

CLEUBER ANTÔNIO DE SÁ SILVA

**AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NO CONTROLE DE
MICROORGANISMOS ADERIDOS EM FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA
DENSIDADE**

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 “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000**

À minha querida e amada
esposa Silvia.
Dedico

AGRADECIMENTO

Ao onipresente Deus.

Aos meus pais, por tão grande amor, dedicação e compreensão.

Aos meus irmãos, pela imensurável amizade, pelo incentivo e pela presença constantes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos e pelos demais auxílios.

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

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade de treinamento, pela amizade, pelo apoio e pela confiança.

Aos professores Nilda de Fátima Ferreira Soares, Frederico José Vieira Passos, Sukarno Olavo Ferreira e Marco Antônio Moreira Furtado, pela atenção, pela avaliação crítica do trabalho e pelas valiosas sugestões apresentadas.

A professora Maria Cristina Vanetti, do Departamento de Microbiologia/UFV, pelo fornecimentos das cepas empregadas neste trabalho e pelos oportunos esclarecimentos.

Ao professor José Benício Paes Chaves, do DTA/UFV, pela colaboração nas análises estatísticas dos dados experimentais.

Ao professor Bernardo Ruegger Almeida Neves, do Departamento de Física da UFMG, pelo apoio na viabilização da obtenção de imagens da

microtopografia do polietileno por microscopia de força atômica.

Aos funcionários do DTA/UFV, pela atenção, pela amizade e pelo apoio.

Ao amigo Marco Antônio Moreira Furtado, pelos ensinamentos durante o tempo de estágio e pela confiança dispensada.

Ao Sérgio Henrique Saraiva, pela colaboração e pelos valiosos esclarecimentos.

Às companheiras de laboratório, Aurélia, Cleusa, Kelly e Patrícia, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

Aos estudantes do curso de Engenharia de Alimentos da UFV, Barôncio e Erny, pela ajuda em diversas etapas do experimento e pelo companheirismo.

Aos colegas de curso e amigos que tive oportunidade de conhecer nestes dois anos de permanência em Viçosa. Em especial, ao amigo e companheiro de fotografias e aquarismo, Marco Antônio Sloboda Cortez.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CLEUBER ANTÔNIO DE SÁ SILVA, filho de Carlos da Silva e Malvina de Sá Silva, nasceu em Caxambu, Minas Gerais, em 6 de maio de 1973.

Em novembro de 1998, graduou-se em Farmácia - Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em outubro de 1998, iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Adesão bacteriana e formação de biofilmes.....	03
2.2 Adesão bacteriana e formação de biofilmes na indústria de alimentos.....	04
2.3 Mecanismo de adesão bacteriana.....	05
2.4 Fatores que influenciam a adesão.....	06
2.5 Microrganismos envolvidos na adesão bacteriana.....	07
2.6 Descontaminação de microrganismos aderidos.....	09
2.6.1 Descontaminação mecânica.....	09
2.6.2 Descontaminação por agentes químicos.....	10
2.6.3 Descontaminação por agentes físicos.....	10
2.7 Radiação ultravioleta.....	11
2.7.1 Espectro da radiação ultravioleta.....	11
2.7.2 Mecanismo de ação da radiação ultravioleta.....	12
2.7.3 Lâmpadas germicidas.....	14
2.7.4 Uso da radiação ultravioleta na redução da microbiota de líquidos.....	16

2.7.5	Uso da radiação ultravioleta na redução da microbiota de alimentos sólidos	17
2.7.6	Uso da radiação ultravioleta na redução da microbiota da superfícies de equipamentos e ambientes.....	18
2.7.7	Uso da radiação ultravioleta na redução de microrganismos em embalagens	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Microrganismos.....	22
3.2	Manutenção e ativação dos microrganismos e preparo das suspensões bacterianas... ..	23
3.3	Avaliação da adesão de células de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> K12 em superfícies de polietileno de baixa densidade.....	23
3.3.1	Adesão dos microrganismos ao polietileno.....	23
3.3.2	Determinação do número de células aderidas.....	24
3.4	Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na redução do número de células de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> K12 aderidas intencionalmente ao polietileno.....	24
3.4.1.	Modelo para irradiação das embalagens de polietileno.....	25
3.4.2.	Adesão dos microrganismos à superfície do polietileno e determinação do número de células aderidas.....	27
3.4.3.	Exposição das embalagens contendo as células aderidas à radiação ultravioleta.....	27
3.4.4.	Determinação do número de células que resistiram à exposição à radiação ultravioleta.....	27
3.4.5.	Determinação da eficiência da radiação ultravioleta.....	28
3.5	Influência da redução na intensidade da radiação ultravioleta sobre a eficiência bactericida.....	28
3.6	Avaliação da radiação ultravioleta em condições de uso.....	29
3.7	Microtopografia da superfície de polietileno de baixa densidade	30
3.8	Análise dos resultados.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	Aspectos morfológicos dos microrganismos.....	32
4.2	Adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> K12 em polietileno de baixa densidade.....	32

4.3	Eficiência da radiação ultravioleta na redução do número de células de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> aderidas ao polietileno.....	37
4.4	Redução na intensidade da radiação ultravioleta versus eficiência bactericida.....	43
4.5	Avaliação da radiação ultravioleta em condições de uso.....	47
4.6	Microtopografia da superfície de polietileno de baixa Densidade.....	48
5	RESUMO E CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE QUADROS

1. Percentuais e UFC/cm² de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidos a 8 e 18°C, em polietileno de baixa densidade, em função do logaritmo do número inicial (UFC/mL) na suspensão. Média de três repetições..... 33
2. Percentuais e UFC/cm² de *Escherichia coli* K 12 aderidos a 8 e 18°C, em polietileno de baixa densidade, em função do logaritmo número inicial (UFC/mL) na suspensão. Média de três repetições..... 33
3. Resumo da análise de variância dos logaritmos decimais dos números de UFC/cm² de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 aderidas em polietileno de baixa densidade, em diferentes temperaturas e números iniciais..... 34
4. Logaritmo da concentração inicial de células, valores de reduções decimais e valores de D, em cada repetição, e respectivas intensidades de radiação UV estimadas, empregadas nos experimentos com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12..... 38

5. Reduções decimais estimadas do número de células de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> K12 após exposição à radiação ultravioleta de 216 a 175 μWcm^{-2} , durante dois segundos, em função do número inicial de células aderidas ao polietileno de baixa densidade, obtidas a partir das respectivas regressões lineares.....	41
6. Influência da diminuição da intensidade da radiação UV na eficiência bactericida sobre células de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> K12 aderidas intencionalmente a polietileno de baixa densidade. Média de três repetições.....	44
7. Logaritmos dos números de microrganismos mesófilos nas embalagens de polietileno, antes e após exposição à radiação UV, em condições de uso, determinados pela técnica de Número Mais Provável (NMP). Média de três repetições.....	47

LISTA DE FIGURAS

1	Localização da radiação ultravioleta no espectro eletromagnético.....	12
2	a) Formação de dímero entre duas timinas adjacentes e b) formação de dímero entre timina e citosina.....	13
3	Exemplos de lâmpada germicidas.....	15
4	Equipamento para a pasteurização de suco de laranja.....	17
5	Estrutura química e espacial do polietileno de baixa densidade.....	19
6	Máquina de envase de líquidos em funcionamento: a) bobina de PEBD; b) localização da fonte de irradiação das embalagens; c) disposição da Lâmpada de radiação UV a 2 cm do PEBD.....	25
7	Modelo para exposição das embalagens à radiação UV	26
8	Modelo aberto para exposição das embalagens à radiação UV onde se visualiza a canaleta por onde corre o suporte com a embalagem...	26

9	Efeito das temperaturas de 8 e 18°C no número de células aderidas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, em função do logaritmo do número inicial de células. Média de três repetições.....	35
10	Efeito das temperaturas de 8 e 18°C no número de células aderidas de <i>Escherichia coli</i> K12, em função do logaritmo do número inicial de células. Média de três repetições.....	36
11	Diminuição da intensidade da radiação UV nas primeiras 70 horas de uso.....	39
12	Regressão linear do número de reduções decimais, em função do logaritmo do número inicial de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, após dois segundos de exposição à radiação UV.....	40
13	Regressão linear do número de reduções decimais, em função do logaritmo do número inicial de <i>Escherichia coli</i> K12, após dois segundos de exposição à radiação UV.....	41
14	Redução da intensidade da radiação UV com o tempo de uso.....	44
15	Relação entre o logaritmo do valor de D e a intensidade de radiação UV para células de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	45
16	Relação entre o logaritmo do valor de D e a intensidade de radiação UV para células de <i>Escherichia coli</i> K12.....	46
17	Microtopografia da superfície de polietileno representativa das regiões relativamente lisas, obtidas pela microscopia de força atômica.....	49
18	Microtopografia da superfície de polietileno, contendo fendas e elevações, obtidas pela microscopia de força atômica.....	49

RESUMO

SILVA, Cleuber Antônio de Sá, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000. **Avaliação da radiação ultravioleta no controle de microrganismos aderidos em filmes de polietileno de baixa densidade.** Orientador: Nélio José de Andrade. Conselheiros: Nilda de Fátima Ferreira Soares e Sukarno Olavo Ferreira.

A adesão de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 foi avaliada em embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD), empregando-se as seguintes condições: área interna da embalagem de 630 cm², temperaturas de adesão de 8 e 18°C, concentrações iniciais das suspensões bacterianas na ordem de 10⁵, 10⁶ e 10⁷UFC/mL e tempo de incubação de 12 horas. Constataram-se diferenças significativas (p<0,05) na temperatura de adesão e também nas interações entre microrganismos e as contagens iniciais na suspensão bacteriana. A adesão na temperatura de 18°C foi superior àquela encontrada a 8°C. Também, houve tendência de maior adesão com aumento do número inicial de células na suspensão bacteriana. A eficiência bactericida da radiação ultravioleta (UV) na redução do número de *E. coli* e *S. aureus* aderidas ao PEBD foi avaliada a partir de concentrações iniciais na ordem de 10⁵ a 10⁷, temperatura de adesão de 18°C por 12 horas e exposição entre 216 e 175 μWcm⁻². Constatou-se que a *E. coli* é mais resistente à exposição à radiação UV, apresentando valores D de 4,35 e 1,84 segundos, quando os logaritmos dos números iniciais de células

são iguais a 5 e 6,8, respectivamente; para *S. aureus*, os valores de D obtidos foram de 1,96 e 1,18, respectivamente. No estudo da redução da intensidade *versus* eficiência bactericida da radiação UV, observou-se redução na intensidade de 288 para 78 μWcm^{-2} após 1.500 horas de uso, sendo esse declínio mais acentuado nas 100 horas iniciais. A eficiência da radiação UV sobre *E. coli* decresceu de 0,94 RD, após 70 h de uso da lâmpada, para 0,36 RD, após 1500 horas. Para *S. aureus*, esses valores variaram de 1,04 a 0,58 RD. Foram avaliadas amostras de PEBD de três bobinas, antes e após irradiação, com 137 μWcm^{-2} por dois segundos. Constatou-se contaminação inicial nas embalagens de 0,16 NMP/cm² de mesófilos aeróbios, que, após exposição à radiação, diminuiu para 0,014 NMP/cm², sendo este valor abaixo da recomendação de 0,1 UFC/cm². Por meio de microscopia de força atômica (MFA), observou-se a existência de irregularidades na superfície do PEBD, como fendas e elevações. Essas imperfeições podem alojar bactérias, facilitando o processo de adesão, além de reduzirem a eficiência da radiação UV, devido à presença de regiões que protegem as células do contato com a radiação. Os resultados mostram que a radiação UV apresenta ação sobre bactérias aderidas à superfície de PEBD, sendo uma técnica útil na redução da microbiota presente nessa embalagem.

ABSTRACT

SILVA, Cleuber Antônio de Sá, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2000. **Ultraviolet radiation evaluation on control of microorganisms adhered to films of low density polyethylene.** Adviser: Nélio José de Andrade. Committee members: Nilda de Fátima Ferreira Soares and Sukarno Olavo Ferreira.

The cell adhesion of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* K12 was evaluated on polyethylene packages of low density (LDPE) with the following conditions: package internal area of 630 cm², adhesion temperatures of 8 and 18°C, bacteria suspension initial concentration of 10⁵, 10⁶ and 10⁷ UFC/mL and incubation period of 12 hours. One has verified significant difference (p<0.05) on adhesion temperature, microorganisms interactions as well as on initial counts in the bacteria suspension. The adhesion at 18°C was higher than the one found at 8°C. There was, also, a tendency to higher adhesion related to the increase on initial cell number of bacteria suspension. Ultraviolet radiation bactericide efficiency (UV) on reduction of *E. coli* and *S. aureus* number adhered to LDPE, was evaluated from initial concentrations of 10⁵ to 10⁷, adhesion temperature of 18°C for 12 hours and exposition between 216 and 175 μWcm⁻². It was verified that *E. coli* was more resistant to UV radiation exposition, showing D values of 4.35 and 1.84 seconds, when the initial logarithmic numbers of cells were 5.0 and 6.8, respectively. For *S. aureus*, the obtained D values were respectively 1.96 and

1.18. In the study of intensity reduction *versus* UV radiation bactericide efficiency, a reduction in intensity from 288 to 78 μWcm^{-2} was observed after 1500h of use, being this decrease higher in the 100 first hours. The UV radiation efficiency on *E. coli* decrease from 0.94 RD, after 70h of lamp use, to 0.36 RD after 1500h. For *S. aureus* these values varied from 1.04 to 0.58 RD. Samples of LDPE from three bobbins, before and after radiation, with 137 μWcm^{-2} in 2 seconds. The films were initially contaminated with 0.16 NMP/cm² by aerobic mesophiles, which was reduced to 0.014 NMP/cm² after exposition to radiation, being this value below the recommended value of 0.1 UFC/cm². The existence of irregularities on the LDPE surface, like slits and elevations, was observed by atomic power microscopy. These imperfections may lodge bacteria, turning to an easy process adhesion, further on to reduce the UV radiation efficiency due to the presence of regions that protect cells from radiation. The results showed that UV radiation presents efficiency against bacteria adhered to PELD surface, being a useful auxiliary technique on microbiologic control of these packages.

1. INTRODUÇÃO

Existe grande preocupação com a segurança dos alimentos disponíveis ao consumidor, em relação às características físicas, químicas e microbiológicas.

Assim, a indústria alimentícia deve agir de forma preventiva nas diversas etapas da produção dos alimentos, atuando em pontos onde é possível reduzir a contaminação com microrganismos patogênicos e/ou alteradores. Essas contaminações podem veicular enfermidades transmitidas por alimentos, apresentar problemas de diminuição da vida-de-prateleira ou, ainda, não atender à legislação vigente.

Nas indústrias de laticínios, as embalagens plásticas usadas no envase do leite fluido devem apresentar contaminação microbiológica em níveis que não afetem a qualidade do leite durante a estocagem e comercialização do produto.

O controle microbiológico dessas embalagens pode ser efetuado por meio da radiação ultravioleta (UV), no comprimento de onda em torno de 254 nm, emitida por diversas lâmpadas germicidas disponíveis comercialmente. A radiação UV é um agente sanificante físico que: elimina bactérias, bolores, leveduras e vírus; não deixa resíduos nas superfícies aplicadas; é um processo a seco; não necessita de aquecimento; é de simples emprego e de baixo custo; não apresentando restrições quanto ao seu uso em relação à legislação.

No entanto, há controvérsias quanto à eficiência antimicrobiana da

radiação UV. Aspectos como intensidade de radiação, tempo de exposição, distância da fonte de radiação UV à superfície, vida útil das lâmpadas germicidas comerciais e ação sobre os diversos microrganismos têm sido objeto de preocupações dos profissionais responsáveis pela qualidade final dos produtos.

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar a capacidade de adesão de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e de *Escherichia coli* K12 em superfície de polietileno de baixa densidade (PEBD). O outro objetivo foi avaliar a eficiência antimicrobiana da radiação UV sobre estes microrganismos aderidos ao PEBD e sobre microrganismos contaminantes de embalagens, em condições industriais. Também foi avaliada a eficiência da radiação UV em função do tempo de uso. Além disso, foi analisada a microtopografia do PEBD pela microscopia de força atômica.

O trabalho pretende fornecer subsídios para a melhor utilização da radiação UV pela indústria de laticínios, particularmente no envase de líquidos em PEBD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Adesão bacteriana e formação de biofilme

A adesão microbiana e a formação de biofilmes ocorrem em virtude da deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLLA, 1994, 1997; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; SNYDER, 1992; FLINT et al., 1997).

Uma vez aderidos, os microrganismos podem absorver e metabolizar nutrientes, liberando resíduos de seu metabolismo, produtos com função estrutural ou materiais que auxiliam na adesão e replicação celular, formando assim uma rede tridimensional dinâmica, conhecida como biofilme (BOWER et al., 1996). No biofilme, as bactérias estão fortemente aderidas a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálix (MOSTELLER e BISHOP, 1993; CRIADO et al., 1994; ELASRI e MILLER, 1999). Depois de formado o biofilme, os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. No biofilme, os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização, sendo uma importante fonte de contaminação na indústria de alimentos (MOSTELER e BISHOP, 1993).

2.2. Adesão bacteriana e formação de biofilmes na indústria de alimentos

A prevenção da contaminação causada por microrganismos patogênicos durante o processamento de alimentos é de considerável

importância para saúde pública e, conseqüentemente, de grande preocupação para a indústria (CUNLIFFE, 1999). Esta preocupação aumenta com o aparecimento de biofilmes bacterianos em superfícies usadas durante o processamento de alimentos (BOWER et al., 1996), constituindo um sério problema (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

Na indústria de alimentos, diversas superfícies para processamento são passíveis de apresentar formação de aderência e/ou formação de biofilmes de origem bacteriana. Dentre elas, incluem-se aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno, polietileno, policarbonato e ferro forjado (ZOTTOLA, 1997). As superfícies que entram em contato com os alimentos durante o processo de industrialização não devem contaminá-los ou aumentar a incidência de microrganismos, sejam estes alteradores ou patogênicos. Na indústria de laticínios, a linha de processamento apresenta comumente superfícies que permitem a adesão de bactérias patogênicas e esporulantes (MOSTELER e BISHOP, 1993).

A formação de biofilmes pode ser desejável ou indesejável. É desejável na obtenção de produtos fermentados, como o vinagre, em que bactérias produtoras de ácido acético crescem em biofilmes sobre finas camadas de madeira, convertendo o substrato em produto. Também, são usados no tratamento de águas residuárias oriundas do processamento de alimentos, onde os microrganismos aderidos removem os resíduos orgânicos e inorgânicos, facilitando o reuso desta água (ZOTTOLA, 1994).

A formação de biofilmes em superfícies que mantem contato com os alimentos é indesejável (ZOTTOLA, 1997). Em tubulações de água para consumo, a formação de biofilme é indesejável por razões higiênicas, estéticas e econômicas. Esse crescimento ocorre devido à utilização de compostos biodegradáveis presentes em água tratada ou originados de materiais que entram em contato com a água (VAN DER KOOIJ, 1999).

Uma função importante da embalagem de alimentos é a preservação deste (SONNEVELD, 2000). No entanto, os materiais das embalagens são possíveis fontes de contaminação na indústria de laticínios, onde foram isolados inclusive esporos de *Bacillus cereus* (VAN HEDDEGHEM e VLAEMYNCK, 1985), que apresentam grande hidrofobicidade, podendo aderir a tubulações (ANDERSSON et al., 1995). O desprendimento de bactérias

patogênicas e esporos aderidos a tubulações, por ação física (forças hidrodinâmicas), pode resultar em contaminações que levam à perda da qualidade do alimento, constituindo um risco em potencial para a saúde pública (MOSTELLER e BISHOP, 1993; CRIADO et al., 1994).

2.3. Mecanismos de adesão bacteriana

O processo de formação do biofilme é complexo, podendo se iniciar com a adesão de uma única bactéria (BOWER et al., 1996). Em ambiente de processamento de alimentos, o tempo requerido para que ocorra a adesão pode ser relativamente pequeno (MAFU et al., 1990; SMOOT e PIERSON, 1998). MAFU et al. (1990) observou, por microscopia eletrônica de varredura, adesão de células de *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável após 20 minutos de contato. As condições ambientais, o tipo de superfície e as características da bactéria também influem na adesão bacteriana.

Mecanismos de adesão bacteriana em tipos diferentes de superfícies têm sido propostos. Segundo BUSSCHER et al. (1984), a adesão ocorre em dois estágios, sendo o primeiro a aproximação inicial, seguida por ligações físicas à superfície. Do ponto de vista termodinâmico, a minimização da energia livre é o direcionamento da força para adesão. Quando a distância entre a bactéria e a superfície é superior a 50 nm, a aproximação da célula pode ser afetada por interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Quando a distância de separação da bactéria à superfície é inferior a 20 nm, as forças que envolvem a ligação bactéria/superfície são potencializadas pela atração eletrostática ou repulsão, contribuindo no processo de adesão. Em distâncias inferiores a 1,5 nm ocorrem interações específicas que reduzem essa distância, levando a uma adesão irreversível. Estruturas e compostos como flagelo, fímbria, pili e polímeros de polissacarídeos (glicocálix) estão envolvidos no ancoramento das bactérias à superfície (BOWER et al., 1996). O glicocálix suporta a formação de biofilmes, sendo produzido somente após a adesão superficial, fornecendo condições para adesão do peptidoglicano das bactérias gram-positivas e da parte externa da membrana externa das gram-negativas (ZOTTOLA, 1994, 1997).

Uma segunda teoria para o processo de adesão sugere a existência de cinco etapas diferenciadas, na seguinte ordem: transporte de nutrientes e matéria orgânica e inorgânica para a superfície sólida, formação de uma camada de nutrientes orgânicos e inorgânicos, adesão dos microrganismos à superfície e crescimento celular, seguido de intensa atividade metabólica no biofilme (CHARACKLIS e COOKSEY, 1983; ZOTTOLA, 1994, 1997).

Uma terceira teoria propõe que a adesão se divide em três etapas: fixação, consolidação e, por último, a colonização da bactéria na superfície (Notermans et al., 1991, citados por ZOTTOLA, 1994, 1997). A consolidação é um estágio importante, pois os microrganismos produzem nesta fase material extracelular que propicia a fixação das células à superfície. Nesse ponto, as células fixadas não são removidas por rinsagem (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982).

Durante o estágio de colonização, muitas mudanças podem ocorrer entre a microcolônia e a superfície. O complexo polissacarídico presente no glicocálix pode se ligar a íons metálicos, alterando a natureza química e física do biofilme; além disso, subprodutos do metabolismo celular, como ácidos orgânicos, podem ser encontrados na matriz e resultar em corrosão local (ZOTTOLA, 1994).

2.4. Fatores que influenciam a adesão

Fatores como características do microrganismo, do material aderente e do meio que envolve o microrganismo podem influenciar a adesão bacteriana (TROLLER, 1993). Geralmente, os esporos bacterianos aderem em maior número que células vegetativas, provavelmente devido à sua alta hidrofobicidade relativa (BOWER et al., 1996). A adesão de esporos de *Bacillus cereus* é de difícil controle pela indústria de laticínios, em razão, principalmente, da sua alta hidrofobicidade relativa, baixa carga superficial e morfologia (ANDERSSON et al., 1995).

A limitação de nutrientes altera o perfil da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* (COWELL et al., 1999). Estudos com este microrganismo têm mostrado que as células em biofilmes são fenotipicamente distintas das células

planctônicas (ELASRI e MILLER, 1999). A forma, a espécie bacteriana, a idade da cultura e a concentração do microrganismo podem afetar o processo de adesão. Bactérias gram-negativas, por exemplo, se aderem mais facilmente (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

No processo de adesão são importantes o tipo, a forma iônica e o tamanho da partícula do material. No que diz respeito ao meio, fatores como pH, concentração de sais orgânicos, compostos orgânicos, agitação, duração e temperatura de contato são importantes nesse processo (TROLLER, 1993).

A microtopografia da superfície pode aumentar ou diminuir a associação da bactéria à superfície (BOWER et al., 1996).

2.5. Microrganismos envolvidos na adesão bacteriana

Estudos têm mostrado que microrganismos alteradores e patogênicos podem aderir a superfícies que entram em contato com alimentos, causando sérios problemas de ordem econômica e de saúde pública (CRIADO et al., 1994). No grupo de microrganismos alteradores encontram-se: *Pseudomonas fragi* (SCHWACH e ZOTTOLA, 1982; ZOTTOLA, 1994; BLAKISTONE et al., 1996), *Pseudomonas aeruginosa* (COWELL et al., 1999; ELASRI e MILLER, 1999; GIBSON et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* (MOSTELLER e BISHOP, 1993; ZOTTOLA, 1997), *Micrococcus* sp. (CRIADO et al., 1994) e *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al., 1998). Entre os microrganismos patogênicos têm-se: *E coli* O157:H7, *Salmonella thyphimurium*, *Bacillus cereus* (BOWER et al., 1996; SMITH e FRATAMICO, 1995), *Listeria monocitogenes* (BOWER et al., 1996; ZOTOLLA, 1997; MOSTELLER e BISHOP, 1993), *Yersinia enterocolitica* (MOSTELLER e BISHOP, 1993; ZOTOLLA, 1994), *Staphylococcus aureus* (CUNLIFE et al., 1999; GIBSON, 1999), *Clostridium perfringens* (ANDERSSON et al., 1995), *Aeromonas hydrophila* (ASSANTA et al., 1998; BAL'A et al., 1998).

A capacidade desses microrganismos aderidos a uma superfície de se desprenderem e contaminarem os alimentos que passam por esta superfície é denominada potencial de biotransferência (HOOD e ZOTTOLA, 1995).

O *Staphylococcus aureus* apresenta-se na forma de cocos gram-

positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*, é uma bactéria mesofílica apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 48°C, e produz enterotoxina em temperatura de 10°C a 46°C, com ótimo entre 40°C e 45°C (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Os surtos de intoxicação alimentar são provocados pela ingestão de alimentos contaminados com a toxina pré-formada. A produção de enterotoxina se dá durante o crescimento da bactéria no alimento em faixa de temperatura que possibilite esta produção (ELEY, 1996). Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será o tempo necessário para produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente no alimento em quatro a seis horas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

São bactérias tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados potenciais veículos para elas. A produção de toxina ocorre até valores de 10% de NaCl (BROCK, 1994). Crescem em faixa de pH de 4 a 9,8, apresentando como ótimo pH entre 6 e 7 (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Com relação à atividade de água (Aa), o *S. aureus* apresenta capacidade de crescer em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halofílicas, crescendo em Aa igual a 0,86 (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Sobrevive em partículas de poeira ou outros objetos inanimados (BROCK, 1994).

Entre as doenças causadas por *S. aureus*, a intoxicação alimentar apresenta elevada freqüência em todo o mundo, ocorrendo quando há intensa proliferação da bactéria no alimento, atingindo populações na ordem de 10^5 a 10^6 UFC/g ou mL (FRANCO e LANDGRAF, 1996). É o maior patógeno de humanos, causando uma gama de infecções, podendo ser encontrado como um microrganismo comensal em peles e cavidade nasal. Pode ser encontrado também no ar, leite, água, solo, esgoto (ELEY, 1996; FRANCO e LANDGRAF, 1996) e em qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o portador assintomático. Aproximadamente, 15 a 20% dos *S. aureus* isolados de humanos são enteropatogênicos, tornando o manipulador de alimentos uma possível fonte de contaminação (ELEY, 1996; FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A *Escherichia coli* apresenta-se na forma de bacilos não-esporulantes, gram-negativos, e faz parte da flora normal do intestino grosso de humanos e

animais de sangue quente, sendo algumas cepas não-patogênicas (HOLT et al, 1994; FRANCO e LANDGRAF, 1996; ELEY, 1996). Algumas cepas podem produzir infecções de origem alimentar e, ocasionalmente, septicemia e meningite (ELEY, 1996).

O significado da presença de *E. coli* em alimentos deve ser avaliado sob dois ângulos. Primeiramente, por se tratar de uma enterobactéria, indica que esse alimento tem contaminação microbiana de origem fecal, indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Outro aspecto é a existência de diversas cepas patogênicas para o homem (ELEY, 1996).

Evidências sugerem que *E. coli* pode multiplicar-se em alimentos, atingindo populações na ordem de 10^5 a 10^7 UFC/g; nestas condições, pode causar infecções (ELEY, 1996).

2.6. Descontaminação de microrganismos aderidos

2.6.1. Descontaminação mecânica

O primeiro passo na limpeza de superfícies que entram em contato com alimentos é a remoção física de resíduos orgânicos e minerais. Esse processo pode envolver escovação ou raspagem, para desalojar as bactérias aderidas. No caso de tubulações fechadas, pode ser empregada circulação turbulenta de soluções para remoção de bactérias por ação hidrodinâmica. A microtopografia da superfície pode complicar esse procedimento, uma vez que a presença de fendas e outras imperfeições da superfície pode proteger as células aderidas (BOWER et al., 1996).

2.6.2. Descontaminação por agentes químicos

Incluem-se entre os agentes químicos líquidos usados no controle de processos de adesão microbiana na indústria de alimentos os compostos clorados, iodados, e de quaternário de amônia, a clorhexidina, o ácido peracético, o formaldeído, o álcool 70°GL e o peróxido de hidrogênio

(ANDRADE e MACÊDO, 1996). O uso de peróxido de hidrogênio é considerado procedimento-padrão na descontaminação de embalagens sensíveis à descontaminação por aquecimento (FLÜCKIGER, 1995).

Gases como óxido de etileno, óxido de propileno, betapropiolactona, formaldeído e brometo de metila são também apontados como possíveis alternativas para a descontaminação de embalagens (TOLEDO, 1975; RAYNAUD e LELIEVELD, 1997).

Na descontaminação de materiais para embalagens, podem ser citadas como características requeridas para a escolha de sanificantes químicos: a atividade como esporicida, a compatibilidade com o material da embalagem, a facilidade de remoção do material em que foi empregado, os resíduos deixados, a inocuidade ao consumidor, ao meio e ao manipulador, não-alteração da qualidade do produto, a aplicação segura e a viabilidade econômica (TOLEDO, 1975; FLÜCKIGER, 1995).

2.6.3. Descontaminação por agentes físicos

O calor nas formas de água quente, ar quente, vapor e radiações ionizantes, como a radiação gama, e não-ionizantes é empregado na remoção de microrganismos aderidos a superfícies (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Como exemplo de radiação não-ionizante tem-se a radiação ultravioleta, que é amplamente empregada na indústria de alimentos para descontaminação de embalagens e de algumas superfícies de equipamentos, ambientes e água.

2.7. Radiação Ultravioleta

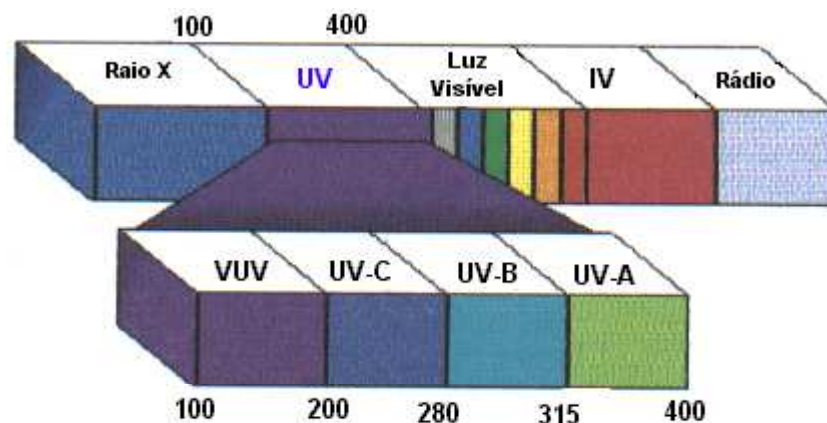
2.7.1. Espectro da radiação ultravioleta

Ultravioleta se refere a toda radiação eletromagnética com comprimento de onda na faixa de 100 a 400 nm, ou frequências entre $7,5 \times 10^{14}$ e 3×10^{16} Hz. A radiação ultravioleta pode ser dividida em três categorias, com base no comprimento de onda: UV-A, UV-B e UV-C (ELASRI e MILLER, 1999). A radiação UV-A, que apresenta comprimento de onda na faixa de 320

a 400 nm, é utilizada para obtenção de luz negra que causa alguma fluorescência em objetos, resultando em brilho; é também usada para o bronzeamento de pele. Esta radiação causa danos indiretos ao DNA bacteriano, devido à formação de compostos oxigenados reativos, como H_2O_2 e O_2^- . Estes compostos, formados pela fotoxidação do O_2 , causam quebra na fita de DNA. A UV-B, com comprimento de onda na faixa de 290 a 320, é absorvida diretamente pelo DNA e altera o nucleotídeo pela formação de dímeros de ciclobutano pirimidina e outros fotoprodutos (Friedberg et al., 1995, citados por ELASRI e MILLER, 1999). A terceira categoria é a radiação UV-C, que apresenta maior efeito bactericida, com comprimento de onda entre 200 e 280 nm.

Na Figura 1 têm-se a distribuição espectral e a localização da radiação ultravioleta no espectro eletromagnético.

Os comprimentos de onda de 100 a 200 nm são usualmente denominados vácuo ultravioleta, não apresentando eficiência germicida devido à absorção pelo ar. Comprimentos de onda em torno de 254 nm são considerados danosos às células microbianas, sendo por isso empregados na redução da microbiota de superfície, de líquidos e do ar (TRAMPLIM e CAPERS, 1992).



Fonte: International Ultraviolet Association – IUVA (2000)

Figura 1 - Localização da radiação ultravioleta no espectro eletromagnético.

2.7.2. Mecanismo de ação da radiação ultravioleta

O espectro da radiação UV compreendido entre 200 e 300 nm é de grande interesse, sendo esta região denominada abiótica (SHECHMEISTER, 1991). A atividade germicida é observada na faixa de 200 a 280 nm, com pico de emissão em 254 nm (MAHARAJ et al., 1999; STERMER et al., 1987). No entanto, ocorre severo declínio na sua eficiência germicida entre 290 e 300 nm, não apresentando ação acima de 300 nm (BACHMANN, 1975)

É denominada radiação não-ionizante, uma vez que as moléculas orgânicas requerem comprimento de onda inferior a 180 nm para se ionizarem, podendo-se, desse modo, descartar como efeito da radiação UV a ionização de materiais biológicos (SHECHMEISTER, 1991).

A ação da radiação ultravioleta sobre os microrganismos está relacionada com o comprimento de onda e a absorção deste pelos ácidos nucleicos ou constituintes dos ácidos nucleicos (BACHMANN, 1975, SHECHMEISTER, 1991; FLÜCKIGER, 1995). Efeitos mutagênicos e retardo na divisão celular são causados por efeito da radiação UV nos ácidos nucleicos,

sendo as bases pirimidínicas mais sensíveis à radiação UV que as bases púricas, considerando-se a transformação fotoquímica das bases pirimidínicas responsáveis pelos maiores efeitos mutagênicos e letais (SHECHMEISTER, 1991; KUO et al., 1997). A redução microbiana resultante do uso de radiação UV é explicada por meio da formação de ligações entre pirimidinas sucessivas na fita de DNA, formando dímeros (Figura 2).

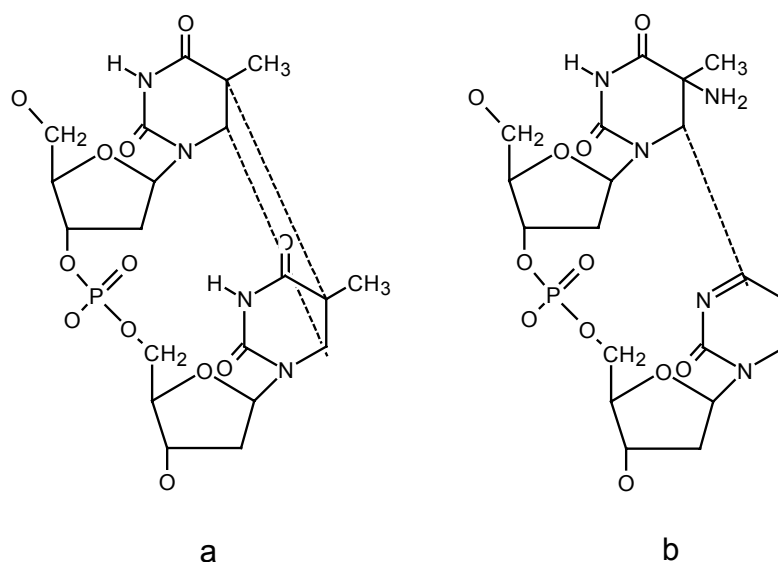


Figura 2 - a) Formação de dímero entre duas timinas adjacentes e b) formação de dímero entre timina e citosina.

Assim, os danos aos materiais genéticos DNA e RNA, em decorrência da absorção da radiação ultravioleta, são considerados os principais mecanismos de inativação microbiana, uma vez que bloqueiam a replicação celular (HO et al., 1998; SIZER e BALASUBRAMANIAN, 1999; MAHARAJ et al., 1999). Os fotoprodutos formados pela radiação ultravioleta influenciam a integridade da estrutura do DNA (SHECHMEISTER, 1991; STANNARD et al., 1985). Em esporos bacterianos, o fotoproduto predominante é o 5-timinil-5-6-dihidrotimina, que apresenta efeito letal. Além da formação de dímeros de pirimidina, outros danos podem, também, contribuir para a desnaturação do DNA sob irradiação (SHECHMEISTER, 1991).

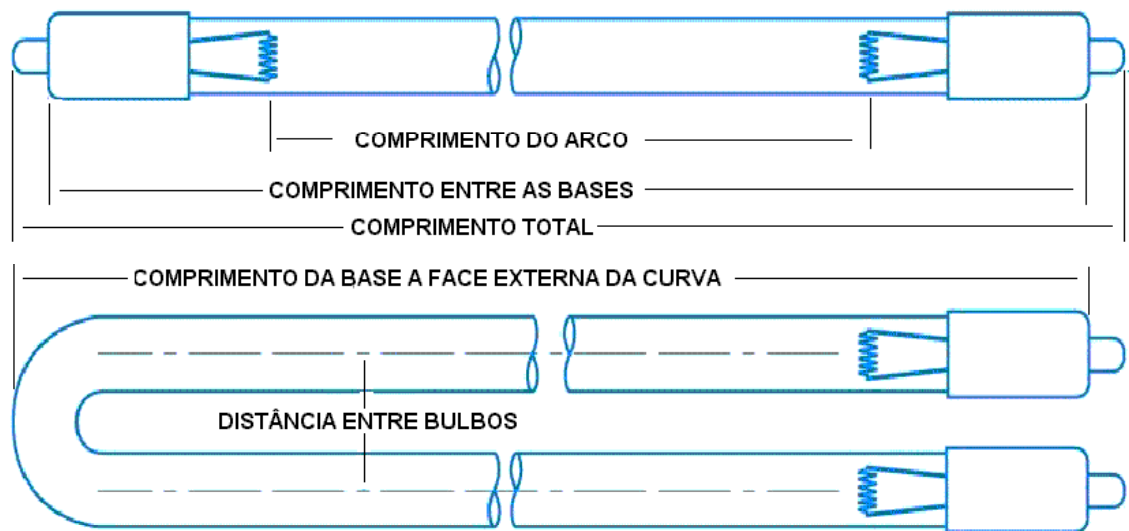
Alguns microrganismos possuem sistemas de enzimas que podem reparar as alterações do DNA, reconstituindo o material genético; esta reconstituição confere viabilidade à célula (FIKSDAL e TRYLAND, 1999; ARRAGE et al., 1993). Os microrganismos são inativados quando os danos excedem as suas capacidades de reparo (SHECHMEISTER, 1991).

Vários fatores influenciam a sensibilidade bacteriana à radiação ultravioleta, podendo ser destacados como mais importantes o pH e os diferentes estágios do ciclo de crescimento bacteriano, apresentando maior

atividade durante a fase logarítmica de crescimento. Os esporos apresentam cerca de duas vezes mais resistência à radiação que células vegetativas (ARRAGE et al., 1993). Esporos de *Bacillus subtilis* apresentam de 10 a 20 vezes mais resistência à radiação UV, quando comparados com as células vegetativas deste mesmo microrganismo (SLIEMAN e NICHOLSON, 2000). A morfologia, fisiologia, pigmentação e fototaxia podem ser responsáveis pela resistência de determinados microrganismos à radiação ultravioleta (ARRAGE et al., 1993).

2.7.3. Lâmpadas germicidas

O método mais prático de se gerar radiação ultravioleta é por meio da passagem de descarga elétrica por vapores de mercúrio em baixa pressão acomodados dentro de um tubo de vidro especial (SHECHMEISTER, 1991; FLÜCKIGER, 1995; STERMER et al., 1987), que é conhecido comercialmente por lâmpada germicida (Figura 3). O princípio de toda lâmpada germicida é o mesmo: um fluxo de elétrons entre os eletrodos que ionizam os vapores de mercúrio. O princípio básico das lâmpadas fluorescentes é o mesmo da produção de energia UV. A diferença entre os dois tipos de lâmpadas é que o bulbo de lâmpadas fluorescentes é revestido com compostos fosforados, que convertem a radiação ultravioleta em luz visível. O vidro empregado na confecção do bulbo das lâmpadas fluorescentes filtra a saída de toda a radiação ultravioleta. Já nas lâmpadas germicidas não se tem a presença de compostos fosforados no bulbo, e este é constituído de um vidro especial que permite a transmissão da radiação UV gerada pelo mercúrio mais a energia visível (SHECHMEISTER, 1991).



Fonte: Primarc UV Technology (2000)

Figura 3 - Exemplos de lâmpadas germicidas.

A inativação dos microrganismos (K) é resultado da exposição à radiação ultravioleta, sendo expressa como um produto da intensidade (I) da energia germicida e do tempo (t); desse modo, tem-se que $K = I \times t$ (SHECHMEISTER, 1991; FLÜCKIGER, 1995; BACHMANN, 1975). Em condições práticas, o tempo de exposição é diferente para cada situação (SHECHMEISTER, 1991). Por exemplo, observa-se na prática que o tempo usado para redução da microbiota em polietileno, para embalagem de leite tipo C, é de aproximadamente dois segundos.

Nas lâmpadas germicidas convencionais, de baixa pressão de vapores de mercúrio, a intensidade da radiação UV está na faixa de $10 \mu\text{Wcm}^{-2}$ a $1.000 \mu\text{Wcm}^{-2}$. Já em lâmpadas de alta pressão a intensidade de emissão da RUV está na faixa de 100.000 a $1.000.000 \mu\text{Wcm}^{-2}$ (BACHMANN, 1975).

A eficiência operacional das lâmpadas germicidas depende da temperatura do meio e da movimentação do ar. As lâmpadas germicidas comerciais são desenvolvidas, geralmente, para trabalhar a 27°C .

A distância da fonte geradora de radiação ultravioleta à superfície de atuação é um outro fator a ser considerado, uma vez que a intensidade luminosa apresenta correlação inversa com o quadrado da distância ($I = 1/d^2$) (SHECHMEISTER, 1991).

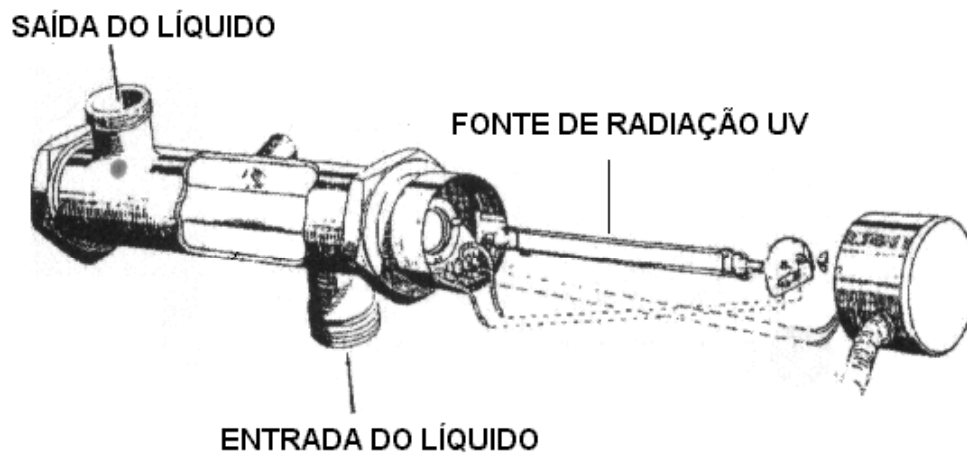
Na indústria de alimentos, a utilização de radiação ultravioleta apresenta várias vantagens, quando comparada com os desinfetantes químicos, visto que esta radiação não deixa resíduos nas superfícies (BACHMANN, 1975; WONG et al., 1998), é um processo a seco, que não necessita de aquecimento, apresenta simples emprego e o sistema é de pequeno custo efetivo para a esterilização de pequenas áreas, não apresentando restrição legal, como é o caso de alguns agentes químicos e de radiação de alta energia (BACHMANN, 1975).

2.7.4. Uso de radiação ultravioleta na redução da microbiota de líquidos

A radiação UV é efetiva na redução de microrganismos presentes em líquidos translúcidos. É empregada em sistemas de tratamento de água (HUANG E TOLEDO, 1982; BACHMANN, 1975; HO et al., 1998; BLATCHLEY e ISAAC, 1992; KUO e SMITH, 1996; ANTOPOL e ELLNER, 1979; DIZER et al., 1993), no envasamento asséptico de alimentos (FLÜCKIGER, 1995), na pasteurização de sucos (SIZER e BALASUBRAMANIAM, 1999) e no tratamento de águas residuárias (HO et al., 1998; DIZER et al., 1993), obtendo-se redução de 95% dos coliformes totais com 65.000 a 70.000 μWcm^{-2} , por segundo (HO et al., 1998), sendo uma alternativa ao uso de desinfetantes clorados (HO et al., 1998; FIKSDAL e TRYLAND, 1999). FIKSDAL e TRYLAND obtiveram redução de 95% de células de *E. coli*, em suspensão, empregando moderadas doses de RUV, isto é, 26.000 e 48.000 μWcm^{-2} por segundo; já com o emprego de 940.000 μWcm^{-2} , por segundo, obteve-se 99,9995% de redução.

No entanto, a intensidade da radiação UV diminui 50% a 5 cm de profundidade em água límpida e penetra de 1 a 2 mm em leite (BANWART, 1989).

Um modelo de equipamento utilizado na pasteurização de suco de frutas é mostrado na Figura 4. Por meio de fluxo turbulento, o suco é irradiado. A espessura da lâmina de suco é de aproximadamente 1 mm, para que ocorra a absorção de 90% da radiação UV (SIZER e BALASUBRAMANIAM, 1999).



Fonte: SIZER e BALASUBRAMANIAM (1999)

Figura 4 - Equipamento para a pasteurização de suco de laranja.

2.7.5. Uso de radiação ultravioleta para redução da microbiota de alimentos sólidos

A radiação UV tem sido empregada para redução de microrganismos termofílicos em açúcar cristal (SHECHMEISTER, 1991) e em indústrias de sorvetes e de processamento de vegetais (HUANG e TOLEDO, 1982; BACHAMANN, 1975; HO et al., 1998; BLATCHLEY, 1992; KUO e SMITH, 1996; ANTOPOL e ELLNER, 1979).

Outras aplicações da radiação UV são observadas no processamento de carnes vermelhas e peixes; em carne vermelha obteve-se 97% de redução, com o emprego de $275 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por 60 segundos. Reduções de 2 a 3 ciclos logarítmicos podem ser esperadas se a carne for irradiada com $275 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por 15 minutos antes do resfriamento e congelamento (STERMER et al., 1987). Em carcaças, músculos e pele de porcos, há relatos de 2 logaritmos de redução de microbiota na pele e 1,5 ciclo logarítmico em músculo, empregando $500 \mu\text{Wcm}^{-2}$ (WONG et al., 1998). Pesquisa mostra pequena redução da microbiota presente na superfície de carcaça de frangos; esta baixa redução provavelmente ocorre devido à rugosidade da superfície, o que dificulta a ação da radiação UV (WALLNER-PENDLETON et al., 1994). Em tomates, a

utilização desta radiação retarda o processo de senescência, reduzindo também a contaminação fúngica do fruto (MAHARAJ et al., 1999). A radiação UV é usada, ainda, no controle de microrganismos presentes na casca de ovos, sendo observada redução de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos de *Salmonella typhimurium*, presentes na casca de ovos, em exposição a $620 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por um minuto (KUO et al., 1997).

2.7.6. Uso de radiação ultravioleta para redução da microbiota da superfície de equipamentos e ambiente

A ação da radiação UV pode ser usada no controle microbiológico de ambientes de processamento de indústrias de laticínios (HUANG e TOLEDO, 1992). Essa importante aplicação refere-se à destruição de microrganismos presentes no ar, diminuindo a microbiota ambiental e protegendo os alimentos que estão sendo processados (SHECHMEISTER, 1991; BANWART, 1989; STERMER et al., 1987), ou que estão já processados em áreas de estocagem (STERMER et al., 1987).

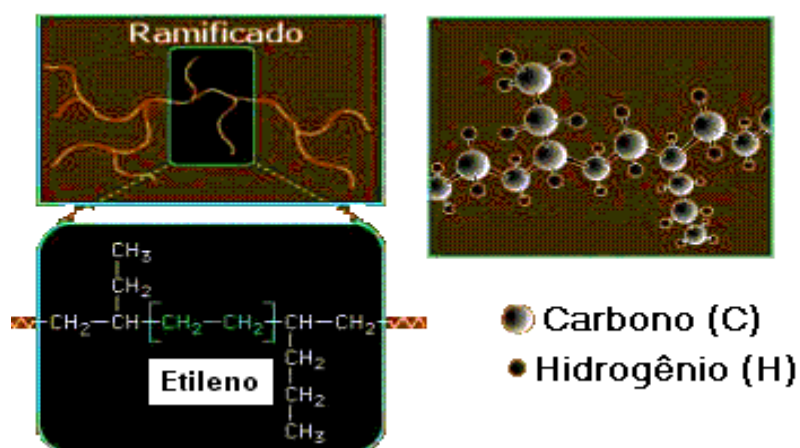
A utilização da UV em equipamentos empregados no processamento de alimentos se restringe à desinfecção de superfícies externas (WONG et al., 1998; SIZER e BALASUBRAMANIAN, 1999; YOUSEF e MARTH, 1988), sendo esta ação influenciada grandemente pela geometria e pelo tipo de superfície (YOUSEF e MARTH, 1988), bem como pela presença de partículas de alimentos ou substâncias que impeçam o acesso da radiação ultravioleta, o que resulta em proteção aos microrganismos (BANWART, 1989).

2.7.7. Uso de radiação ultravioleta para a redução da microrganismos em embalagens

A procura por materiais e sistemas mais eficientes para o empacotamento coincide com o aumento de pesquisas sobre materiais plásticos adequados ao envase de produtos alimentícios. Podem ser citados como materiais plásticos empregados pela indústria alimentícia o polipropileno, o policarbonato, o poli(cloreto de vinila), o poliestireno e o polietileno de alta e

baixa densidade, sendo este último empregado na indústria de laticínios para o envase de leite fluido.

O polietileno é um polímero termoplástico formado pela aglomeração de unidades monoméricas derivadas do petróleo, denominadas etileno (Figura 5).



Fonte: UFSC/Departamento de Química.

Figura 5 – Estrutura química e espacial do polietileno de baixa densidade.

O polietileno de baixa densidade (PEBD), LDPE (low density polyethylene), apresenta ponto de fusão em torno de 115°C, densidade na faixa de 0,91 a 0,94, índice de refração de 1,51 a 1,52, com alta resistência a substâncias ácidas e alcalinas, sendo um sólido com 50 a 60% de cristalinidade (BILLMEYER, 1984; MANO, 1991).

O impedimento espacial provocado pelas ramificações dificulta o “empilhamento” das cadeias poliméricas. Por esta razão, as forças intermoleculares que mantêm as cadeias poliméricas unidas tendem a ser mais fracas, tornando o PEBD bastante flexível.

Como aplicações típicas, pode-se citar o uso na fabricação de filmes plásticos e laminados para embalagens de produtos alimentícios líquidos e sólidos, filmes termoencolhíveis, filmes laminados e plastificados para produtos farmacêuticos e hospitalares, filmes para embalagens industriais e agrícolas,

utensílios domésticos, brinquedos, sacos para lixo, revestimento de fios e cabos, tubos e mangueiras (MANO, 1991).

Na década de setenta foi introduzida a embalagem de PEBD para leite fluido (ALVES e GARCIA, 1997). Devido a não-resistência dessas embalagens à esterilização pelo calor, novos métodos têm sido desenvolvidos para o controle da microbiota desses materiais sensíveis ao calor (TOLEDO, 1975; FLÜCKIGER, 1995).

A radiação UV tem sido empregada para redução da microbiota de superfícies de materiais utilizadas na embalagem de alimentos, seja em processos assépticos ou não (YOUSEF e MARTH, 1988; BANWART, 1989; HUANG e TOLEDO, 1982). No entanto, sua aplicação se estende a outras indústrias, como a farmacêutica e a química (BACHMANN, 1975).

A redução da microbiota de materiais para embalagem empregados em processo contínuo nas linhas de envase é um fator importante para manutenção das características microbiológicas do produto, aumentando assim sua vida-de-prateleira (BACHMANN, 1975; FLÜCKIGER, 1995; YOUSEF e MARTH, 1988). Estudos têm documentado a efetividade da radiação ultravioleta na morte de microrganismos contaminantes de uma variedade de materiais de superfície (ROWAN et al., 1999; SIZER e BALASUBRAMANIAN, 1999). Em testes efetuados com esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, observaram-se 3 a 4 reduções decimais, sendo o experimento conduzido nas seguintes condições: densidade do microrganismo de $1,4 \times 10^4$ UFC/cm², 10,5 cm de distância da fonte de radiação, dose de 30.000 μ Wcm⁻² e tempo de irradiação de 1 segundo (FLÜCKIGER, 1995).

O emprego de calor para a esterilização de alguns tipos de embalagem torna o processo caro. Por outro lado, alguns materiais não resistem ao tratamento com aquecimento, como é o caso das embalagens de polietileno empregadas no envase de leite tipo C, entre outros produtos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

3.1. Microrganismos

Com o objetivo de avaliar grupos microbianos, foram utilizados *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo bacilos Gram-negativos, e *Staphylococcus aureus*, cocos Gram-positivos, pertencente à família *Micrococcaceae*.

Os microrganismos empregados, *Escherichia coli* K12 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

3.2. Manutenção e ativação dos microrganismos e preparo das suspensões bacterianas

As culturas puras desses microrganismos foram mantidas sob refrigeração à temperatura de 6°C, em tubos de 13 x 100 mm, com capacidade para 8 mL, contendo 5 mL de meio semi-sólido Brain Heart Infusion – Biobrás (BHI).

A ativação das culturas de *Escherichia coli* K12 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi realizada através de três repiques sucessivos em caldo BHI à temperatura de 35°C por 24 horas. Efetuou-se a diluição do inóculo em tampão fosfato 0,31M em pH 7,0 ± 0,1, esterilizado a 121°C/15 minutos. Alíquotas dessas diluições foram plaqueadas em profundidade em ágar para contagem total (PCA). As placas foram incubadas à temperatura de 35°C por

24 horas. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

As suspensões com concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 UFC/mL foram obtidas adicionando-se a 1.000 mL de tampão fosfato esterilizado, em pH $7,0 \pm 0,1$, os volumes de 0,1; 1; e 10 mL da cultura ativada em BHI.

3.3. Avaliação da adesão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 em superfície de polietileno de baixa densidade

3.3.1. Adesão dos microrganismos no polietileno

As superfícies internas das embalagens de polietileno de baixa densidade foram previamente sanificadas com álcool 70°GL e expostas à radiação ultravioleta com comprimento de onda de 253 nm, por um minuto.

Nessa etapa, empregaram-se 72 embalagens de polietileno de baixa densidade com espessura de 700 μm e área interna de 630 cm^2 (22,5 x 28 cm), apresentando-se em forma de sacos com capacidade para 1.000 mL, cedidas pelo laticínio da Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE). A estas embalagens adicionaram-se 1.000 mL da suspensão bacteriana preparada como descrito no item 3.2. Em seguida à adição das suspensões, as embalagens foram seladas termicamente (Seladora TecnoB modelo S300) e incubadas em estufas tipo BOD (modelo 50A14) às temperaturas de 8°C e 18°C por 12 horas, para permitir a adesão bacteriana

3.3.2. Determinação do número de células aderidas

Após 12 horas de incubação nas temperaturas de 8 e 18°C, as embalagens passaram pelos procedimentos descritos a seguir.

O tampão empregado na inoculação da embalagem foi escoado e a esta embalagem adicionaram-se 1.000 mL de tampão fosfato esterilizado, pH $7,0 \pm 0,1$, sendo a embalagem deixada em repouso por um minuto, para retirada das células planctônicas, ou seja, células que não aderiram à superfície do polietileno. Depois de escoado o tampão, a embalagem foi

rinsada, empregando agitação manual vigorosa durante 90 segundos, com 100 mL de tampão fosfato esterilizado, para retirada das células sésseis, isto é, células aderidas à superfície do polietileno.

Após a rinsagem, os tampões contendo as células sésseis foram diluídos conforme necessário e alíquotas destas diluições foram plaqueadas, em profundidade, em PCA. As placas de Petri, após solidificação, foram invertidas e incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas, para determinação do número de células aderidas à embalagem. Os resultados foram expressos em UFC/cm².

3.4. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na redução do número de células de *Staphylococcus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 aderidas intencionalmente ao polietileno

Nesta fase do experimento, a adesão ocorreu à temperatura de 18°C, sendo empregadas três embalagens para cada repetição; destas, uma foi utilizada para determinação da adesão e as outras duas empregadas na determinação do número de células aderidas que resistiram à exposição à radiação ultravioleta.

3.4.1. Modelo para irradiação das embalagens

Para simular condições da indústria, foi elaborado um modelo que reproduz as características e condições do sistema de irradiação com radiação UV da máquina de envase de líquidos, empregada no laticínio da FUNARBE para empacotamento de leite tipo C (Figura 6).

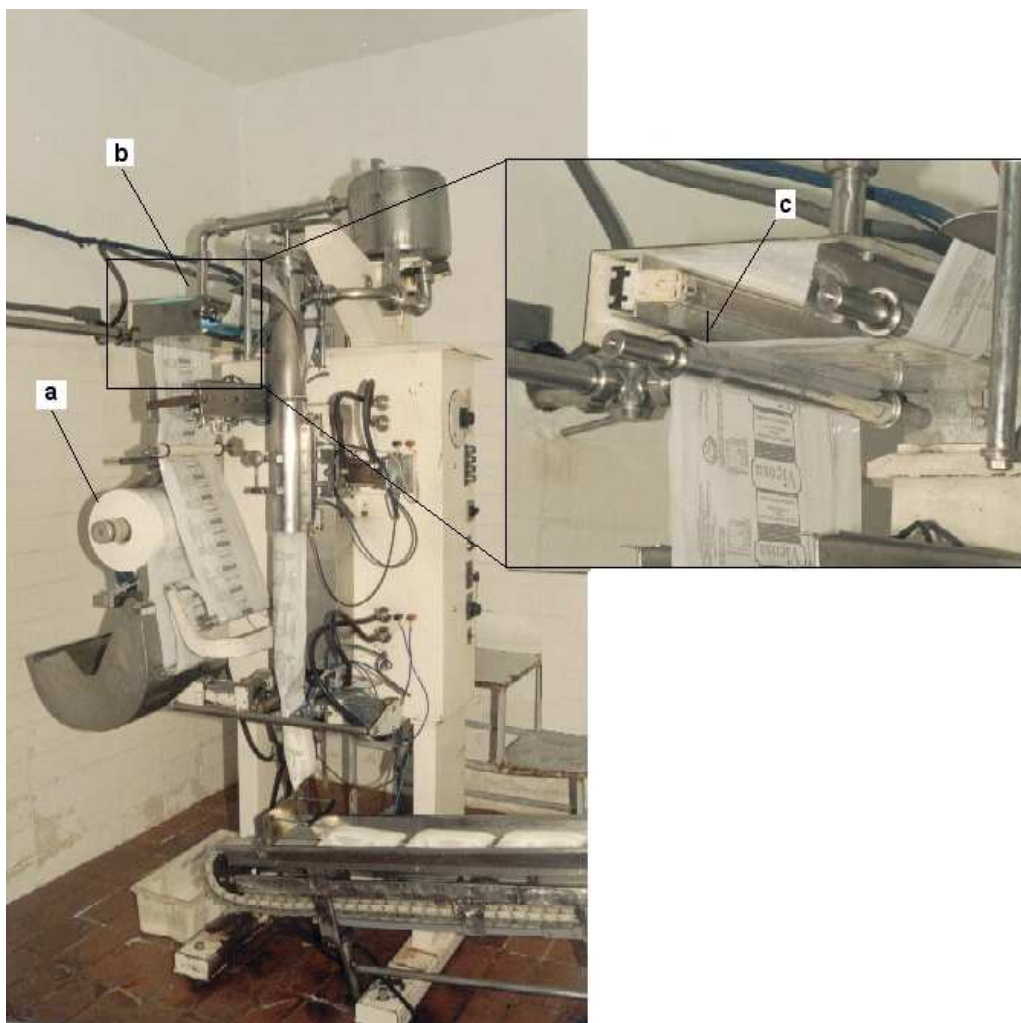


Figura 6 - Máquina de envase de líquidos em funcionamento: a) bobina de PEBD; b) localização da fonte de irradiação das embalagens; c) disposição da lâmpada de radiação UV a 2 cm do PEBD.

O modelo foi construído em chapa galvanizada, apresentando as seguintes dimensões: 10 x 25 x 50 cm (Figura 7). Em seu interior, tem-se uma lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 253 nm, 15 W de potência, ligada à rede elétrica (127 V) por meio de um reator de 20 W e um *starter*. A lâmpada está situada a 2 cm acima da canaleta por onde corre o suporte, contendo a embalagem a ser irradiada (Figura 8).

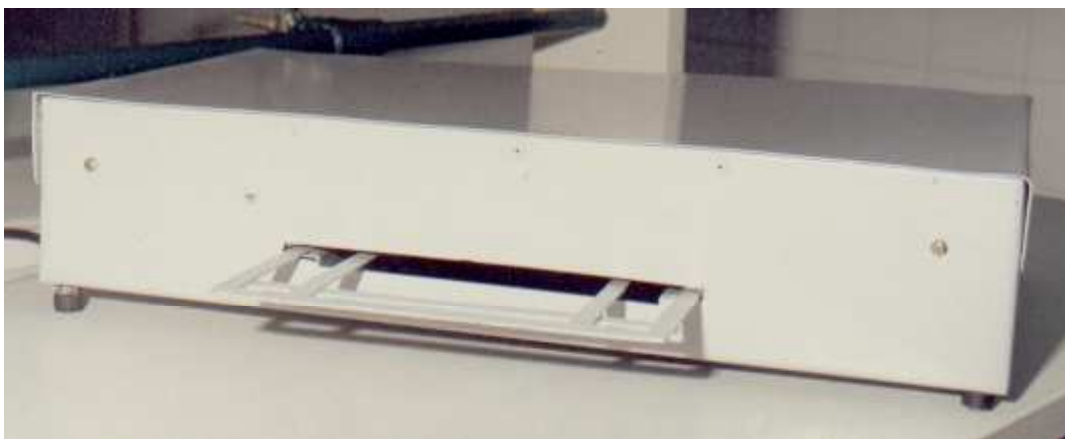


Figura 7 - Modelo para exposição das embalagens à radiação UV.



Figura 8 – Modelo aberto para exposição das embalagens à radiação UV, onde se visualiza a canaleta por onde corre o suporte com a embalagem.

3.4.2. Adesão dos microrganismos à superfície do polietileno e determinação do número de células aderidas

Nesta etapa, empregaram-se os procedimentos de adesão descritos no item 3.3.1. Na determinação do número de células, os procedimentos foram os descritos no item 3.3.2.

3.4.3. Exposição das embalagem contendo as células aderidas à radiação ultravioleta

Após a adesão dos microrganismos na embalagem de polietileno, o tampão de inoculação foi retirado. Em seguida, adicionaram-se 1.000 mL de tampão fosfato esterilizado, pH $7,0 \pm 0,1$ à embalagem, ficando esta em repouso durante um minuto, para retirada das células planctônicas. Decorrido o tempo, o tampão foi escoado e as superfícies internas da embalagem foram submetidas à radiação UV por aproximadamente dois segundos, empregando-se o modelo descrito no item 3.4.1. Antes do início do experimento a lâmpada permaneceu ligada por 30 minutos, para estabilização da emissão da luz. Após esse intervalo de tempo, a parte interna das embalagens era submetida à exposição à radiação UV.

3.4.4. Determinação do número de células que resistiram à exposição à radiação ultravioleta

Foram adicionados 100 mL de tampão fosfato esterilizado, em pH $7,0 \pm 0,1$, às embalagens irradiadas e agitou-se vigorosamente durante 90 segundos, para retirada das células que resistiram ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Após a rinsagem, os tampões foram diluídos conforme necessário, sendo estas diluições plaqueadas em profundidade, em PCA, e incubadas a 35°C por 24 horas. Os resultados foram expressos em UFC/cm².

3.4.5. Determinação da eficiência da radiação ultravioleta

A determinação da eficiência da radiação UV foi medida por meio de Reduções Decimais (RD), empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{RD} = \text{Log}n_0 - \text{Log}n_1$$

em que

n_0 = número de UFC aderidas ao polietileno por cm² antes do uso da

radiação ultravioleta; e
 n_1 = número de UFC aderidas ao polietileno por cm^2 após o uso da radiação ultravioleta.

Os valores D foram calculados empregando-se os valores de reduções decimais do seguinte modo:

$$\text{Valor D} = t / \text{RD}$$

em que

t = tempo de exposição à radiação UV; e

RD = reduções decimais.

3.5. Influência da redução na intensidade da radiação ultravioleta sobre a eficiência bactericida

A intensidade da radiação ultravioleta emitida pela lâmpada foi determinada a cada 50 horas, até completar o total de 1.500 horas de uso. Empregou-se para essas medidas um medidor de exposição Optical Associates Inc (OAI), modelo 354, apresentando medida de tempo igual a 1/100 segundos, sensibilidade de $10 \mu\text{Wcm}^{-2}$, potência de $100.000 \mu\text{Wcm}^{-2}$ e resposta espectral de pico em comprimento de onda igual a 365 nm. Os resultados das leituras do medidor foram recalculados para faixa de comprimento de onda de 240 a 260 nm, empregando a seguinte fórmula:

$$L_{240 \text{ a } 260} = L_{365} \times 0,6$$

em que

$L_{240 \text{ a } 260}$ = leitura na faixa de 240 a 260 nm;

L_{365} = leitura feita pelo medidor a 365 nm; e

0,6 = fator de transformação da leitura a 365 nm para a faixa de 240 a 260 nm, determinado pela curva de calibração do sensor.

Os resultados foram expressos em μWcm^{-2} . Determinou-se a eficiência bactericida da lâmpada em três diferentes tempos: tempo inicial (T_{70}), após 800 horas de uso (T_{800}) e com 1.500 horas de uso (T_{1500}). Nesta determinação foram empregados os procedimentos descritos no item 3.4.

3.6. Avaliação da radiação ultravioleta em condições de uso

Nesta fase, determinou-se a contaminação inicial por aeróbios mesófilos nas embalagens, empregando a técnica de Número Mais Provável (NMP), de acordo com metodologia descrita por GREENBERG et al. (1992). Foram analisadas, ao acaso, amostras de polietileno de baixa densidade provenientes de três bobinas, antes e após a exposição à radiação UV. De cada bobina foram analisados 3.780 cm^2 , referentes à área de seis embalagens com 630 cm^2 e capacidade para 1.000 mL. Destas, três embalagens não foram expostas à radiação UV e as outras três foram expostas à radiação UV em condições de uso no laticínios da FUNARBE.

Para retirada das células presentes na superfície interna, adicionaram-se 100 mL de tampão fosfato esterilizado, pH 7. A rinsagem foi efetuada através de agitação manual vigorosa por 90 segundos.

Após a rinsagem, procedeu-se à diluição dessa solução e posterior distribuição em três séries de cinco tubos (18 x 150 mm) de ensaio, com capacidade para 15 mL, contendo 10 mL de caldo BHI; a primeira série de tubos apresentava concentração dupla do meio de cultura e as demais séries, concentração simples. Foram utilizados volumes de 10, 1,0 e 0,1 mL da solução de rinsagem das embalagens. As séries de tubos foram levadas à incubação em estufa a 35°C por 24 horas.

De posse da combinação formada pelo número de tubos positivos em cada diluição, e com o auxílio de tabela apropriada, determinaram-se os valores de NMP/100 mL, correspondentes aos 630 cm^2 da superfície interna da embalagem, com 95% de probabilidade.

3.7. Microtopografia da superfície de polietileno de baixa densidade

As imagens da microtopografia da superfície do polietileno empregado neste experimento foram realizadas no Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

Empregou-se um microscópio de força atômica (MFA) da marca Digital Instruments com a técnica “taping mode”. Nesta técnica, uma ponta, com raio de curvatura entre 5 e 10 nm, é conectada a um oscilador piezoelétrico, sendo forçada a vibrar perto de sua frequência de ressonância, tocando a superfície da amostra cerca de 500 vezes por ponto de medida. As medidas de alterações na frequência de vibração, quando a altura da amostra varia, são traduzidas por software em variação de altura, produzindo a imagem da amostra. Esta técnica permite obter alta resolução espacial; como a ponta não fica todo o tempo em contato com a amostra, o risco de deformação da amostra pela ponta é minimizado (STRAUSSER e HEATON, 1994).

3.8. Análise dos resultados

Na avaliação da adesão, empregou-se o delineamento em parcelas subdivididas, com duas espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12) na parcela, temperatura de adesão em dois níveis (8 e 18°C) na subparcela e concentração inicial do inóculo em três níveis (10^4 , 10^5 e 10^6 UFC/mL) na subsubparcela, com três repetições. As análises de variância foram realizadas utilizando-se procedimentos do programa Statistical Analysis System - SAS (1988).

No estudo da exposição das embalagens contendo as células aderidas à radiação ultravioleta, realizou-se análise de regressão dos valores experimentais, testando o modelo de 1º grau. Utilizou-se estatística descritiva para comparar os valores.

Empregou-se análise descritiva para avaliar os resultados obtidos na fase de quantificação da contaminação inicial das embalagens de polietileno, na eficiência da radiação UV nas embalagens sob condições de uso e na influência da redução na intensidade da radiação UV sobre a eficiência

bactericida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos morfológicos dos microrganismos

A morfologia, o agrupamento e a resposta à coloração de Gram dos microrganismos usados no experimento foram confirmados por microscopia óptica. As células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se apresentaram em forma de cocos, gram-positivos, isolados, em díade, em tríade ou em cachos; as de *Escherichia coli* K12 se apresentaram na forma de bacilos isolados, gram-negativos.

4.2. Adesão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em polietileno de baixa densidade

Nos Quadros 1 e 2, observa-se que *S. aureus* e *E. coli* apresentaram capacidade de aderir ao polietileno de baixa densidade em diferentes temperaturas de adesão e em diferentes números iniciais de células.

Dependendo do número inicial de microrganismos na suspensão, os percentuais de adesão para *S. aureus* variaram de 0,009 a 0,106 a 8°C e de 0,036 a 0,107 a 18°C. Para *E. coli*, os valores percentuais de adesão variaram de 0,001 a 0,006 a 8°C e de 0,002 a 0,028 a 18°C.

Quadro 1 - Percentuais e UFC/cm² de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidos a 8 e 18°C, em polietileno de baixa densidade, em função do logaritmo do número inicial (UFC/mL) na suspensão. Média de três repetições

Logaritmo do Número Inicial	8°C		18°C	
	UFC/cm ²	Percentual	UFC/cm ²	Percentual
5	2,4x10 ¹	0,017	5,4x10 ¹	0,038
6	1,2x10 ²	0,009	5,1x10 ²	0,036
7	1,6x10 ⁴	0,106	1,5x10 ⁴	0,107

Quadro 2- Percentuais e UFC/cm² de *Escherichia coli* K12 aderidos, a 8 e 18°C, em polietileno de baixa densidade, em função do logaritmo do

número inicial (UFC/mL) na suspensão. Média de três repetições

Logaritmo do Número inicial	8°C		18°C	
	UFC/cm ²	Percentual	UFC/cm ²	Percentual
5	1,1x10 ¹	0,006	3,0x10 ⁰	0,007
6	2,1x10 ¹	0,001	3,3x10 ¹	0,002
7	2,3x10 ²	0,001	5,6x10 ³	0,028

Os valores de adesão ao polietileno encontrados variaram de $2,4 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^4$ UFC/cm² a 8°C e de $5,4 \times 10^1$ a $1,5 \times 10^4$ a 18°C, para *S. aureus*. Para *E. coli*, os valores de adesão variaram de $1,1 \times 10^1$ a $2,3 \times 10^2$ a 8°C e de $3,0 \times 10^0$ a $5,6 \times 10^3$ a 18°C. Os números de células aderidas por cm² não caracterizam um processo de formação de biofilme, já que para isso os valores deveriam estar entre 10^6 e 10^7 UFC/cm². Em pesquisa com adesão de células de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável AISI 304, a partir do número inicial de 10^6 UFC/mL em MRS, após 10 horas de incubação a 30°C, obteve-se $6,3 \times 10^5$ UFC/cm² (ANDRADE et al., 1998). Em outro experimento de adesão com esporos de *Bacillus cereus* em polietileno, obteve-se cerca de 10^5 e 10^6 UFC/cm², quando se utilizou como número inicial de células, 10^5 e 10^6 UFC/mL respectivamente, em incubação à temperatura de 8°C por 12 horas (REIS e ANDRADE, 1999). Os baixos valores encontrados no experimento com *S. aureus* e *E. coli*, quando comparados com os resultados anteriormente mencionados, podem ser explicados pelas diferentes características das superfícies de adesão e pelas diferenças existentes entre células vegetativas e esporos bacterianos. A adesão de esporos é facilitada pela sua alta hidrofobicidade, além da interação que ocorre entre os constituintes químicos da capa dos esporos com as superfícies.

O Quadro 3 mostra o resumo da análise de variância dos logaritmos decimais dos números de células de *S. aureus* e *E. coli* aderidas ao polietileno de baixa densidade à temperatura de 8 e 18°C, nas concentrações iniciais de 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL.

Quadro 3 – Resumo da análise de variância dos logaritmos decimais dos

números de UFC/cm² de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 aderidas em polietileno de baixa densidade, em diferentes temperaturas e números iniciais

FV	GL	QM
Microrganismo (M)	1	7,8027
Ea	4	0,1143
Contagem Inicial (CI)	2	17,9872
M*CI	2	0,2857*
Eb	8	0,0392
Temperatura (T)	1	2,5617*
M*CI*T	2	0,1056
Ec	15	0,2077
Total	35	

- Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Constataram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na temperatura de adesão e também nas interações entre microrganismos e as contagens iniciais na suspensão de adesão.

Nas Figuras 9 e 10 é mostrado o logaritmo de células aderidas em função do logaritmo do número inicial de células de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, às temperaturas de 8 e 18°C.

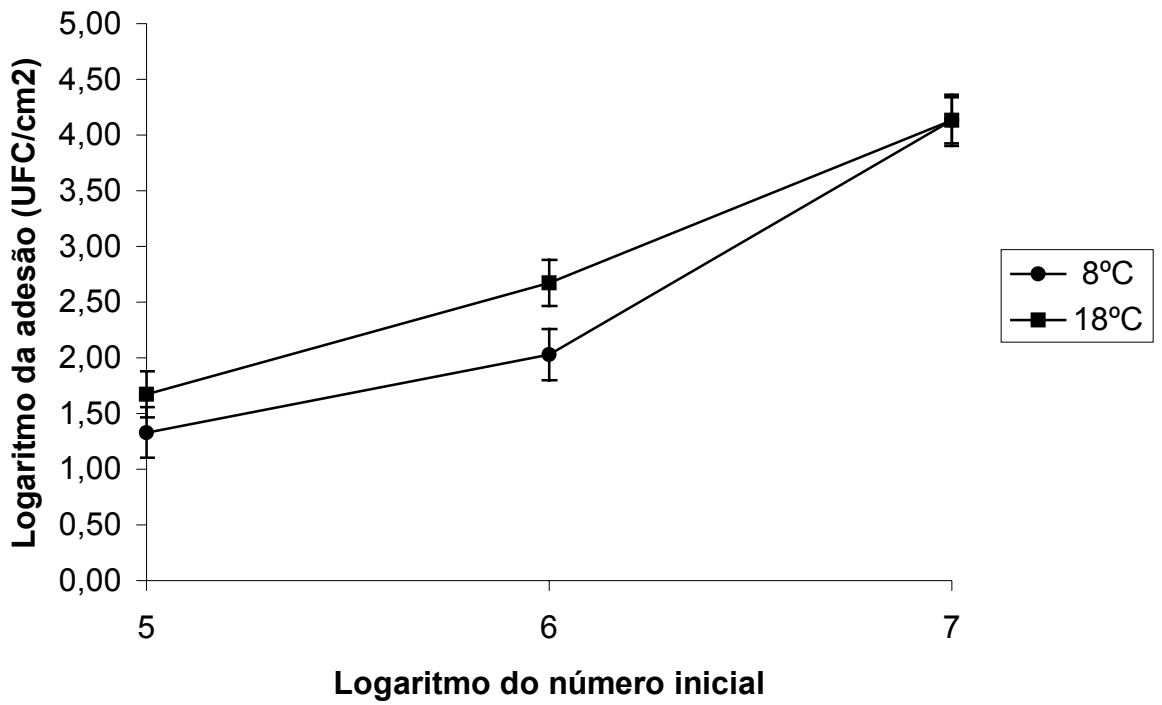


Figura 9 – Efeito das temperaturas de 8 e 18°C no número de células aderidas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, em função do logaritmo do número inicial de células. Média de três repetições.

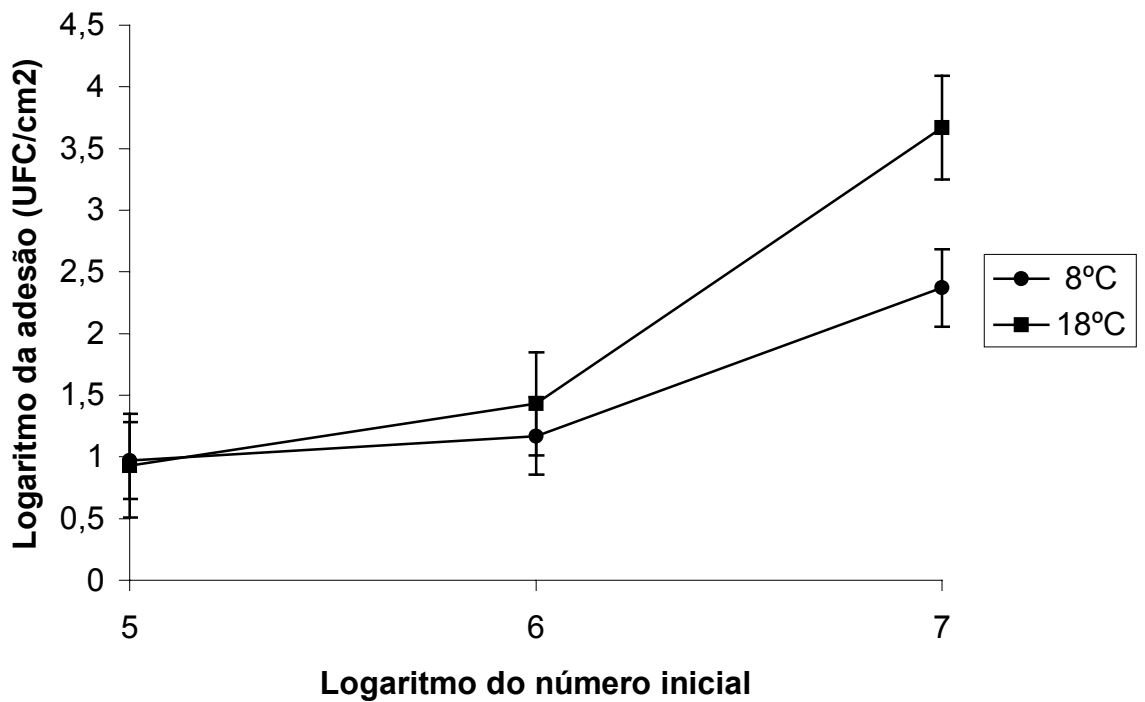


Figura 10 - Efeito das temperaturas de 8 e 18°C no número de células aderidas de *Escherichia coli* K12, em função do logaritmo do número inicial de células. Média de três repetições.

Os resultados demonstram que o aumento da temperatura de 8 para 18°C aumentou a adesão bacteriana ao polietileno. Isto ocorre porque a temperatura é fundamental para sustentar o crescimento de microrganismos. Em temperaturas extremas, ocorre inativação de enzimas e outras estruturas funcionais da célula, como as membranas (MOAT e FOSTER, 1995). A 18°C, os microrganismos se encontram mais próximos da faixa de temperatura ótima para crescimento, já que ambos são mesofílicos, ocorrendo assim aumento do crescimento microbiano e uma produção de exopolissacarídeos provavelmente maior, elevando o número de células aderidas.

Ao comparar os valores de adesão dos microrganismos empregados neste experimento, observou-se maior tendência de adesão das células de *S. aureus*, em função do logaritmo do número inicial. A 8°C, a adesão de *S. aureus* nas concentrações iniciais de 10^5 , 10^6 e 10^7 foi de respectivamente 2,8; 9; e 106 vezes maior que a adesão das células de *E. coli*. Já à temperatura de 18°C os valores encontrados foram respectivamente de 5,4; 18; e 3,8.

Microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos podem ser considerados como partículas carregadas negativamente (ZOTTOLA, 1994), e esta carga pode aumentar ou reduzir a força de atração da bactéria à superfície. Diferenças nos materiais das superfícies, como carga superficial, hidrofobicidade, microtopografia e presença de fendas, podem alterar os valores de adesão (BOWER et al., 1996), do mesmo modo que as características do microrganismo, como morfologia, carga, hidrofobicidade, estágio de crescimento e presença de apêndices de superfície, podem afetar esse processo (TROLLER, 1993).

4.3. Eficiência da radiação ultravioleta na redução do número de células de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* aderidas ao polietileno

No Quadro 4, são mostrados os números de reduções decimais na população dos microrganismos e os valores de D em função do número inicial, bem como os respectivos valores de intensidades de radiação estimadas, para *S. aureus* e *E. coli* expostos à radiação UV por dois segundos. No entanto, durante o experimento, o tempo de uso da lâmpada UV foi de cerca de 20 horas, quando a intensidade diminuiu de 216 para 175 μWcm^{-2} . Assim, para estimar a variação da intensidade da radiação UV, mostrada no Quadro 4, foi utilizada a equação de regressão polinomial, conforme Figura 11.

Observa-se que a radiação UV reduz o número de células aderidas à superfície do polietileno de baixa densidade. Para *E. coli*, as reduções decimais médias variaram de 0,52 a 1,37. No caso de *S. aureus*, os valores se situaram entre 0,85 e 1,73.

Verifica-se, portanto, que os valores médios de D variaram de 1,53 a 5,17 segundos para células de *E. coli* e de 1,17 a 2,43 segundos para *S. aureus*, indicando que há diferença na ação da radiação UV em diferentes concentrações iniciais de células aderidas ao polietileno de baixa densidade e entre os microrganismos estudados.

Quadro 4 – Logaritmo da concentração inicial de células, valores de reduções decimais e valores de D, em cada repetição, e respectivas intensidades de radiação UV estimadas, empregadas nos experimentos com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12

Repetições	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	Log CI	RD	D	Int.	Log CI	RD	D	Int.
1	4,5	0,65	3,08	216	5,1	0,26	7,69	203
2	4,6	1,00	2,00	211	5,1	0,35	5,71	203
3	4,7	0,91	2,20	209	4,9	0,95	2,11	203
Média	4,6	0,85	2,43		5,0	0,52	5,17	
Desvio-padrão		0,1818				0,3751		
1	5,6	0,92	2,17	198	6,1	0,72	2,78	184
2	5,8	0,97	2,06	193	6,0	0,63	3,18	184
3	5,6	1,80	1,11	193	6,1	0,85	2,35	181
Média	5,7	1,23	1,78		6,1	0,73	2,77	
Desvio-padrão		0,4943				0,1106		

1	6,5	1,96	1,02	187	7,2	1,00	2,00	175
2	6,9	1,59	1,26	179	7,8	1,48	1,35	175
3	6,9	1,64	1,22	179	7,6	1,62	1,24	175
Média	6,8	1,73	1,17		7,5	1,37	1,53	
Desvio-padrão		0,2008				0,3253		

Log Ci: logaritmo da concentração inicial.

RD: reduções decimais.

D: valores de D em segundos.

Int.: intensidade estimada de radiação UV.

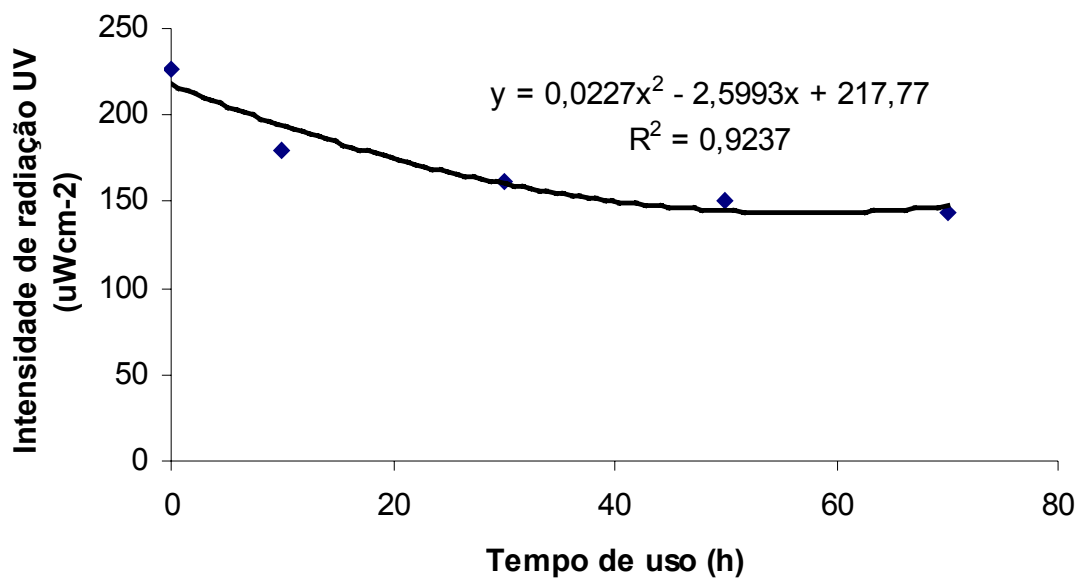


Figura 11 – Diminuição da intensidade da radiação UV nas primeiras 70 horas de uso.

Constata-se que para *S. aureus* ocorreu redução da intensidade da radiação UV de 216 para 179 μWcm^{-2} e para *E. coli* a diminuição foi de 203 para 175 μWcm^{-2} . No entanto, observa-se que não houve grandes variações na intensidade nem no número de RD, nas repetições, quando se avaliou o efeito dos números iniciais. Por exemplo, a diferença máxima na intensidade (7 μWcm^{-2}) foi constatada para *S. aureus* quando os logaritmos do

número inicial eram de 4,5; 4,6; e 4,7. Já para *E. coli* não houve diferença na intensidade quando os logaritmos do número inicial eram de 7,2; 7,8; e 7,6.

Assumindo que as variações de 216 a 179 μWcm^{-2} e de 203 a 175 μWcm^{-2} não sejam expressivas, observa-se que houve tendência de aumento do número de reduções decimais ou de diminuição dos valores de D quando aumenta o número inicial de bactérias na suspensão de adesão ao polietileno.

Com o aumento do logaritmo do número inicial de células, observou-se aumento no número de células aderidas, o que parece ter influenciado a ação da radiação UV. Por exemplo, em números menores de adesão, os microrganismos podem apresentar distribuição na superfície, alojando-se em fendas ou locais de difícil acesso à radiação, em razão da sua microtopografia, reduzindo assim sua eficiência. Como a superfície, provavelmente, apresenta capacidade limitada de proteção às bactérias, a ação da radiação UV será mais eficiente quando a superfície apresentar maior número de bactérias aderidas.

Para facilitar as comparações sobre a resistência dos microrganismos, já que os logaritmos dos números iniciais eram diferentes no experimento, foram empregadas as equações de regressão linear para *S. aureus* e *E. coli*, (Figuras 12 e 13), obtendo-se, dessa forma, os valores apresentados no Quadro 5.

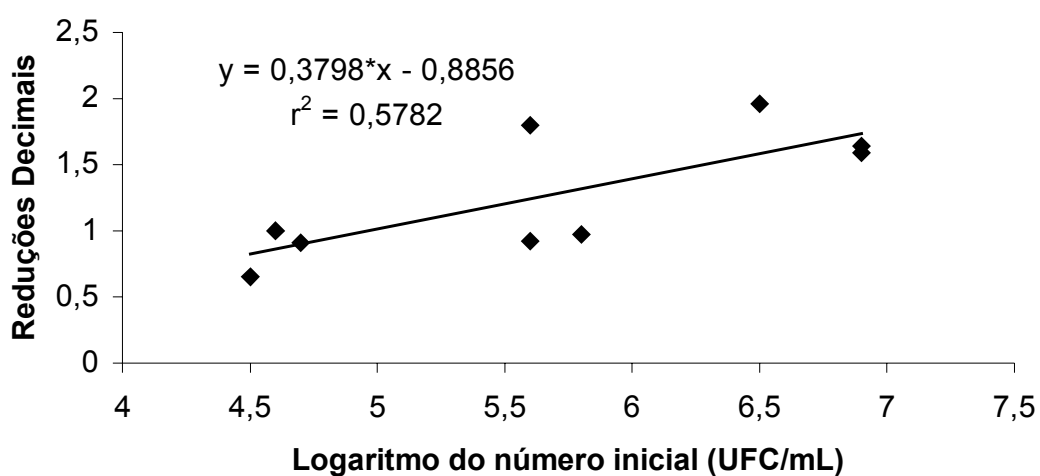


Figura 12 – Regressão linear do número de reduções decimais, em função do logaritmo do número inicial de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, após dois segundos de exposição à radiação UV.

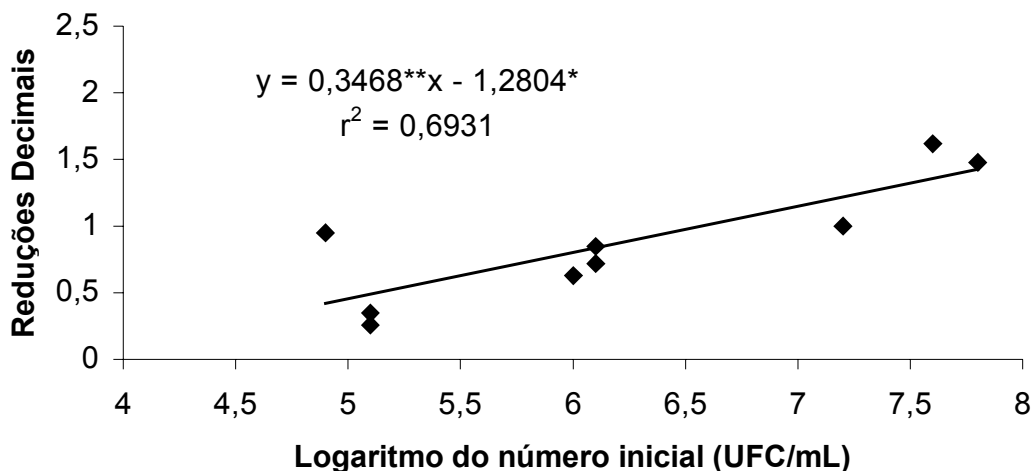


Figura 13 – Regressão linear de reduções decimais, em função do logaritmo do número inicial de *Escherichia coli* K12, após dois segundos de exposição à radiação UV.

Quadro 5– Reduções decimais estimadas do número de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 após exposição à radiação ultravioleta de 216 a 175 μWcm^{-2} , durante dois segundos, em função do número inicial de células aderidas ao polietileno de baixa densidade obtidas à partir das respectivas regressões lineares

Microrganismo	Logaritmo do Número Inicial	Reduções Decimais	Valores de D (segundos)
<i>E. coli</i>	5,0	0,46	4,35
<i>E. coli</i>	6,0	0,81	2,47
<i>E. coli</i>	6,8	1,09	1,84
<i>S. aureus</i>	5,0	1,02	1,96
<i>S. aureus</i>	6,0	1,40	1,43
<i>S. aureus</i>	6,8	1,70	1,18

Pode-se observar que, para *E. coli*, quando o logaritmo da concentração inicial foi igual a 5, o valor de D foi de 4,35 segundos; para um logaritmo da concentração igual a 6,8, o valor de D foi de 1,84. Para células de *S. aureus*, os valores de D obtidos para as mesmas concentrações iniciais foram, respectivamente, de 1,96 e 1,18. Esses resultados mostram que as células de *E. coli*, aderidas ao polietileno, apresentam maior capacidade de sobreviver à exposição à radiação UV, quando comparadas com células de *S. aureus*.

Embora a radiação ultravioleta apresente atividade bactericida nos microrganismos aderidos à superfície do polietileno, as reduções obtidas encontram-se abaixo dos valores de três ciclos logarítmicos recomendados em literatura para sanificantes químicos e físicos, na inativação de células aderidas (MOSTELLER e BISHOP, 1993). No entanto, não há dúvida de que a radiação UV é um tratamento auxiliar útil no controle da contaminação microbiológica de embalagens de polietileno.

A comparação dos resultados obtidos com a literatura é dificultada porque vários fatores podem interferir na ação bactericida da radiação UV. Dentre eles, incluem-se o tempo de exposição, a intensidade de radiação empregada, a distância da fonte irradiadora à superfície, a morfologia microbiana, a capacidade de adesão do microrganismo, o estado físico das células e o tipo de superfície onde se encontra o microrganismo.

Neste experimento, a resistência das células vegetativas pode estar associada com o fato de estarem aderidas à superfície. Por exemplo, pesquisa mostrou a redução de 6,3 ciclos logarítmicos para células em suspensão de *Salmonella typhimurium*, empregando a intensidade de $620 \mu\text{Wcm}^{-2}$ em um intervalo de tempo de 15 segundos (KUO et al., 1997). Para esta mesma intensidade, quando o experimento foi conduzido com as células no estado sésil, previamente aderidas em casca de ovo, obteve-se redução de apenas três ciclos logarítmicos para um minuto de exposição das células à radiação UV. Em outro experimento, foram obtidos 5 ciclos logarítmicos de redução do número de células de *E. coli* em suspensão, utilizando-se $300.000 \mu\text{Wcm}^{-2}$ por 2,5 segundos (BACHMANN, 1975). Isto ocorre em razão da maior susceptibilidade das células em suspensão à ação da radiação UV. No caso de células aderidas à superfície, os valores de reduções são menores, pois as

células apresentam-se ancoradas à superfície por meio de exopolissacarídeos, dificultando assim a ação da radiação UV, devido ao baixo poder de penetração.

Observa-se que esporos bacterianos apresentam maior resistência que células vegetativas, o que pode ser notado nos experimentos conduzidos por FLÜCKIGER (1995), que usou intensidade de $30.000 \mu\text{Wcm}^{-2}$, entre 139 e 171 vezes maior que a utilizada neste experimento, para obter de três a quatro reduções decimais na população de esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, empregando-se as seguintes condições: concentração bacteriana igual a $1,4 \times 10^4$ UFC/cm², distância da fonte à superfície igual a 10,5 cm e um segundo de exposição.

Deve se considerar, ainda, a microtopografia da superfície onde as células se encontram aderidas, pois a radiação UV apresenta pequeno poder de penetração, sendo sua ação restrita à superfície. Desse modo, casca de ovo, superfície de carnes e carcaças de aves, polietileno e aço inoxidável apresentam diferentes tipos de superfícies, com os mais variados tipos de irregularidades, que podem proteger as células do contato direto com a radiação UV, diminuindo assim sua ação bactericida.

4.4. Redução na intensidade da radiação ultravioleta versus a eficiência bactericida

A Figura 14 mostra a redução da intensidade da radiação UV com o tempo de uso da lâmpada germicida.

Com o tempo de uso da lâmpada fluorescente germicida da marca HUA NING ZW de 15W de potência, observou-se decréscimo acentuado na intensidade da radiação UV nas primeiras 100 horas, constatando-se perda de 39,5% da intensidade emitida pela lâmpada na faixa de comprimento de onda entre 240 e 260 nm. Essa queda brusca nas 100 primeiras horas de uso também foi relatada por FLÜCKIGER (1995), ao analisar a lâmpada germicida BBC.

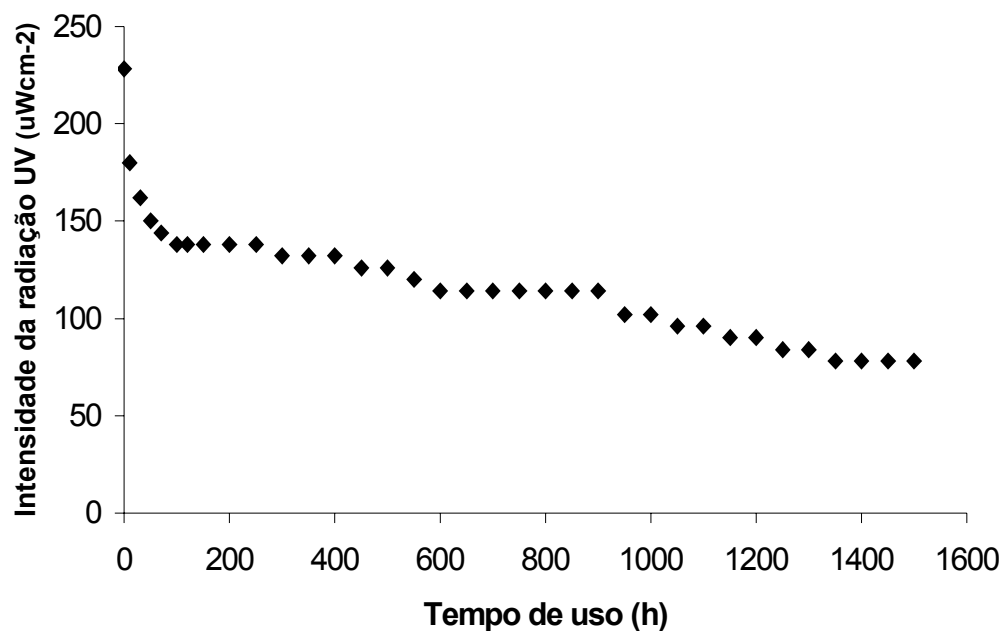


Figura 14 – Redução da intensidade da radiação UV com o tempo de uso.

No Quadro 6 observam-se as reduções decimais obtidas após exposição por dois segundos à radiação UV, para células de *S. aureus* e *E. coli*, em três tempos diferentes de uso da lâmpada.

Quadro 6 – Influência da diminuição da intensidade da radiação UV na eficiência bactericida sobre células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 aderidas intencionalmente a polietileno de baixa densidade. Média de três repetições

Tempo de Uso (h)	Intensidade (μWcm^{-2})	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
		RD	D	Log D	RD	D	Log D
70	144	1,04	1,92	0,28	0,94	2,13	0,33
1000	102	0,72	2,78	0,44	0,58	3,45	0,54
1500	78	0,58	3,45	0,54	0,36	5,56	0,75

Após 1.500 horas de uso, constatou-se diminuição de 0,58 no número de reduções decimais para células de *E. coli* aderidas à superfície do

polietileno. Para *S. aureus*, a queda no número reduções foi de 0,46. Isto representa uma efetividade 2,6 vezes menor na inativação de células de *E. coli* e de 1,8 vez para células de *S. aureus*, quando decorridas 1.500 horas de uso. A vida útil da lâmpada germicida é dependente da redução da intensidade com o tempo de uso. Neste experimento, encontrou-se a contaminação de 0,16 NMP/cm²; para atingir a contagem de 0,1UFC/cm², há necessidade de obter 0,2 RD. Neste caso, a vida útil da lâmpada está acima de 1.500 horas.

Constatou-se que as células de *E. coli* são mais resistentes a radiação UV e que a efetividade da lâmpada diminui com o tempo de uso. FLÜCKIGER (1995) aponta como de 1.200 a 1.500 horas a vida útil para lâmpadas germicidas.

As Figuras 15 e 16 mostram a relação entre o logaritmo dos valores de D e a intensidade de radiação UV para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

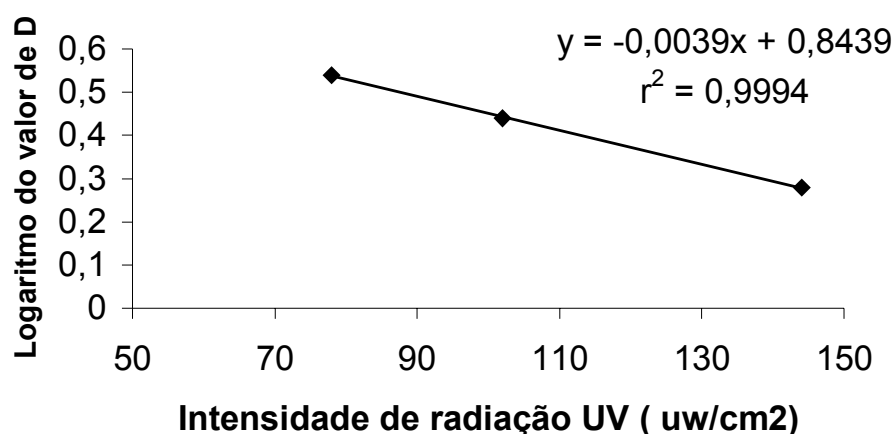


Figura 15 – Relação entre o logaritmo do valor de D e a intensidade de radiação UV para células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

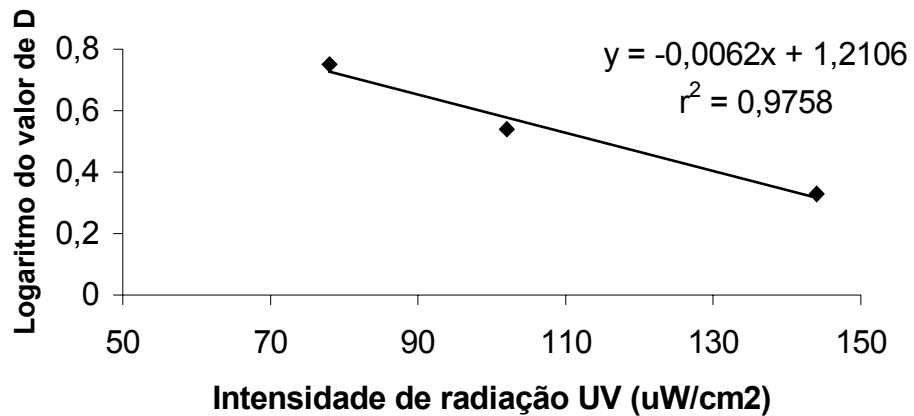


Figura 16 – Relação entre o logaritmo do valor de D e a intensidade de radiação UV para células de *Escherichia coli* k12.

Por meio das equações de regressões lineares apresentadas nas Figuras 15 e 16, obtêm-se, além do valores de D de referência, os respectivos valores de Z para cada microrganismo estudado. Os valores de Z são obtidos através do inverso dos valores das inclinações das equações de regressões lineares.

De posse dos respectivos valores de Z e da equação apresentada a seguir, tem-se a estimativa dos valores de D para uma dada intensidade de radiação UV.

$$D = D_{\text{ref.}} \times 10^{(I_{\text{ref.}} - I)/Z}$$

em que

D = valor de D;

D_{ref} = valor de D de referência;

I = intensidade de radiação UV;

I_{ref} = intensidade de radiação UV de referência; e

Z = valor de Z para um determinado microrganismo.

Para *S. aureus*, o valor de Z é igual a 256,4, originando a seguinte equação:

$$D = D_{\text{ref.}} \times 10^{(I_{\text{ref.}} - I)/256,4}$$

Para *E. coli* o valor de Z é igual a 161,3, originando a seguinte equação:

$$D = D_{\text{ref.}} \times 10^{(I_{\text{ref.}} - I) / 161,3}$$

Por exemplo, se a intensidade de radiação UV sobre células de *S. aureus* for de $120 \mu\text{Wcm}^{-2}$, o valor de D será de 2,38 segundos.

Por outro lado, para se obter um valor de D de 3 segundos para *E. coli*, a intensidade de radiação UV necessária é de $118,3 \mu\text{Wcm}^{-2}$.

Apesar do reduzido número de dados experimentais, as regressões lineares apresentadas nas Figuras 15 e 16 são mostradas para ilustrar a forma de estimar os valores de D de referência, em função da intensidade de radiação UV e vice-versa. No entanto, sabe-se que há necessidade de utilização de maior número de dados para que as estimativas sejam confiáveis.

4.5. Avaliação da radiação ultravioleta em condições de uso

No Quadro 7 são apresentados os valores de logaritmo do NMP/630cm² de microrganismos mesófilos nas embalagens de polietileno antes e após a irradiação com ultravioleta.

Quadro 7 – Logaritmos dos números de microrganismos mesófilos nas embalagens de polietileno, antes e após exposição à radiação UV, em condições de uso, determinados pela técnica de Número Mais Provável (NMP). Média de três repetições

BOBINA DE POLIETILENO	Log do NMP da embalagem não-irradiada	Log NMP da embalagem irradiada	REDUÇÕES DECIMAIS
1	1,47	0,67	0,80
2	2,38	1,23	1,15
3	1,57	0,67	0,90

Os resultados mostram a existência de determinada contaminação microbiológica inicial nas embalagens. Para FLÜCKIGER (1995), embalagens

plásticas e cartonados plásticos devem conter no máximo 0,1 UFC/cm², como medida para evitar a recontaminação do alimento processado. Neste experimento, o valor médio de contaminação encontrado nas embalagens antes da exposição à radiação UV foi de 0,16 NMP/cm², estando acima dos valores recomendados esse autor. No entanto, após a irradiação das superfícies internas das embalagens por aproximadamente dois segundos, observa-se a permanência de 0,014 NMP/cm², o que significa redução decimal de 1,06, isto é, cerca de 90% das células contaminantes não sobreviveram à ação da radiação UV. Estudos têm sido desenvolvidos na área de embalagens, onde se adicionam ao polímero substâncias para inibir a viabilidade e aderência de células, como é o caso do composto denominado Intersept™ (Interface Research Corp. Kenesan, GA, USA) (BOWER et al., 1996).

No envase do leite, o risco de contaminação é igual à soma dos riscos de cada etapa do processo, sendo, assim, indispensável o controle dessas etapas (FLÜCKIGER, 1995). A efetividade na redução do número inicial de bactérias anterior à embalagem do alimento é um ponto importante no prolongamento da vida-de-prateleira do alimento (HUANG e TOLEDO, 1982) bem como na preservação das características organolépticas e higiênico-sanitárias do produto.

4.6. Microtopografia da superfície de polietileno de baixa densidade

Ao visualizar a superfície do polietileno por microscopia de força atômica (MFA), observou-se a existência de dois diferentes tipos de superfície, um relativamente liso e outro com pontos refringentes. As Figuras 17 e 18 mostram a microtopografia da superfície de polietileno de baixa densidade, observada pela microscopia de força atômica (MFA). O tipo de superfície apresentada na Figura 18 representa mais de 50% da área total analisada.

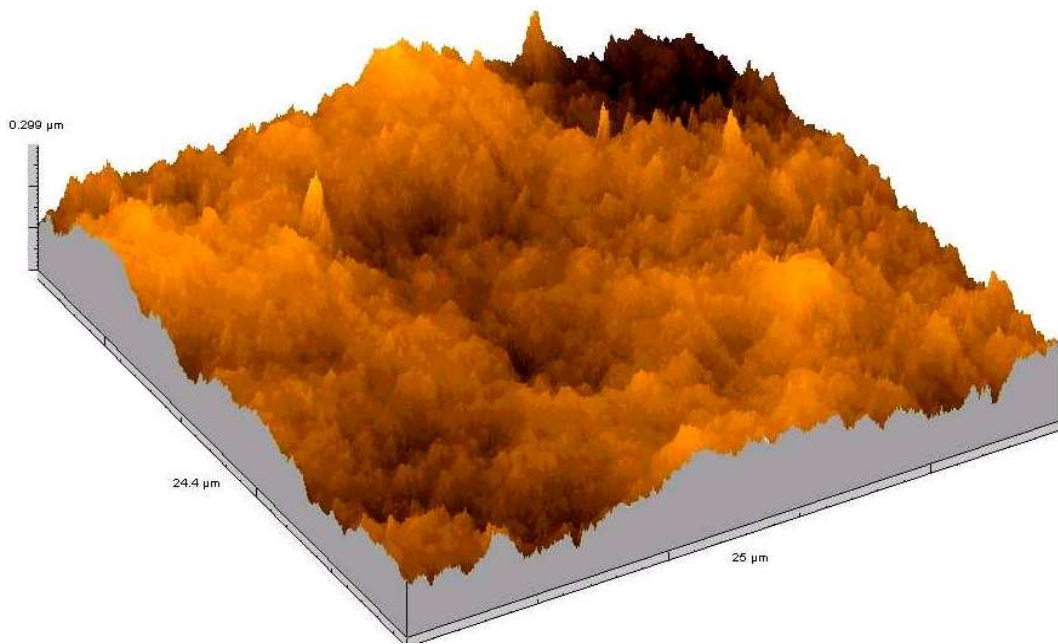


Figura 17 – Microtopografia da superfície de polietileno representativa das regiões relativamente lisas, obtida pela microscopia de força atômica.

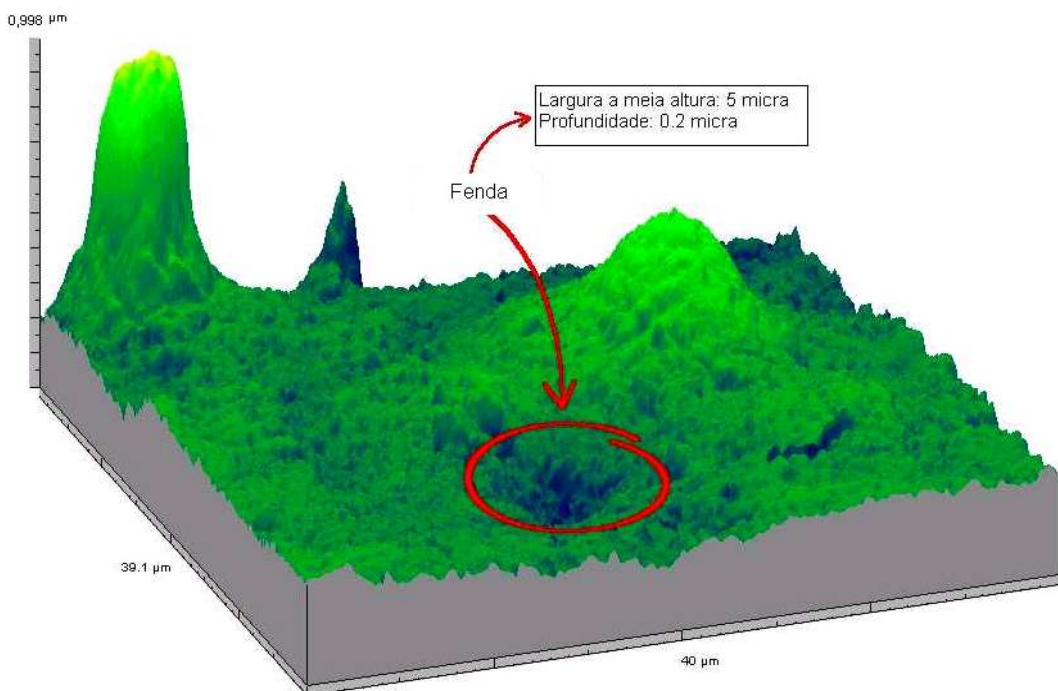


Figura 18 – Microtopografia da superfície de polietileno, contendo fendas e elevações, obtida pela microscopia de força atômica.

Superfícies que entram em contato com alimentos, como o vidro, o aço inoxidável, o polietileno e a borracha, apresentam diferentes microtopografias de superfície, podendo conter fissuras e fendas com tamanho suficiente para alojar bactérias (BOWER et al., 1996). A presença de rugosidades e contornos no material da embalagem produz sombras que reduzem significativamente a efetividade da radiação UV, uma vez que o efeito bactericida ocorre somente na direção do feixe de luz (HUANG e TOLEDO, 1982).

Observa-se na Figura 17 que a rugosidade média encontrada é de 50 nm, podendo ser considerada uma superfície relativamente plana. Já na superfície mostrada na Figura 18 observam-se imperfeições com 5 µm de diâmetro e 0,2 µm de profundidade. Considerando que as células de *S. aureus* e *E. coli* apresentam as dimensões 0,5 – 1,5 µm de diâmetro e 1,1 – 1,5 x 2,0-6 µm, respectivamente, as imperfeições da superfície podem proteger esses microrganismos do contato direto com a radiação UV, reduzindo sua eficiência.

Por meio da microtopografia do polietileno por MFA, pode-se comprovar a existência de irregularidades na superfície que possibilitam o alojamento de bactérias, facilitando o processo de adesão, além de dificultar o processo de inativação microbiana de células aderidas, através do uso da radiação UV, ou, ainda, impedir a ação da radiação UV por meio de proteção desses microrganismos em grandes fendas e pela presença de grandes elevações, que podem impedir o contato direto do microrganismo com a radiação UV.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A adesão de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* K12 a polietileno de baixa densidade (PEBD), com 700 µm de espessura e área interna de 630 cm² (22,5 x 28 cm), usado na embalagem de leite fluido, foi avaliada nas temperaturas de 8 e 18°C. As concentrações iniciais de células nas suspensões de adesão utilizadas foram da ordem de 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFC/mL, com tempo de incubação de 12 horas.

Constataram-se diferenças significativas (p<0,05) entre as temperaturas de adesão e na interação entre microrganismos e as contagens iniciais das suspensão de adesão.

Para as células de *S. aureus*, os valores de adesão encontrados variaram de 2,4 x 10¹ a 1,6 x 10⁴ UFC/cm² para temperatura de 8°C e de 5,4 x 10¹ a 1,5 x 10⁴ a 18°C. Já para células de *E. coli* os valores de adesão variaram de 1,1 x 10¹ a 2,3 x 10² para temperatura de 8°C e de 3,0 x 10⁰ a 5,6 x 10³ a 18°C. Esses valores não caracterizam uma formação de biofilme, uma vez que para isso as contagens deveriam atingir entre 10⁶ e 10⁷ UFC/cm². Os resultados mostraram que o aumento da temperatura de adesão de 8 para 18°C aumenta a adesão bacteriana ao PEBD. A 18°C, os microrganismos se encontram mais próximos da faixa ótima de temperatura para crescimento de mesofílicos, aumentando assim a produção de exopolissacarídeos, o que resulta em maior número de células aderidas. Observou-se, ainda, maior tendência de adesão de células de *S. aureus*, em função do número inicial, quando comparado com a adesão de células de *E. coli*.

No experimento para determinar a eficiência da radiação ultravioleta em células aderidas ao polietileno, utilizaram-se números iniciais de células da ordem de 10^5 a 10^7 UFC/cm², temperatura de 18°C, tempo de 12 horas para adesão das células ao PEBD e intensidade de 216 a 175 μWcm^{-2} por dois segundos.

Observa-se que, quando os logaritmos dos números iniciais de células de *E. coli* foram iguais a 5 e 6,8, os valores de D foram 4,35 e 1,84 segundos, respectivamente. Já para *S. aureus*, os valores obtidos foram de respectivamente de 1,96 e 1,18. Esses resultados mostram que as células de *E. coli*, aderidas ao polietileno, apresentaram maior capacidade de sobrevivência à exposição à radiação UV, quando comparadas com células de *S. aureus*. Além disso, constatou-se que a eficiência da radiação UV foi maior quando os números iniciais na suspensão de adesão foram mais elevados.

Embora a radiação ultravioleta tenha apresentado atividade na redução do número de células aderidas à superfície do PEBD, os números de reduções para células aderidas de *E. coli* foram de 0,52 e 1,37 e, para *S. aureus*, entre 0,85 e 1,73; esses números se encontram abaixo do valor de 3 ciclos logarítmicos, geralmente recomendado para considerar que a ação de sanificantes físicos e químicos seja eficiente sobre células vegetativas aderidas.

No experimento para verificar a diminuição da intensidade da radiação UV e sua eficiência bactericida com o tempo de uso, observou-se diminuição na intensidade da radiação UV, após 1.500 horas, de 228 para 78 μWcm^{-2} , sendo a queda na intensidade mais acentuada nas primeiras 100 horas, em que se constatou queda de 39,5% na intensidade. Após 1.500 horas de uso da lâmpada germicida, os valores de reduções decimais para células de *E. coli* decresceram de 0,94 para 0,36 e, para as células de *S. aureus*, de 1,04 para 0,58.

Na etapa de avaliação da radiação UV em condições de uso, foram analisadas nove amostras de PEBD, sendo estas pertencentes a três bobinas diferentes. Por meio da técnica de Número Mais Provável (NMP) foi determinado o número de células contaminantes na superfície antes e após a irradiação, obtendo-se assim os valores de reduções decimais em condições de uso. Constatou-se que, em dois segundos de exposição da superfície da

embalagem a $137 \mu\text{Wcm}^{-2}$, o número de microrganismos contaminantes reduziu de $0,16 \text{ NMP/cm}^2$ para $0,014 \text{ NMP/cm}^2$, o que representa 1,06 redução decimal, estando estes valores inferiores aos recomendados, de $0,1 \text{ UFC/cm}^2$, para que não haja recontaminação do produto.

Ao visualizar a superfície do PEBD por microscopia de força atômica (MFA), constatou-se que esta apresenta imperfeições, como fendas com dimensões de $0,2 \mu\text{m}$ de profundidade e $5 \mu\text{m}$ de diâmetro e elevações com até $1 \mu\text{m}$. A eficiência da radiação UV pode ser reduzida devido à presença dessas irregularidades, uma vez que estas podem alojar bactérias, facilitando o processo de adesão, ou ainda pela formação de regiões que protegem as células do contato direto com a radiação UV.

Os resultados mostram que a radiação UV apresenta potencial para uso na descontaminação de embalagens, já que é uma técnica de simples utilização, baixo custo operacional e não deixa resíduos. Portanto, pode ser considerada um tratamento auxiliar útil no controle de contaminação microbiológica de embalagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. M.V. e GARCIA, E.E.C. Embalagem para leite fluido: desempenho de filmes flexíveis. **Indústria de Laticínios**, p.66-68, 1997.
- ANDERSSON, A, RÓNNER, U., GRANUM, P. E. What problems does the food Industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28,p.145-155, 1995.
- ANDRADE, N.J., AJAO, B.D., ZOTTOLA, E.A.. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal Food Protection** v.61, n.11, p.1454-1458, 1998.
- ANDRADE, N.J., BRIDEGMAN, T. A., ZOTTOLA, E.A.. Bacteriocidal activity of sanitizer against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal Food Protection** v.61, p.833-838, 1998.
- ANDRADE, N.J., MACÊDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1996. 182p.
- ANTOPOL, S.C., ELLNER, P.D. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ultraviolet radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 347-348, 1979.
- ARRAGE, A. A., PHELPS, I. J. , BENOIT, R. E., WHITE, D. O. Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3545-3550, 1993.
- ASSANTA, M. A., ROY, D. e MONTPETIT, D. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system piper after different contact times. **Journal of Food Protection**, v. 61, n.10, p.1321-1329, 1998.
- BACHMANN, R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. **Brown Boveri Review**, v. 5, p. 206-209, 1975.

- BAL'A, M.F.A., JAMILAH,D. e MARSHALL,D.L. Attachment of *Aeromonas hydrophila* to stainless steel surfaces. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.18,n.10, p.642-649, 1998.
- BANWART, G.J. Control of microorganisms by destruction. **Basic food microbiology**, 2thed., Chapman & Hall, London, 1989, 748p.
- BILLMEYER, F.W.J. **Textbook of polymer science**. 3^a ed. John Wiley & Sons, New York, 1984, 578p.
- BLAKISTONE, A. B., KELLER, S.W., MARCY, J.E., LACY, G.H., HACKNEY, C.H., and CARTER, W.H.,Jr.. Contamination of flexible pouches challenged by immersion biotesting. **Journal Food Protection**,v. 59, n.7, p. 764-767, 1996.
- BLATCHLEY, E., ISSAC, R.A. Antimicrobial processes. **Water Environment Research**, v. 64, n. 4, p.391-398, 1992.
- BOWER, C.K., Mc GUIRE, J. e 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.
- BROCK, T. **Biology of Microorganisms**. 7^a ed. New Jersey: Prentice Hall, Englwood Cliffs, 1994. 375p.
- BUSSCHER, H.J., WEERKAMP, A.H., VAN DER MEI, H., PELT, A.W.J., JONG, H.P. e ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfces and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.5, p. 980-983, 1984.
- CHARACKLIS, W.G., COOKSEY, K.E. Biofilm and microbial fouling. **Adv. Applied Microbiology**, v.29, p.93-137, 1983.
- COWELL, B.A., WILLCOX, M.D.P., HERBERT, B. e SCHNEIDER, R.P. Effect of nutrient limitation on adhesion characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.944-954, 1999.
- CRIADO, M.T., SUÁREZ, B., FERRERÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v.48, n.2, p. 123-126, 1994.
- CUNLIFFE,D., SMART, C. A, ALEXANDER, C.e VULFSON, E.N..Bacterial adhesion at synthetic surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p. 4995-5002, 1999.
- DIZER, H., BARTOCHA, W., BARTEL, H., SEIDEL, K., LOPEZ-PILA, J. M.,GROHMANN, A. Use of ultraviolet radiation for inactivation of bacteria and coliphages in pretreated wastewater. **Water Research**, v. 27, n. 3, p. 397-403, 1993.
- ELASRI, M.O. e MILLER, R.V. .Study of the response of a biofilm bacterial community to uv radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.5, p. 2025-2031, 1999.

- ELEY, A.. **Microbial food poisoning** , 2^a ed, London: Chapman & Hall., 1996. 210p.
- FIKSDAL, L. e TRYLAND, I. Effect of U.V. light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* β -D-galactosidase activity and other potential viability parameters. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.62-71, 1999.
- FLINT, S. H., BREMER, P. J. e BROOKS, J. D..Biofilms in dairy manufacturing plant- description, current concerns and method of control. **Biofouling**, v. 11, n. 1, p.81-97, 1997.
- FLÜCKIGER, E. Alternative methods to avoid recontamination during aseptic filling and packaging. **Bulletin of the IDF 300**, p.52-56, 1995.
- FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. **Microbiologia de Alimentos**, 1^a ed, São Paulo, Editora Atheneu, 1996, p.109-148.
- FRIEDBERG, E.A., WALKER, G.C. e SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. ASM Press, Washington, D.C., 1995.
- GIBSON, H., TAYLOR, J.H., HALL, K. E. e HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.41-48, 1999.
- GREENBERG, A.E., CLESCERI, L.S., EATON, A.D. Ed. **Standard Methods – For Examination of Water and Wastewater- APHA**, 18th ed. Baltimore, 1992.
- HO, C.H., PITT, P., MAMASIS, D., CHIU, C., JOLIS, D. Evaluation of UV disinfection systems for large-scale secondary effluent. **Water Environment Research**, n. 6, v. 70, p. 1142-1150, 1998.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., ATALEY, J.T., WILLIAMS, S.T.. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1993. 787p.
- HOOD, S. K., ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v.6, p.8-18,1995.
- HUANG, Y.-W., TOLEDO, R. Effect of high doses of high and low intensity UV irradiation on surface microbiological counts and storage-life of fish. . **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1667-1669, 1982.
- INTERNATIONAL ULTRAVIOLET ASSOCIATION.- IUVA. **What is ultraviolet (UV)?** [Setembro de 2000]. <http://www.iuva.org/PublicArea/index.htm>.
- KUO, F. L., CAREY, J.B. e RICKE, S. C. UV irradiation of shell eggs: effect of populations of aerobes, moulds and inoculated *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v.60, n.6, p.639-643, 1997.

- KUO, F.-L., RICKE, S.C., CAREU, J.B. Shell egg sanitation: Uv radiation and egg rotation to effectively reduce populations of aerobes, yeasts, and molds. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 694-697, 1997.
- KUO, J., SMITH, S.O. Disinfection. **Water Environment Research**, v. 68, n. 4, p. 503-510, 1996.
- MAFU, A.A., ROY, D. GOULET, J. e 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.
- MAHARAJ, R., ARUL, J., NADEAU, P., Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 15, p. 13-23, 1999.
- MANO, E.B. **Polímeros como materiais de engenharia**, 1ª ed, Edgard Blücher São Paulo, 1991, 356p.
- MOAT, A.G. e FOSTER, J.W. **Microbial Fisiology**. 3ª ed. New York, Willwy-Liss, 1995, 580p.
- MOSTELLER, T. M. BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n1, p.34-41, 1993.
- NOTERMANS, S., DORMANS, J.A.M.A., MEAD, G.C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, v.5., p.1-16,1991.
- PRIMARC UV TECHNOLOGY. **About UV technology**. [Agosto de 2000]. <http://www.primarc.com/english/aboutuv.htm>.
- RAYNAUD, D., LELIEVELD, H.L.M. Decontamination of food-packing using moist heat. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 326-329, 1997.
- REIS, R.C. e ANDRADE, N.J.. Efeito do número inicial de esporos de *Bacillus cereus* e da temperatura na adesão em superfícies termoplásticas. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, p.382, 1999.
- ROWAN, N. J., MacGREGOR, S. J., ANDERSON, J.G., FOURACRE, R. A., McILVANEY e FARISH, O. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.1312-1315, 1999.
- SCHWACH, T. S., ZOTTOLA, E. A. Use of scanning eletron microscopy to demonstre microbial attachmente to beef and beef contact surfaces. **Journal of Food Science**, v.47,p.1401-1405,1982.

- SHECHMEISTER, I. L. Sterilization by ultraviolet irradiation. **Desinfection, sterilization and preservation**, 4^a Ed. Philadelphia — London: Lea & Febiger, 1991, p. 553-569.
- SIZER, C. E & BALASUBRAMANIAM, V. M. New intervention processes for minimally processed juices. **Food Technology**, v.53, n.10, p.64-67, 1999.
- SLIEMAN, T. A. e NICHOLSON, W. L. Artificial e solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. . **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.199-205, 2000.
- SMITH, J.L. e FRATAMICO, P.M. Factors involved in the emergence and persistence of food-borne diseases. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 6, p.696-708, 1995.
- SMOOT, L. M., PIERSON, M. D.. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scot A to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p.1293-1298, 1998.
- SNYDER JR, O . P. Control of surface microorganisms and biofilms. **Dairy, Environmental Sanitation**, v.12, n.5, p.525-529, 1992.
- SONNEVELD, K.. What drives (food) packaging innovation? **Packaging Technology and Science**, v.13, p.23-35, 2000.
- STANNARD, C., ABBISS, J., WOOD, J.M. Efficiency of treatments involving ultraviolet irradiation for decontaminating packaging board of different surface compositions. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 9, p. 786-789, 1985.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS/STATTM User's Guide, Release 6.03 edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1988, p.1028.
- STERMER, R.A., LASATER-SMITH, M., BRASINGTON, C.F. Ultraviolet radiation - An effective bactericide for fresh meat. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 2, p. 108-111, 1987.
- STRAUSSER, Y. E.e HEATON, M. G. Scanning probe microscopy – Technology and recent innovations. **American Laboratory**, May, 1994.
- TOLEDO, R. T.. Chemical sterilants for aseptic packaging. **Food Technology**, p.102–112., 1975.
- TRAMPLIM, M. L. e CAPERS,G.M. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of gulf coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected whit UV light. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p.1506-1510, 1992.
- TROLLER, J.A. **Sanitation in food processing**. 2^a ed., New York: Academic Press, 1993.p.52-69.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA/ DEPARTAMENTO DE QUÍMICA.- Revista eletrônica. **A era dos plásticos**. [Junho de 2000]. <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/exemplar29.htm#plasticos>.

VAN DER KOOIJ,D. Potential for biofilm development in drinking water distribution systems. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.85, p.39S-44S, 1999.

VAN HEDDEGHEM, A. e VLAEMYNCK, G. Sources of contamination of milk with *Bacillus cerues* on the farm and in the factory. **Bulletin of the IDF 275**, p.19-22, 1985.

WALLNER-PENDLETON, E. A., SUMNER, S. S., FRONING, G.W., STETSON, L.E. The use of ultraviolet radiation to reduce *Salmonella* and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. **Poultry Science**, v. 73, p.1327-1333,1994.

WONG, E., LINTON, R.H., GERRARD, DE. Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella senftenberg* on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. **Food Microbiology**, n. 15, p.415-423, 1998.

YOUSEF, A.E., MARTH,E. H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 2, p. 571-573, 1988.

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

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

ZOTTOLA, E. A. Special tecniques for studying microbial biofilms in systems. In: TORTOELLO, M.L., GRENDEL, S.M. (Eds.) **Food microbiologist analysis: new technologies**. Baltimore: IFT basic symposium series, 1997. p.315-343.