, G.; IWAKI, M.; KAMIO, M.; ABE, T. A new surface modification technique of platinum coils by ion implantation and protein coating: Use in intravascular treatment of brain aneurysms. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 127-128, p. 1015-1018, 1997.

MYERS, S.M.; FOLLSTAEDT, D.M. Interaction of copper with cavities in silicon. **Journal Applied of Physics**, v. 79, n. 3, p. 1337-1350, 1996.

NAGHMOUCHI, K.; LE LAY, C.; BAAH, J.; DRIDER, D. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. **Research in Microbiology**, p. 1-8, 2012. No prelo.

NAKAO, A.; KAIBARA, M.; IWAKI, M.; SUZUKI, Y.; KUSAKABE, M. Surface characterization of cell adhesion controlled polymer modified by ion bombardment. **Applied Surface and Science**, v. 100-101, p. 112-115, 1996.

NAYAB, S.N.; JONES, F.H.; OLSEN, I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium, **Biomaterials**, v. 26, p. 4717–4727, 2005.

- NESBAKKEN, T.; KAPPERUD, G.; CAUGANT, D.A. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 161-171, 1996.
- NIKOLOVA, L.; SAINT-JACQUES, R.G.; DAHMOUNE, C.; ROSS, G.G. Si nanoparticle formation in SiO₂ by Si ion implantation: Effect of energy and fluence on size distribution and on SiO₂ composition. **Surfaces and Coatings Technology**, v. 203, p. 2501–2505, 2009.
- NILSSON, R.E.; ROSS, T.; BOWMAN, J.P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 14-24, 2011.
- NORARAT, R.; SEMSANG, N.; ANUNTALABHOCHAI, S.; YU, L.D. Very low-energy and low-fluence ion beam bombardment of naked plasmid DNA. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 267, p. 1650-1653, 2009.
- NORTEMANS, S., DORMANS, J. A. M. A., MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, v. 5, p. 21-36, 1991.
- NORWOOD, D.; GILMOUR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. **Letter in Applied Microbiology**, v. 33, p. 320- 324, 2001.
- NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 576-582, 1999.
- OLIVEIRA, K.M.P. **Adesão de *Salmonella* Enteritidis em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. Londrina, PR: UEL, 2006. 113p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.
- OLIVEIRA, R. **Fenómenos Interfaciais**. Braga: Universidade do Minho, 2001. 126 p.
- OLIVEIRA, R.M. **Dopagem tipo-n em estruturas SIMOX**. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2007. 88p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2007.
- OLOFINJANA, A.; TESFAMICHAEL, T.; BELL, J.M. Chemical modification and the attending surface hardness of low alloy steel through medium energy nitrogen ion implantation. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 164-165, p. 905-910, 2005.
- OLOFSSON, T.C.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Composition of the bacterial population of refrigerated beef, identified with direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 233-240, 2007.
- ORTIZ, S.; LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; LÓPEZ, P.; DÁVILA, J.C.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n. 10, p. 1177-1184, 2010.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 110-116, 2004.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Acyl homoserine lactone quorum sensing in Gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8789-8793, 2000.

PELLETIER, H.; MILLE, P.; CORNET, A.; GROB, J.J.; STOQUERT, J.P.; MULLER, D. Effects of high energy nitrogen implantation on stainless steel microstructure. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 148, p. 824-829, 1999.

PERCIVAL, S.L.; BOWLER, P.G.; RUSSEL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, p. 1-7, 2005.

PEREIRA, A.; MENDES, J.; MELO, L.F. Monitoring cleaning-in-place of shampoo films using nanovibration technology. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 136, p. 376-382, 2009

PEREIRA, A.; MENDES, J.; MELO, L.F. Using nanovibrations to monitor biofouling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, p. 1407-1415, 2008.

PÉREZ, F.J.; OTERO, E.; HIERRO, M.P.; GÓMEZ, C.; PEDRAZA, F.; DE SEGOVIA, J.L.; ROMÁN, E. High temperature corrosion protection of austenitic AISI 304 stainless steel by Si, Mo and Ce ion implantation. **Surface and Coatings Technology**, v. 108-109, p. 127-131, 1998.

PERRIN, M., BREMER, M.; DELAMARE, C. Fatal cases of *Listeria innocua* bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5308-5309, 2003.

PESENTI, G.C. **Modificação de características elétricas de estruturas semicondutoras III-V através de bombardeamento com íons**. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2004. 95p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2004.

PETRAN, R.L.; ZOTTOLA, E.A. A study of factors effecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Science**, v. 5, p. 458-460, 1989.

Equipamentos usados para, L.; ABDELMOULA, S.M.; MERIEAU, A.; LEROUX P.; CAZIN, L.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M.G.J. *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 985-995, 2001.

PIRES, D.; SILLANKORVA, S.; FAUSTINO, A.; AZEREDO, J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. **Research of Microbiology**, v. 162, p.798-806, 2011.

PISANI, C.A. **Medidor de dose de íons implantados**. Campinas, SP: UNICAMP, 1990. 126p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Estadual de Campinas, 1990.

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

PONCHARAL, P.; WANG, Z.L.; UGARTE, D.; DE HEER WALT, A. Electrostatic deflections and electromechanical resonances of carbon nanotubes. **Science**, v. 283, p. 1513-1516, 1999.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm-Wiss U.-Technology**, v. 32, p. 321-326, 1999.

RAHN, R.O.; SETLOW, J.K.; LANDRY, L.C. Ultraviolet irradiation of nucleic acids complexed with heavy atoms-III. Influence of Ag⁺ and Hg²⁺ on the sensitivity of phage and of transforming DNA to ultraviolet radiation. **Photochemistry Photobiology**, v. 18, n. 1, p. 39-41, 1973.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2008.

RAMASWAMY, V.; HAYNES, T.E.; WHITE, C.W.; MOBERLYCHAN, W.J.; ROORDA, S.; AZIZ, M.J. Synthesis of Nearly Monodisperse Embedded Nanoparticles by Separating Nucleation and Growth in Ion Implantation. **Nano Letters**, v. 5, n.2, p. 373-377, 2005.

RAMIREZ, R.J.; QUINTANA, P.P.; GALVAN, J.J.C.; DIAZ, J.G. Colestasis intrahepatica severa en el curso de sepsis por *Pseudomonas fluorescens*. **Review in Clinical Esp**, v. 185, p. 106-107, 1989.

RANGEL, C.M.; PAIVA, T.I.C. Chromium ion implantation for inhibition of corrosion of aluminium. **Surface and Coatings Technology**, v. 83, p. 194-200, 1996.

RANGEL, E.C. **Implantação iônica em filmes finos depositados por PECVD**. Campinas, SP: UNICAMP, 1999. 144p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, 1999.

REIJ, M.W.; DEN AANTREKKER, E.D. **Recontamination as a source of pathogens in processed foods**. ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Forceb, 2003.

RIEU, A.; BRIANDET, R.; HABIMANA, O.; GARMYN, D.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4491-4497, 2008.

RIMINI, E. **Ion implantation: basic to device fabrication**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers. 1995. 359p. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=ADdcocwEYyEC&printsec=frontcover#v=onepage&q=&f=false>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

RODRIGUES, D.A.F. **Listeria monocytogenes and Salmonella enterica adhesion, biofilm formation and control**. Minho, Braga: Universidade de Minho, 2010. 184f. Tese (Doutorado em Química e Engenharia Biológica) – Universidade do Minho, Minho.

ROSMANINHO, R.; SANTOS, O.; NYLANDER, T.; PAULSSON, M.; MÜLLER-STEINHAGEN, H.; MELO, L. Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – evaluation of fouling by milk components. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1176-1187, 2007.

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

RUSSELL A.D.; HUGO, W.B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 351-370, 1994.

SALUSTIANO, V.C.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.F.; LIMA, J.C.; BERNARDES, P.C.; LUIZ, L.M.P.; FERNANDES, P.E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 439-442, 2009.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTARÉM, E.R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v.15, p. 81-90, 2000.

SASAHARA, K.C.; ZOTTOLA, E.A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal of Food Protection**, v. 56, p.1022-1028, 1993.

SEIDEL, T.E. **Ion implantation**. In: SZE, S.M. VLSI Technology. New York: McGraw-Hill. 1983. p. 219.

SHAO, W.; ZHAO, Q. Effect of corrosion rate and surface energy of silver coatings on bacterial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 98-103, 2010.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. **Food Control**, v. 13, n. 6-7, p. 469-477, 2002.

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

SHARMA, M.; RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 449-459, 2005.

SHARMA, P.K.; HANUMANTHA RAO, K. Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 29, p. 21-38, 2003.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SIAS, U.S.; AMARAL, L.; BEHAR, M.; BOUDINOV, H.; MOREIRA, E.C. Photoluminescence behavior of silicon nanocrystals produced by hot implantation in SiO₂. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 242, p. 109-113, 2006a.

SIAS, U.S.; AMARAL, L.; BEHAR, M.; BOUDINOV, H.; MOREIRA, E.C. The excitation power density effect on the Si nanocrystals photoluminescence. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 250, p. 178-182, 2006b.

SIAS, U.S.; MOREIRA, E.C.; RIBEIRO, E.; BOUDINOV, H.; AMARAL, L.; BEHAR, M.; The influence of the implantation temperature on the photoluminescence characteristics of Si nanocrystals embedded into SiO₂ matrix. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 218, p. 405-409, 2004.

SILLANKORVA, S.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J.; SUTHERLAND, I.; AZEREDO, J. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage ϕ S1: the influence of temperature, host growth phase and media. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, p. 13-20, 2004.

SILLANKORVA, S.M. **Use of bacteriophages to control biofilms**. Minho, Braga: Universidade de Minho, 2008. 199f. Tese (Doutorado em Química e Engenharia Biológica) – Universidade do Minho, Minho.

SILLANKORVA, S.M. **Utilização de Bacteriófagos no Controlo de Células Suspensas e Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens***. Minho, Braga: Universidade de Minho, 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Minho.

SILVA, C.A.S.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.F. Evaluation of ultraviolet radiation to control microorganisms adhering to low-density polyethylene films. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 175-178, 2003.

SILVA, D.L. **Estudo da perda de energia e da flutuação estatística da perda de energia de íons de lítio em direções aleatórias do silício**. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2000. 97p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2000.

SILVA, D.L.; MÖRSCHBÄCHER, M.J.; FICHTNER, P.F.P.; OLIVIERO, E.; BEHAR, M. Formation of bubbles and extended defects in He implanted (100) Si at elevated temperatures. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 219-220, p. 713-717, 2004.

SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Adhesion to and Viability of *Listeria monocytogenes* on Food Contact Surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1379-1385, 2008.

SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 341-353, 2003.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; CLETO, S.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 335-341, 2008a.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M.J. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 309-316, 2008b.

SIOHANSI, P.; TOBIN, E.J. Surface treatment of biomaterials by ion beam processed. **Surface & Coatings Technology**, v. 83, p. 175-182, 1996.

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

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

SMOOT, L.M.; PIERSON, M.D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1293-1298, 1998.

STANFORD, C. M.; KELLER, J. C.; SOLURSH, M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 1, p. 1061-1071, 1994.

STAR, A.; GABRIEL, J.C.P.; BRADLEY, K.; GRUNER, G. Electronic detection of specific protein binding using nanotube FET devices. **Nano Letters**, v. 3, p. 459-63, 2003.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT™ User's Guide**. Release 6.03 edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1988. p.1028.

STORGARDS, E.; SIMOLA, H.; SJOËBERG, A.-M.; WIRTANEN G. Hygiene of gasket materials used in food processing equipment part 1: new materials. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 77, part C, p. 137-145, 1999.

SUN, Y.; LI, C.; ZHIYONG, Z.; LIU, W.; YANG, S. Surface modification of polyethylene terephthalate implanted by argon ions. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 135, p. 517-522, 1998.

SUTHERLAND, I. W.; HUGHES, K. A.; SKILLMAN, L. C.; TAIT, K. The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 1-6, 2004.

SVORCÍK, V.; ARENHOLZ, E.; HNATOWICZ, V.; RYBKA, V.; ÖCHSNER, R.; RYSSEL, H. AFM surface investigation of polyethylene modified by ion bombardment. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 142, p. 349-354, 1998.

SWART, J.W. **Semicondutores: Fundamentos, Técnicas e Aplicações**. 1. ed. CAMPINAS: Editora da UNICAMP, 2008. v. 1. 374 p.

SZLAVIK, J.; PAIVA, D.S.; MØRK, N.; VAN DEN BERG F.; VERRAN, J.; WHITEHEAD, K.; KNØCHEL, S.; NIELSEN, D.S. Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 181-188, 2012.

TAIT, K.; SKILLMAN, L.C.; SUTHERLAND, I.W. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. **Biofouling**, v. 18, p. 305-311, 2002.

TANG, H.Q.; FENG, H.J.; ZHENG, J.H.; ZHAO, J. A study on antibacterial properties of Ag⁺-implanted pyrolytic carbon. **Surface Coatings and Technology**, v. 201, p. 5633-5636, 2007a.

TANG, H.Q.; LIU, T.; LIU, X.; GU, H.Q.; ZHAO, J. A study on biocompatibility and bactericidal properties of pyrolytic carbon by silver ion implantation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 255, p. 304–308, 2007b.

TANS, S.J.; VERSCHUEREN, A.R.M.; DEKKER, C. Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube. **Nature**, v. 393, p. 49-52, 1998.

TEIXEIRA, P.; LIMA, J.C.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Colonisation of Bench Cover Materials by *Salmonella typhimurium*. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 5, p. 5-10, 2007.

THOUVENIN, M.; LANGLOIS, V.; BRIANDET, R.; LANGLOIS, J.Y.; GUERIN, P.H.; PERON, J.J.; HARAS, D.; VALLE-REHEL, H. Study of erodable paint properties involved in antifouling activity. **Biofouling**, v. 19, p. 177-186, 2003.

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

TSIBOUKLIS, J.; STONE, M.; THORPE, A.A.; GRAHAM, P.; NEVELL, T.G.; EWEN, R.J. Inhibiting bacterial adhesion onto surfaces: the non-stick coating approach. **International Journal of Adhesion**, v. 20, p. 91-96, 2000.

TSUJI, H.; ARAI, N.; MATSUMOTO, T.; UENO, K.; GOTOH, Y.; ADACHI, K.; KOTAKI, H.; ISHIKAWA, J.; Silver nanoparticle formation in thin oxide layer on silicon by silver-negative-ion implantation for Coulomb blockade at room temperature. **Applied Surface Science**, v. 238, p. 132–137, 2004.

TSUJI, H.; SATO, H.; BABA, T.; IKEMURA, S.; GOTOH, Y.; ISHIKAWA, J. Neuron cell positioning on polystyrene in culture by silver-negative ion implantation and region control of neural outgrowth. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 166-167, p. 815-819, 2000.

TSUJI, H.; SATOH, H.; IKEDA, S.; GOTOH, Y.; ISHIKAWA, J. Contact angle lowering of polystyrene surface by silver-negative ion implantation for improving biocompatibility and introduced atomic bond evaluation by XPS. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 141, p. 197-201, 1998.

TSUJI, H.; SOMMANI, P.; KITAMURA, T.; SATO, H.;GOTOH, Y.; ISHIKAWA, J. Nerve-cell attachment properties of polystyrene and silicone rubber modified by carbon negative-ion implantation. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 8123-8126, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). **Health Effects Assessment Summary Tables**. Annual FY-94. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Office, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response, Washington DC. 1994 b.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). **Integrated Risk Information System (IRIS)**. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, OH. 1994 a.

VAID, R.; LINTON, R.H.; MORGAN, M.T. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. **Food Microbiology**, v. 27, p. 979-984, 2010.

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

VAN DER MEI, H.C.; BOS, R.; BUSSCHER, H.J. A referente guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 9, p. 81, 1997.

VAN OSS, C.J. The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles-their determination and relatives roles. **Biofouling**, v. 4, p. 25-35, 1991.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F. The hidrophilicity and hidrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F.; COSTANZO, P.M. DLVO and non-DLVO interactions in hectorite. **Clays Clay Minerals**, v. 38, p. 151-159, 1990.

VENUGOPAL, B.; LUCKEY, T.D. **Metal Toxicity in Mammals: 2. Chemical Toxicity of Metals and Metalloids**. New York: Plenum Press, 1978. p. 32 - 36.

VERRAN, J.; BOYD, R.D. The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review. **Biofouling**, v. 17, n. 1, p. 59-71, 2001.

VITAS, A.I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, E.I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 349-356, 2004.

VOGEL, B.F.; JORGENSEN, K.; CHRISTENSEN, H.; OLSEN, J.E.; GRAM, L. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2189–2199, 1997.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WAN, Y.Z.; RAMAN, S.; HE, F.; HUANG, Y. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper. **Vacuum**, v. 81, p. 1114-1118, 2007.

WANG, J.; HUANG, N.; PAN, C.J.; KWOK, S.C.H.; YANG, P.; LENG, Y.X.; CHEN J.Y.; SUN, H.; WAN, G.J.; LIU, Z.Y.; CHU, P.K. Bacterial repellence from polyethylene terephthalate surface modified by acetylene plasma immersion ion implantation–deposition. **Surface & Coatings Technology**, v. 186, p. 299-304, 2004.

WANG, L.; SUN, J.; LI, P.; SUN, J.; LV, Y.; JING, B.; LI, S.; JI, S.; WEN Z. Molybdenum nitride modified AISI 304 stainless steel bipolar plate for proton exchange membrane fuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, p. 1-8, 2012, no prelo.

WHITEHEAD, K.A.; COLLINGON, J.; VERRAN, J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, p. 129-138, 2005.

WHITEHEAD, K.A.; VERRAN, J. The effect of surface topography on the retention on microorganisms. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. C4, p. 253-259, 2006.

WILLIAMS, J.M.; GONZALES, A.; QUINTANA, J.; LEE, I.S.; BUCHANAN, R.A.; BURNS, F.C.; CULBERTSON, R.J.; LEVY, M.; TREGGIO, J.R. Ion implantation for corrosion inhibition of aluminum alloys in saline media. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v. 59-60, n.2, p. 845-850, 1991.

WIRTANEN, G.; SALO, S. **Biofilms risks**. In: Handbook of hygiene control in the food industry. LELIEVELD, H.L.M.; MOSTERT, M.A.; HOLAH, J. Woodhead Publishing Limited. Cambridge England, cap. 3, p. 46-68, 2005.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Microbiological risk assessment series 4. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Listeriosis**. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/diseases/listeriosis/en/>>. Acesso em: 18 dez. 2011.

XIAO, X.H.; REN, F.; WANG, J.B.; LIU, C.; JIANG, C.Z. Formation of aligned silver nanoparticles by ion implantation. **Materials Letters**, v. 61, p. 4435–4437, 2007.

YANG, S.H.; KONG, H.; CHOI, S.C.; KIM, D.E. The effect of humidity on the rolling resistance of silver coatings modified by plasma surface treatments. **Wear**, v. 249, p. 780-787, 2001.

YARLING, C.B. History of industrial and commercial ion implantation 1906–1978. **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v. 18, n. 4, p. 1746-1750, 2000.

YEO, S.H.; CHUA, L.Y. Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* on magnetic surfaces. **Colloids and Surfaces**, v. 36, p. 75-80, 2004.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. **Journal of Biomaterials**, v. 22, p. 2043-2048, 2001.

YOUSEF, A.E.; CARLSTROM, C. *Listeria monocytogenes*. In: **Food Microbiology: a Laboratory Manual**. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, p. 138 e139, 2003.

Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=aYORXplZq0wC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 19 dez. 2011.

YOUSSEF, A.A.; BUDZYNSKI, P.; FILIKS, J.; KOBZEV, A.P.; SIELANKO, J. Improvement of wear and hardness of steel by nitrogen implantation. **Vacuum**, v. 77, p. 37-45, 2004.

YU, Z.; DENG, J.; HE, J.; HUO, Y.; WU, Y.; WANG, X.; LUI, G. Mutation Breeding by ion implantation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 59-60, n. 1, p. 705-708, 1991.

YÜCEL, N.; ÇITAK, S.; ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiology**, v. 22, p. 241–245, 2005.

ZHANG, P.Q.; WU, J.X.; ZHANG, Q.; LU, X.Y.; WANG, K.A pitting mechanism for passive 304 stainless steel in sulphuric acid media containing chloride ions. **Corrosion Science**, v. 34, n. 8, p. 1343-1349, 1993.

ZHANG, W.; JI, J.; ZHANG, Y.; YAN, Q.; KURMAEV, E.Z.; MOEWES, A.; ZHAO, J.; CHU, P.K. Effects of NH₃, O₂, and N₂ co-implantation on Cu out-diffusion and antimicrobial properties of copper plasma-implanted polyethylene. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 8981–8985, 2007.

ZHANG, W.; ZHANG, Y.H.; JI, J.H.; ZHAO, J.; YAN, Q.; CHU, P.K. Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene. **Polymer**, v. 47, p. 7441-7445, 2006.

ZHAO, Q.; LIU, Y.; WANG, C.; WANG, S.; PENG, N.; JEYNES, C. Bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 8674-8681, 2007.

ZHAO, Q.; LIU, Y.; WANG, C.; WANG, S.; PENG, N.; JEYNES, C. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Medical Engineering and Physics**, v. 30, p. 341-448, 2008.

ZHOU, F.; YUAN, Y.; CHEN, K.; WANG X. Influence of nitrogen ion implantation energies on surface chemical bonding structure and mechanical properties of nitrogen-implanted silicon carbide ceramics. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v, 267, p. 2858-2865, 2009.

ZHU, Z.; SUN, Y.; LIU, C.; LIU, J.; JIN, Y. Chemical modifications of polymer films induced by high energy heavy ions. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 193, p. 271-277, 2002.

ZIEGLER, J.F. **Handbook of ion implantation technology**. Amsterdam: Elsevier. 1992.

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

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K.J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 351-362, 2011.