

CAMILA RIBEIRO ROCHA

**CONTROLE DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* EM AÇO
INOXIDÁVEL POR SURFACTANTES**

Dissertação 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
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R672c
2018
Rocha, Camila Ribeiro, 1992-
Controle de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em aço
inoxidável por surfactantes / Camila Ribeiro Rocha. – Viçosa,
MG, 2018.
xi, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélío José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 36-42.

1. Alimentos - Contaminação. 2. *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Biofilmes. 4. Leite - Contaminação. 5. Agentes ativos de
superfícies. 6. Aço inoxidável. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

CAMILA RIBEIRO ROCHA

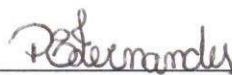
**CONTROLE DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* EM AÇO
INOXIDÁVEL POR SURFACTANTES**

Dissertação 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*.

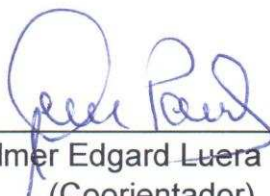
APROVADA: 14 de março de 2018.



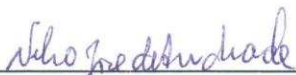
Roberta Torres Careli



Patrícia Érica Fernandes



Wilmer Edgard Luera Peña
(Coorientador)



Nélío José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades de aprendizado nessa caminhada.

Ao meu orientador Nélcio José de Andrade, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pelos valiosos ensinamentos e ter contribuído para a minha formação acadêmica.

À minha coorientadora Roberta Torres Careli que me apresentou o mundo da microbiologia e me acompanha desde a graduação, obrigada pela amizade, conselhos e incentivos.

Ao meu coorientador Wilmer Edgard Luera Peña pelas valiosas contribuições, e a Profa. Patrícia Érica Fernandes por ter aceitado o convite de participar da minha banca de dissertação.

Aos meus pais, Aurora e Marcílio, e ao meu irmão Filipe, pelo amor incondicional e por nunca medirem esforços em todos os meus projetos, sempre me auxiliando e apoiando.

Ao meu namorado Thiago, por todo o seu amor, carinho, compreensão e incentivo para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso. Aos funcionários e técnicos do DTA pela dedicação, especialmente Ana Lúcia, Lorena e Iara.

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

Aos meus colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, Adeline, Miriam, Paulo César, Rafaela, Roberta, e minha estagiária Alécia, pela amizade e auxílio.

Às minhas queridas amigas, Thamiris, Elisângela, Francine, Júlia, Érica, Lauane, Letícia, Luana, por terem tornado meus dias em Viçosa mais leves e divertidos.

Ao Laboratório de Microscopia e Microanálise pela possibilidade de realizar as análises de microscopia, em especial a técnica Carlota.

Enfim, a todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para que eu concluísse mais uma etapa!

BIOGRAFIA

CAMILA RIBEIRO ROCHA, filha de Marcílio José Rodrigues Rocha e Maria Aurora Ribeiro Rocha, nasceu em Buritizeiro, Minas Gerais, em 07 de abril de 1992.

Em março de 2010 iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Minas Gerais, concluindo em julho de 2015.

Em março de 2016 iniciou o mestrado no Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em março de 2018.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. Revisão de literatura.....	3
3.1. Biofilmes bacterianos.....	3
3.1.1. Biofilme na indústria de alimentos.....	5
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
3.2.1. Formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	8
3.3. Surfactantes.....	10
3.3.1. Tensão superficial.....	11
3.3.2. Concentração Micelar Crítica (CMC).....	13
3.3.3. Classificação dos surfactantes.....	14
3.3.4. Catiônicos.....	16
3.3.5. Aniônicos.....	17
3.3.6. Não iônicos.....	18
4. Material e Métodos.....	19
4.1. Preparo do inóculo.....	19
4.2. Preparo da superfície.....	20
4.3. Elaboração dos meios de cultivo.....	20
4.4. Análise da composição dos meios de cultivo.....	21
4.5. Formação do biofilme em aço inoxidável.....	21
4.6. Enumeração das células bacterianas aderidas.....	22
4.7. Avaliação do potencial de biotransferência.....	22
4.8. Preparo das soluções surfactantes.....	22
4.9. Ação dos surfactantes sobre células aderidas.....	24
4.10. Microscopia confocal de varredura a laser.....	24
4.11. Análise dos resultados.....	25
5. Resultados e discussão	25
5.1. Composição química dos meios de cultivo.....	25

5.2. Formação de biofilme em aço inoxidável por <i>P. aeruginosa</i> em diferentes meios de cultivo	26
5.3. Potencial de biotransferência de <i>P. aeruginosa</i>	27
5.4. Efeito de surfactantes na remoção do biofilme	29
5.5. Biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> observados por microscopia confocal de varredura a laser.....	32
6. Conclusão.....	35
7. Referências.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de formação do biofilme	4
Figura 2. Sequência de eventos da formação do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Figura 3. Tensão superficial em função da concentração de surfactante em solução.....	14
Figura 4. Estrutura química dos surfactantes.....	15
Figura 5. Estrutura química do cloreto de benzalcônio	16
Figura 6. Estrutura química do dodecilbenzeno sulfonato de sódio	17
Figura 7. Estrutura química do Tween 80 (Polissorbato 80)	18
Figura 8. Redução decimal (RD) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (log UFC·cm ⁻²), aderida em aço inoxidável cultivada em leite integral e caldo de vegetais, após tratamentos por 10 min de contato com diferentes concentrações de dodecilbenzeno sulfato de sódio (DBSS), cloreto de benzalcônio (CB) e Tween 80 (TW).....	30
Figura 9. Imagens de microscopia confocal de biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , sobre aço inoxidável formado por 72 h a 15 °C, em leite integral UHT, sem tratamento (A), e após aplicação de dodecilbenzeno sulfonato de sódio (B), cloreto de benzalcônio (C) e Tween 80 (D).	33
Figura 10. Imagens de microscopia confocal de biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , sobre aço inoxidável formado por 72 h a 15 °C, em caldo de vegetais, sem tratamento (A), e após aplicação de dodecilbenzeno sulfonato de sódio (B), cloreto de benzalcônio (C) e Tween 80 (D).	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de surfactantes e concentrações utilizadas para avaliação da remoção de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aderida em aço inoxidável AISI 304 # 4	23
Tabela 2. Composição química e pH do leite integral UHT e do caldo de vegetais.....	25
Tabela 3. Número de células sésseis (log UFC·cm ⁻²) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em aço inoxidável AISI 304 # 4, incubado a 15 °C em diferentes meios de cultivo.....	26
Tabela 4. Contagem de células planctônicas (log UFC·mL ⁻¹) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , em diferentes meios de cultivos, ao longo da formação do biofilme a 15 °C	27

RESUMO

ROCHA, Camila Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Controle de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável por surfactantes.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Biofilmes bacterianos formados em áreas de processamento de alimentos podem se tornar fonte de contaminação cruzada. Dessa forma, torna-se importante a correta manipulação das matérias-primas que chegam até a indústria, além do uso adequado de sanitizantes no processo de higienização de equipamentos e superfícies. Objetivou-se com este estudo avaliar a formação de biofilme e potencial de biotransferência de *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável, em contato com leite integral UHT e caldo de vegetais. E o efeito de três surfactantes, em concentrações abaixo, próxima e acima da concentração crítica de micelas, na redução de biofilmes. Cada meio de cultivo foi inoculado com *P. aeruginosa* ATCC 15442, distribuídos em poços de microplaca contendo cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 e incubados a 15 °C. O número de células aderidas foi determinado após 24, 48, 72, 96 e 120 h e o potencial de biotransferência a partir de 48 h. Soluções de cloreto de benzalcônio (CB), dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS) e Tween 80 foram avaliados sobre os biofilmes formados por 72 h. Cupons de aço, antes e após os tratamentos, foram observados por microscopia confocal de varredura a laser. Verificou-se que, apesar do leite integral conter maior concentração de nutrientes em relação ao caldo de vegetais, não houve diferença na formação de biofilme de *P. aeruginosa*. O potencial de biotransferência do micro-organismo aos meios de cultivo foi observado durante todo o período avaliado. As soluções surfactantes mostraram-se eficientes na redução do número de células aderidas com o aumento da concentração, principalmente o CB. Tween 80 e DBSS reduziram menos de 2 log UFC·cm⁻² de células viáveis, enquanto o CB reduziu até 6 log UFC·cm⁻². A partir dos resultados obtidos verificou-se que *P. aeruginosa* pode produzir biofilmes em superfície utilizada no processamento de alimentos, independente do tipo de resíduo alimentar

presente. Os surfactantes aplicados apresentaram melhor eficiência em concentrações mais elevadas, acima da crítica de micelas, e a classe desses agentes também contribuiu para a redução das células aderidas.

ABSTRACT

ROCHA, Camila Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Control of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* from stainless steel by surfactants.** Adviser: Nélío José de Andrade. Co-adviser: Wilmer Edgard Luera Peña.

Bacterial biofilms formed in food processing areas can become a source of cross-contamination. Thus, the correct handling of the raw materials coming into the industry becomes important, as well as the proper use of sanitizing in the cleaning process of equipment and surfaces. The aim of this study was to evaluate the biofilm formation and biotransferential potential of *Pseudomonas aeruginosa* in stainless steel, in contact with UHT whole milk and vegetable broth. Also, it was evaluated the effect of three surfactants at concentrations below, above and near the critical micelle concentration, in the reduction of biofilms. Each culture medium was inoculated with *P. aeruginosa* ATCC 15442, distributed in microplate wells containing stainless steel coupons AISI 304 # 4 and incubated at 15 °C. The number of adhered cells was determined after 24, 48, 72, 96 and 120 h and the potential of biotransference after 48 h. Benzalkonium chloride (BAC), sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS) and Tween 80 solutions were evaluated on biofilms formed for 72 h. Steel coupons, before and after treatments, were observed by confocal laser scanning microscopy. It was verified that, although the milk had higher concentration of nutrients in relation to the vegetable broth, there was no difference in the formation of *P. aeruginosa* biofilm. The biotransfer potential of the microorganism to the culture media was observed throughout the evaluated period. The surfactant solutions were efficient in reducing the number of cells adhered with the concentration increase, mainly of the BAC. Tween 80 and SDBS reduced less than 2 log CFU·cm⁻² of viable cells, while BAC reduced up to 6 log CFU·cm⁻². From the results obtained it was verified that *P. aeruginosa* can produce biofilms on the surface used in food processing, regardless of the type of food residue present. The applied surfactants presented better efficiency at higher concentrations,

above the critical micelle, and the class of these agents also contributed to the reduction of the adhered cells.

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo ubíquo, que pode estar associado à contaminação de alimentos em diferentes estágios da cadeia produtiva, desde a produção da matéria-prima até o produto final. Dessa forma, as matérias-primas contaminadas que chegam até indústria alimentícia representam um grande problema de contaminação cruzada. Esse micro-organismo pode contaminar as superfícies e sob condições favoráveis iniciar o processo de adesão e formação biofilmes.

Os biofilmes são agregados de células que se aderem às superfícies, multiplicam-se e produzem uma matriz viscosa de substâncias poliméricas extracelulares, que protegem as células. Caso esses biofilmes não forem removidos adequadamente por procedimentos de higienização, parte deles pode se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios. As células desprendidas dos biofilmes são importantes fontes de contaminação que alteram a qualidade e segurança dos alimentos.

Portanto, torna-se muito importante a correta manipulação das matérias-primas que chegam até a indústria, além do uso correto e adequado de produtos sanitizantes no processo de higienização de equipamentos e superfícies.

Os surfactantes são substâncias químicas que possuem propriedades tensoativas, emulsificantes e atuam como agentes de molhagem. Esses compostos são capazes de adsorver em superfícies e interfaces e diminuir a tensão superficial de fluidos aquosos. Essa característica é importante nos processos de higienização, visto que permite melhor contato entre os agentes de limpeza e os resíduos a serem removidos.

Os surfactantes possuem outra característica importante que é a capacidade de formar micelas em solução aquosa. Quando as moléculas ocupam toda a superfície do líquido, começam a formar agregados e atingem uma concentração micelar crítica (CMC). Assim, as moléculas de surfactante se comportam de duas maneiras em solução aquosa, como monômeros livres ou micelas. Dessa forma, ainda não é bem elucidado em qual concentração, se

abaixo ou acima da CMC, que esses compostos possuem a melhor capacidade como agentes de limpeza.

Considerando todas as propriedades dos surfactantes, torna-se relevante estudar a ação desses compostos como agentes de sanitização sobre biofilmes formados em condições similares de ambientes de processamento de alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de surfactantes sobre biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável quando cultivado em diferentes meios de cultivo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em aço inoxidável quando cultivado em leite integral UHT e caldo de vegetais, em temperatura de abuso para produtos refrigerados;
- Avaliar o potencial de biotransferência de *P. aeruginosa* aderida em aço inoxidável para os meios de cultivo (leite integral UHT e caldo de vegetais);
- Avaliar o efeito de surfactantes em concentrações abaixo, próximas e acima da concentração micelar crítica na redução de células de *P. aeruginosa* em um biofilme pré-formado;
- Visualizar as células aderidas por microscopia confocal de varredura a laser, antes e após a aplicação dos surfactantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biofilmes bacterianos

Biofilmes bacterianos referem-se à forma de vida microbiana sésil, em que as células dos micro-organismos estão aderidas em uma superfície sólida e protegidas por uma matriz viscosa, devido à auto-produção de substâncias poliméricas extracelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010; VERT et al., 2012).

A formação do biofilme consiste em um processo dinâmico que pode ser descrito por uma sequência de etapas: (i) condicionamento ou adsorção da superfície, através do contato de células planctônicas e resíduos alimentares; (ii) adesão reversível dos micro-organismos à superfície, pela ação de forças atrativas e repulsivas, incluindo as forças de van der Waals e forças eletrostáticas; (iii) adesão irreversível, que ocorre quando as forças atrativas são maiores do que as forças repulsivas; e início da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS); (iv) produção de moléculas químicas sinalizadoras, multiplicação celular e síntese intensa de EPS; (v) maturação do biofilme e formação de microcolônias; (vi) desprendimento de células do biofilme, pela dispersão do mesmo, retornando ao estilo de vida planctônico e colonização de outros nichos (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; ABDALLAH et al., 2014) (Figura 1).

A matriz de EPS secretada pelas bactérias no biofilme inclui uma diversidade de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e lipoproteínas (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010), porém a maior parte da biomassa do biofilme compreende EPS hidratado em vez de células microbianas (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Os biofilmes são constituídos principalmente por água (95 %) e a maior parte da matéria orgânica constitui-se de EPS e micro-organismos (SUTHERLAND, 2001).

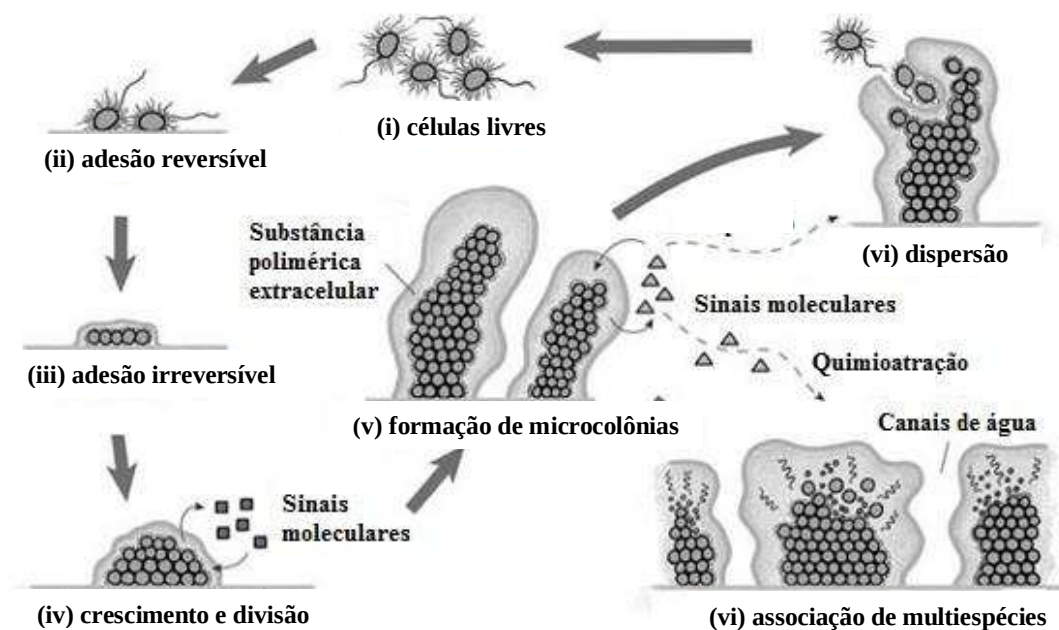


Figura 1. Etapas de formação do biofilme

Fonte: Adaptado Harrison et al. (2005)

A auto-organização das moléculas de EPS no biofilme baseia-se em interações intermoleculares entre os componentes do EPS, que também determinam as propriedades mecânicas da matriz e a atividade fisiológica dos organismos no biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A matriz de EPS é importante para a formação da arquitetura do biofilme, um processo contínuo e dinâmico que produz uma organização espacial na qual as células do biofilme se agrupam em microcolônias (NEU; LAWRENCE, 2015). A morfologia resultante pode ser lisa e plana, áspera ou filamentosa, e o biofilme também pode variar em seu grau de porosidade, tendo macrocolônias tipo cogumelo rodeadas por canais de água. Todas essas morfologias possuem o mesmo efeito de imobilizar as células no biofilme e permitir a existência de microconsórcios estáveis, desenvolver gradientes físico-químicos, apresentar transferência horizontal de genes e intensa comunicação célula-célula; isto oferece habitats muito diversos em pequena escala, contribuindo com a biodiversidade no biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A comunicação célula-célula ocorre através de sinais químicos moleculares, na qual envolve a produção, liberação, detecção e resposta a pequenas moléculas denominadas auto-indutores. Este processo, conhecido

como *quorum sensing*, permite que as bactérias monitorem o ambiente em relação a outras bactérias e alterem o comportamento em escala populacional em resposta a mudanças no número e/ou espécies presentes na comunidade (WATERS; BASSLER, 2005).

Os mecanismos de *quorum sensing* controlam várias funções, como virulência, desenvolvimento do biofilme, produção de compostos antimicrobianos e vários outros metabólitos secundários (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010). Etapas de formação do biofilme como o crescimento e divisão, formação de microcolônias, associação de multiespécies e desprendimento de células são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

De modo geral, diversos fatores são responsáveis pela adesão de micro-organismos em superfícies e desenvolvimento do biofilme. As propriedades das células, particularmente a presença de apêndices extracelulares e hidrofobicidade, são importantes no processo de adesão (SALUSTIANO et al., 2010; DI CICCIO et al., 2015). Características da superfície, como hidrofobicidade, rugosidade, propriedades químicas, são capazes de influenciar a adesão bacteriana (SALUSTIANO et al., 2010; TONDO et al., 2010; BERNARDES et al., 2012a), assim como condições ambientais de temperatura, velocidade do fluido e concentração de nutrientes (BOARI et al., 2009; BERNARDES et al., 2012a; ABDALLAH et al., 2015b; DI CICCIO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016; YANG et al., 2016).

3.1.1. Biofilme na indústria de alimentos

As principais fontes de contaminação no setor alimentício são provenientes da água, matérias-primas, poeira, equipamentos mal dimensionados, manipuladores de alimentos, entre outros. Além disso, a formação de biofilmes bacterianos em superfícies e equipamentos pode constituir uma fonte de contaminação contínua, em virtude do acúmulo de resíduos orgânicos e procedimentos de higienização inadequados (ABDALLAH et al., 2014).

Os biofilmes bacterianos são capazes de reduzir a eficiência e vida útil de equipamentos e tubulações, em função do fenômeno de corrosão microbiologicamente induzida (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). Além disso, parte do biofilme pode desprender-se e contaminar os produtos alimentícios, acarretando na diminuição da vida de prateleira, risco para a saúde do consumidor e perdas econômicas para a indústria (BATISTA et al., 2014).

Para reduzir o risco microbiológico relacionado à formação do biofilme, é necessário compreender melhor como os micro-organismos se aderem e formam biofilmes quando expostos a condições que simulam ambientes de processamento de alimentos. A utilização de meios alimentares líquidos e/ou sólidos como substrato para avaliar o crescimento microbiano (em forma planctônica ou séssil) pode ser útil para obter resultados mais realistas do que o uso de meios laboratoriais, o que leva em consideração a disponibilidade de nutrientes dos alimentos e sua interação com o ambiente (BOARI et al., 2009; MALHEIROS et al., 2010; BERNARDES et al., 2012a; CAIXETA et al., 2012; MEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

Bernardes et al. (2012a) verificaram que *Enterobacter sakazakii* foi capaz de formar biofilme em aço inoxidável na presença de leite integral UHT, leite à base de chocolate e fórmula infantil, e que o pré-condicionamento das superfícies com esses produtos lácteos alterou suas características hidrofóbicas e tornou-as hidrofílicas. Caixeta et al. (2012) observaram que a temperatura de incubação influenciou na capacidade de adesão e formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável na presença de leite desnatado reconstituído. *P. aeruginosa* apresentou melhor adesão quando cultivada em sua temperatura ótima de crescimento, a 28 °C, do que em 7 °C, enquanto *P. fluorescens* não se adaptou bem às condições submetidas (4 °C e 7 °C).

Souza et al. (2014) avaliaram a formação de biofilmes por isolados de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno quando cultivados em caldo de carne a 7 °C e 28 °C, indicando a formação de biofilme em ambas as superfícies independente da temperatura, e que maior intensidade de formação de biofilme foi a 28 °C. Malheiros et al. (2010)

estudaram a adesão de *S. aureus* em contato com carne de aves, em polietileno e aço inoxidável, e observaram que as superfícies foram colonizadas por contagens expressivas do micro-organismo transferido da carne de aves, mesmo com curtos períodos de contato (10 s e 10 min).

Compreender os processos de formação, estrutura e composição dos biofilmes microbianos é fundamental para desenvolver estratégias de controle efetivas e entender o risco que estes representam para a indústria de alimentos (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). Portanto, o uso adequado e eficiente de sanitizantes físicos ou químicos em equipamentos pode prevenir a formação de biofilmes e/ou reduzir a contaminação por micro-organismos, e manter a qualidade dos alimentos. No entanto, como a eliminação de biofilmes em superfícies é um procedimento difícil, o processo de higienização deve ser analisado como um todo, otimizando os resultados e minimizando os custos (CAIXETA et al., 2012).

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família das Pseudomonadaceae, são bastonetes gram-negativos, aeróbios, não fermentativos, catalase e oxidase positiva, não formadores de esporos (ALLYDICE-FRANCIS; BROWN, 2012; CALDERA et al., 2016). São micro-organismos ubíquos, presentes principalmente no solo, água, plantas, alimentos e outras áreas úmidas (ABDALLAH et al., 2014). Possuem requerimentos nutricionais simples e crescem em pH neutro e temperatura na faixa mesofílica. No entanto, a temperatura ótima de crescimento da maior parte das estirpes é de aproximadamente 28 °C (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016).

Os membros deste gênero estão frequentemente implicados na degradação e deterioração de uma vasta gama de alimentos derivados de vegetais ou animais (CALDERA et al., 2016).

A má qualidade microbiológica do leite cru está diretamente relacionada com a higienização inadequada durante a ordenha, problemas de saúde da glândula mamária, contaminação ambiental através de água e solo, condições de armazenamento e transporte (FERNANDES et al., 2009; MARCHAND et al.,

2012; MACHADO et al., 2017). A menor vida útil dos produtos lácteos pode ser consequência do alto potencial proteolítico e lipolítico da microbiota psicrotrófica dominante do leite cru, incluindo bactérias do gênero *Pseudomonas* (MACHADO et al., 2015). Muitas enzimas produzidas por *Pseudomonas*, em particular as proteases, são resistentes ao calor, o que resulta na manutenção da atividade após processos de tratamento térmico utilizados em determinados alimentos (CALDERA et al., 2016). Esse fenômeno é muito importante em leite UHT, pois a proteólise das micelas de caseína pode levar a coagulação do produto (MACHADO et al., 2017).

Espécies do gênero *Pseudomonas* também são importantes contaminantes de vegetais frescos. Essa contaminação pode ocorrer no campo, durante a colheita, processamento e distribuição. A água e a utilização de adubos compostados inadequadamente são importantes fontes de contaminação no campo. Os processos pós-colheita, que vão desde o armazenamento e enxaguamento até o corte, são também possíveis fontes de contaminação (ALLYDICE-FRANCIS; BROWN, 2012).

Estudo realizado por Caldera et al. (2016) indicou que diferentes alimentos (vegetais prontos para comer, carnes, leite, produtos lácteos) abrigam uma grande diversidade de espécies de *Pseudomonas*. Todos os isolados apresentaram a capacidade de crescer à baixa temperatura e produzir enzimas e/ou pigmentos que podem alterar os produtos alimentares. Os autores enfatizam a importância das espécies de *Pseudomonas* como organismos de deterioração psicrotrófica de todos os tipos de produtos alimentares armazenados a frio e a importância da aplicação de sistemas de garantia de qualidade ao longo da cadeia alimentar para prevenir a deterioração prematura causada por esses micro-organismos.

3.2.1. Formação de biofilme por *P. aeruginosa*

No contexto da formação de biofilmes em pesquisas *in vitro*, *P. aeruginosa* tem sido um organismo modelo (HARMSSEN et al., 2010; GHAFLOOR; HAY; REHM, 2011; MANN; WOZNIAK, 2012), onde o desenvolvimento do mesmo e a resistência aos sanitizantes variam de acordo

com as condições nutricionais e ambientais (CAIXETA et al., 2012; ABDALLAH et al., 2015b).

P. aeruginosa forma biofilme por meio da produção de polissacarídeos específicos que aumentam a sua patogenicidade e dificultam a penetração de antibióticos. O *quorum sensing* desencadeia a expressão de um subgrupo de genes necessários para a formação do biofilme (Figura 2). As células de *P. aeruginosa* possuem dois sistemas *quorum sensing* diferentes, Las e Rhl, que respondem às acil-homoserinas lactonas (AHLs) específicas e ativam a transcrição de genes que codificam EPS à medida que o número de células aumenta (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016).

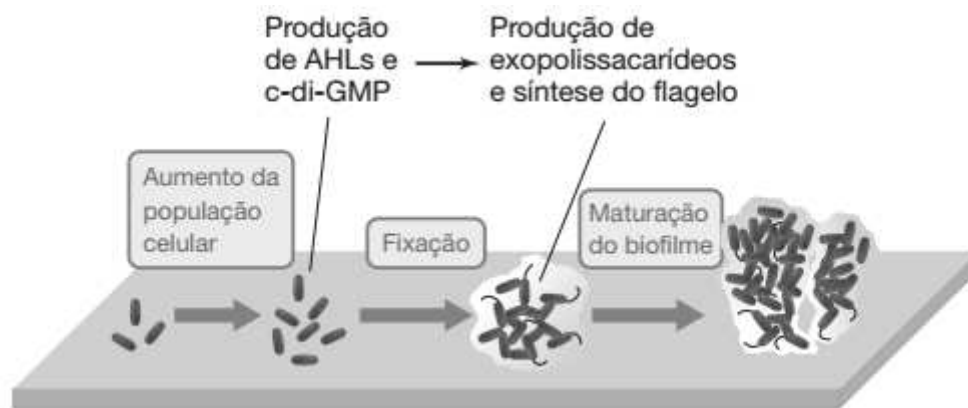


Figura 2. Sequência de eventos da formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*
Fonte: Madigan; Martinko; Bender (2016)

A sinalização intracelular também desempenha um papel na formação do biofilme de *P. aeruginosa*. Um segundo mensageiro importante na arquitetura do biofilme é o nucleotídeo di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP). Níveis intracelulares baixos de c-di-GMP promovem motilidade, enquanto altos níveis intracelulares induzem a formação de componentes da matriz de comunicação célula-célula e promovem a formação de microcolônias (HARMSEN et al., 2010; MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016).

A síntese ou degradação do c-di-GMP depende dos estímulos ambientais e celulares, e sua síntese causa numerosas mudanças fisiológicas e expressão de genes de virulência. Proteínas efetoras que se ligam ao

c-di-GMP participam de diversas atividades, como a produção de EPS, motilidade, regulação transcricional e localização proteica (tanto secretada quando na superfície celular) (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016).

Pelo menos três EPS, alginato, Psl (*Polysaccharide synthesis locus*) e Pel (*Pellicle*), contribuem para o desenvolvimento e arquitetura do biofilme de *P. aeruginosa*. O alginato é um heteropolímero constituído por ácidos urônicos, contribui para a estabilidade estrutural e proteção de biofilmes, bem como para a retenção de água e nutrientes. Pel é um polissacarídeo rico em glicose, essencial para a formação de biofilmes nas interfaces ar-líquido e biofilmes que estão aderidos em uma superfície. Psl é pentassacarídeo consistindo em monômeros repetidos de D-manose, L-ramnose e D-glicose, o qual está envolvido na aderência às superfícies abióticas e bióticas e na manutenção da arquitetura do biofilme (MA et al., 2009; FLEMMING; WINGENDER, 2010; FRANKLIN et al., 2011).

Em estudo realizado por Ghafoor, Hay e Rehm (2011), foi observado que *P. aeruginosa* forma biofilmes com estrutura característica de cogumelo quando produz Psl e alginato, enquanto Pel possui uma função na densidade das células e/ou na compactação do biofilme. Mutantes que produzem apenas alginato, isto é, deficientes na produção de Psl e de Pel, perderam sua capacidade para formar biofilmes. A falta de Psl aumentou a produção de Pel e a ausência de Pel aumentou a produção de alginato, enquanto a função de Psl na adesão foi independente do alginato e Pel.

3.3. Surfactantes

A palavra “surfactante” é uma abreviação de “surface active agent”, que significa “agente ativo de superfície”. Os surfactantes são substâncias caracterizadas pela tendência de adsorver em superfícies e interfaces, e sua capacidade de reduzir a tensão superficial dos fluidos. O termo interface refere-se ao limite entre duas fases imiscíveis (BARROS et al., 2007; FARN, 2007). Em meios aquosos, as moléculas de surfactante migram para as interfaces ar/água e sólido/água e se orientam de modo a minimizar o contato entre os

seus grupos hidrofóbicos e a água. Este processo é referido como "adsorção" e resulta em uma mudança nas propriedades na interface (FARN, 2007).

Os surfactantes são moléculas anfífilas que contêm duas regiões distintas: a hidrofóbica, grupo que repele a água (apolar), e a hidrofílica, grupo que atrai a água (polar). Tais características tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BARROS et al., 2007; FARN, 2007; DALTIM, 2011).

Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos, encontram-se como estratégia no controle da contaminação microbiana (BRANDL; HUYNH, 2014; TOUTAIN-KIDD et al., 2009). A natureza química desses compostos provoca alteração de propriedades das superfícies submersas, diminuindo sua tensão superficial, evitando a adesão de micro-organismos e promovendo a separação destes micro-organismos da superfície de adesão (SIMÕES, 2005).

3.3.1. Tensão superficial

A tensão superficial ocorre nos líquidos pelo desequilíbrio das forças de atração entre as moléculas no interior da solução e da superfície (DALTIM, 2011). As interações intermoleculares no interior de um líquido são uniformes em todas as direções, enquanto que as moléculas na superfície do líquido estão amplamente espaçadas e realizam um número menor de interações. A força resultante que atrai as moléculas da superfície de um líquido para o seu interior torna-se o principal obstáculo para a formação de bolhas, gotas e a nucleação de cristais em líquidos. Devido a esta força, a superfície do líquido tende a ocupar uma área de superfície mínima, o que faz com que as gotas adotem a forma esférica, que é a forma com a menor razão superfície/volume (FARN, 2007).

A tensão superficial é uma propriedade termodinâmica e pode ser medida sob temperatura e pressão constantes e seu valor representa a quantidade de trabalho requerida por unidade de área para criar maior área

superficial. Na tensão superficial é medida a energia livre por unidade de área da superfície entre o líquido e o ar ($\text{erg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ou $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$). A tensão superficial também pode ser quantificada como a força que atua à interface por unidade de comprimento da superfície em equilíbrio ($\text{dina}\cdot\text{cm}^{-1}$ ou $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) (FARN, 2007).

Em geral, a importância da tensão superficial está relacionada com o que se convencionou chamar de “molhabilidade”. Assim, quanto menor a tensão superficial maior a facilidade para um líquido se espalhar (BEHRING et al., 2004). A tensão superficial é alta em líquidos muito polares, como a água. A água, ao contrário do que parece, não molha bem a superfície, pois apresenta alta tensão superficial, equivalente a $72 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ (BERNARDES et al., 2012b). Esse alto valor está associado à presença de grande número de forças de dipolo forte e pontes de hidrogênio, forças de atração de grande magnitude entre as moléculas (DALTIM, 2011).

Para um processo de higienização mais eficiente, a alta tensão superficial da água deve ser diminuída a valores de $36 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ para otimizar o contato entre o agente detergente e o resíduo a ser removido. Por isso, numa superfície onde se encontram resíduos de gordura, a água apresenta-se na forma de gotículas, pois a atração entre as moléculas da água é maior do que aquela entre as moléculas de água e as de gordura (ANDRADE, 2008). Essa diminuição da tensão superficial da água pode ser conseguida com o uso de surfactantes.

Os surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial mesmo que em baixas concentrações. A tensão superficial ou interfacial diminui com o aumento da concentração de surfactante até a sua concentração micelar crítica (CMC). Abaixo da CMC as moléculas de surfactante estão na forma monomérica, e em concentrações superiores às da CMC, o surfactante excedente tende a formar micelas no interior da solução, as quais praticamente têm pouco efeito sobre o valor da tensão superficial (FARN, 2007; DALTIM, 2011).

3.3.2. Concentração Micelar Crítica (CMC)

Quando os surfactantes estão em solução, ocupam preferencialmente a superfície do líquido, devido à presença do grupo lipofílico, fazendo com que diminua as forças de coesão entre as moléculas do solvente e, conseqüentemente, diminuindo a tensão superficial. Após saturar a superfície, a adição de novas moléculas de surfactante não provocam mais variações sobre a tensão superficial, principalmente após atingirem a concentração crítica, onde se formam agregados moleculares, chamados de micelas (BEHRING et al., 2004).

A concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC), que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. A formação das micelas pode ser vista como um mecanismo alternativo à adsorção em interfaces, mediante o isolamento do contato com a água dos grupos hidrofóbicos, reduzindo a energia livre do sistema. É um fenômeno considerado de grande importância uma vez que as moléculas de surfactante se tornam muito diferentes quando presentes em micelas ou unidades livres em solução (RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009).

As micelas são esferas de agregados de moléculas caracterizadas por um núcleo hidrofóbico e uma superfície externa hidrofílica. A parte polar da micela encontra-se em contato com a água e a parte apolar no interior da micela. Dessa forma, quando um surfactante é adsorvido, em solução aquosa, a superfície hidrofóbica normalmente orienta o grupo hidrofóbico para a superfície e expõe o grupo polar à água. A superfície torna-se assim hidrofílica e, como resultado, a tensão interfacial entre a superfície e a água é reduzida (DALVIN, 2011).

Quando se mede a tensão superficial de uma solução aquosa com a variação da concentração de um surfactante pode-se obter um gráfico como mostrado na Figura 3.

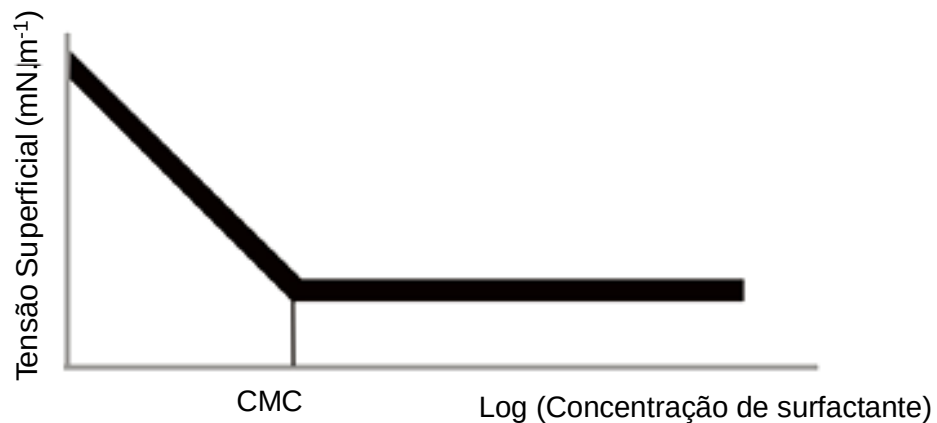


Figura 3. Tensão superficial em função da concentração de surfactante em solução
Fonte: Andrade (2008)

A tensão superficial diminui com o aumento da concentração de surfactante, pois este está ocupando a superfície entre o líquido e o ar (e também a interface líquido-sólido). Enquanto houver espaço na superfície líquido-ar, o aumento da concentração de surfactante proporciona maior preenchimento dessa superfície, continuando a diminuir a tensão superficial da solução. Quando a superfície líquido-ar estiver totalmente ocupada, o aumento da concentração de surfactante não provocará mais redução da tensão superficial. A partir da concentração em que não há mais redução da tensão superficial, as moléculas do surfactante passam distribuir no meio da solução, dando início para a organização de micelas dentro da solução (DALTIM, 2011).

3.3.3. Classificação dos surfactantes

De acordo com a estrutura química dos grupos polares, os surfactantes podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros, onde a carga elétrica liberada em solução aquosa pode ser um ânion, um cátion, não tenha carga ou contenha dois grupos de carga de diferente sinal, respectivamente (Figura 4). A classe da molécula de surfactante descreve suas propriedades físico-químicas e sua aplicação (DALTIM, 2011; FARN, 2007; IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

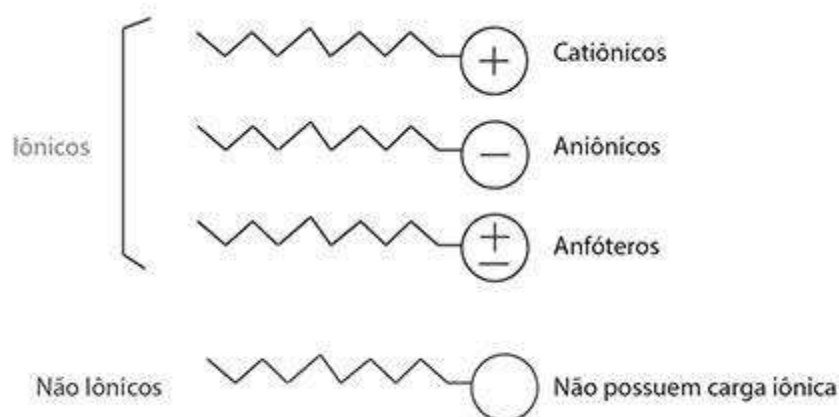


Figura 4. Estrutura química dos surfactantes

Fonte: Silva (2008)

Os surfactantes aniônicos constituem a maior classe de tensoativos e a mais utilizada pela indústria em geral, pois nessa classe encontram-se os componentes principais dos sabões, sabonetes, xampus e detergentes (DALTIM, 2011). A parte hidrofóbica da molécula é usualmente uma cadeia alquílica de comprimento variável, éter alquílfenílico ou alquílbzeno, e a parte hidrofílica é carboxilo, sulfato, sulfonato ou fosfato (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

Os surfactantes catiônicos são representados principalmente pelos compostos quaternários de amônio (QACs), que contêm pelo menos uma cadeia hidrocarbonada hidrofóbica ligada a um átomo de nitrogênio carregado positivamente (DALTIM, 2011). Possuem um amplo uso comercial e doméstico numa variedade de produtos, tais como cosméticos, soluções antissépticas, acabamentos têxteis e amaciantes de tecidos (LUCCHESI et al., 2010).

Os surfactantes não iônicos não se dissociam em íons em solução aquosa e, por isso, são compatíveis com qualquer outro tipo de tensoativo. A parte hidrofóbica geralmente é um derivado de fenol alquilado, ácido graxo ou álcool linear de cadeia longa, e a parte hidrofílica é geralmente uma cadeia de óxido de etileno de vários comprimentos. Os surfactantes não iônicos são amplamente utilizados como emulsionantes, agentes molhantes e agentes de estabilização de espuma (DALTIM, 2011; IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

3.3.4. Catiônicos

Os surfactantes catiônicos dissociam-se em grandes cátions orgânicos e em um simples ânion inorgânico. São geralmente sais de aminas graxas ou poliaminas. Os compostos quaternários de amônia (QAC) são os maiores representantes dessa classe. Suas moléculas apresentam uma cadeia carbônica ligada a um átomo de nitrogênio carregado positivamente, outros grupos alquil tais como grupos metila ou benzila atuando como substituintes (DALTIM, 2011, IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010). O cloreto de benzalcônio (Figura 5) é um QAC, amplamente utilizado como agente ativo de superfície para sanitização em linhas e superfícies de processamento de alimentos (FAZLARA; EKHTLAT, 2012).

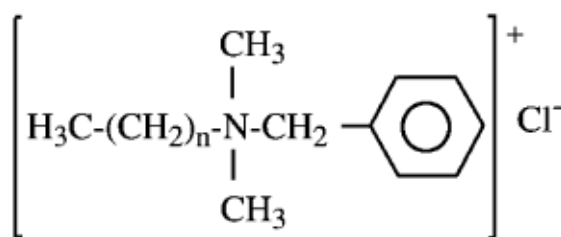


Figura 5. Estrutura química do cloreto de benzalcônio

Fonte: Daltin (2011)

O modo antimicrobiano dessa classe de compostos é proposto por alguns autores como uma sequência de eventos: atração pela superfície negativamente carregada da célula microbiana; adsorção e penetração na parede celular por interação iônica com fosfolipídios; reação com os lipídios e proteínas que compõem a membrana citoplasmática e consequentemente sua desorganização; extravazamento de material intracelular de baixo peso molecular; degradação de proteínas e ácidos nucleicos (PAULUS, 2005; LUCCHESI et al., 2010). Assim, danificam as camadas externas das bactérias, alterando a permeabilidade da membrana e promovendo a liberação de compostos importantes, como o potássio (K^+) (FERREIRA et al., 2011).

Os QACs são utilizados como desinfetantes devido à sua atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, bem como

contra algumas espécies patogênicas de fungos e protozoários (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010). Possuem a vantagem de ser de fácil preparo e aplicação, e neutralizam odores. O custo desse composto é elevado, pouco eficiente em meio ácido e em contato com proteínas (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

3.3.5. Aniônicos

Surfactantes aniônicos, entre os quais os alquil sulfonatos, constituintes principais de detergentes sintéticos, são amplamente utilizados em vários processos industriais, tais como em indústrias de papel, cosméticos, processamento de alimentos, lavanderia e lavagem de veículos (TAFFAREL; RUBIO, 2010). Estes compostos foram introduzidos em 1964 como a substituição biodegradável para sulfonatos de alquilbenzeno altamente ramificados (ECOLAB, 2015).

Os surfactantes aniônicos apresentam-se como sais alcalinos ou amina de ácidos graxos de cadeia longa ou alceno sulfonatos; em solução aquosa se dissociam a um grande ânion, responsável pelas fortes propriedades detergentes, e por um pequeno cátion (PAULUS, 2005).

Os sulfonatos de alquilbenzeno, como o dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS) (Figura 6), são utilizados em grande parte como desinfetantes de contato com alimentos em plantas de processamento de alimentos e estabelecimentos de alimentação. Pode ainda ser utilizado como um ingrediente ativo em formulação antimicrobiana para uso em lavagem de frutas e vegetais (ECOLAB, 2015).

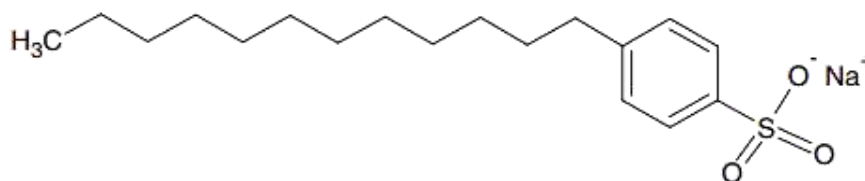


Figura 6. Estrutura química do dodecilbenzeno sulfonato de sódio

Fonte: Daltin (2011)

O DBSS é um surfactante aniônico com maior poder de diminuição da tensão superficial e atinge a CMC em concentração menor do que o dodecil sulfato de sódio (SDS). Para atingir uma tensão superficial de $36 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ com o SDS é necessária uma concentração de $2360 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BEHRING et al., 2004), enquanto que $620 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de DBSS já é suficiente para se obter uma tensão superficial de $35,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (ZHU et al., 2012).

A atividade antimicrobiana do DBSS está relacionada com a desnaturação de proteínas, inativação de enzimas essenciais e alteração da permeabilidade da membrana celular (ECOLAB, 2015). São capazes de ligar-se a macromoléculas bioativas tais como peptídeos, enzimas e DNA. A ligação a proteínas e peptídeos pode alterar a dobragem da cadeia polipeptídica e a carga superficial da molécula (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

3.3.6. Não iônicos

Em compostos surfactantes não iônicos o grupo hidrofílico consiste normalmente numa cadeia de unidades de óxido de etileno (compostos etoxilados). Derivados de sorbitano, tais como polissorbatos (Tweens) são outros exemplos de agentes não iônicos (Figura 7) (PAULUS, 2005).

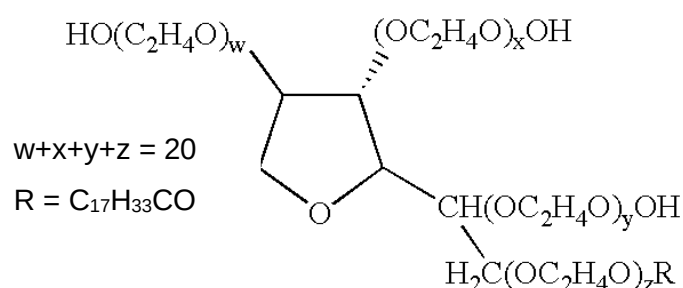


Figura 7. Estrutura química do Tween 80 (Polissorbato 80)

Fonte: Daltin (2011)

Os surfactantes da série Tween apresentam emprego variado. Tween é o nome comercial dado aos surfactantes derivados do polioxietileno sorbitol,

onde o número de grupos de polioxietileno é constante, variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos. Dentro dessa série, podem ser encontrados Tween 20, Tween 40 e Tween 80, derivados dos ácidos láurico, palmítico e oleico, respectivamente (BHAIRI; MOHAN, 2007).

A atividade superficial de surfactantes não iônicos deriva de um equilíbrio entre estruturas hidrofóbicas e hidrofílicas contidas na molécula de tensoativo. Não se dissociam em íons na solução aquosa, onde a solubilidade destas substâncias é proporcionada pelos seus grupos de cabeça polar (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

Esses compostos exercem atividade antimicrobiana por ligação a várias proteínas e membranas de fosfolípídios. Tal ligação aumenta a permeabilidade das membranas e vesículas, provocando vazamento de compostos de baixa massa molecular. Isto pode resultar em morte celular ou danos através da perda de íons ou aminoácidos (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010). São capazes de reduzir a adesão bacteriana e inibir a formação de biofilme sobre uma variedade de superfícies (BRANDL; HUYNH, 2014; TOUTAIN-KIDD et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.1. Preparo do inóculo

Estudou-se a estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, pertencente ao Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos - DTA/UFV. A cultura estoque conservada à temperatura de - 80 °C em tubos de tampa apegada contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi®) e

glicerol 30 % (v/v) foi ativada antes da realização dos testes. A cultura foi repicada por duas vezes consecutivas em caldo BHI, por incubação a 28 °C por 24 h. Posteriormente alíquotas de 1 mL da cultura foram transferidas para tubos esterilizados e centrifugados a 5000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspendido com água peptonada 0,1 % (m/v). A cultura bacteriana foi padronizada para $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ em espectrofotômetro $A_{600nm} = 0,95$.

4.2. Preparo da superfície

No ensaio de capacidade de adesão das células bacterianas foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4, dimensões de 10 x 10 x 1 mm. Antes de cada experimento, os cupons foram higienizados por meio de escovação empregando-se água e detergente neutro líquido, rinsados com água destilada e imersos em álcool etílico 70 % (v/v) por 1 h. Em seguida, foram rinsados novamente com água destilada, secados ao ar e esterilizados a 121 °C por 15 min (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

4.3. Elaboração dos meios de cultivo

Dois meios de cultivo alimentares foram utilizados para promover o crescimento microbiano e a formação de biofilme: leite integral UHT e caldo base de vegetais.

Para a preparação do caldo base vegetal foi utilizado 300 g de uma mistura de vegetais (alface, tomate, cenoura, 1:1:1). Primeiramente os vegetais foram higienizados com solução de dicloroisocianurato de sódio a 200 mg·L⁻¹ de cloro residual livre (pH 6,8) por 15 min. Posteriormente foram homogeneizados com 600 mL de água destilada esterilizada com auxílio de um misturador doméstico e filtrada à vácuo com papel de filtro Whatman nº1. Em seguida, o filtrado foi esterilizado utilizando filtro Milipore 0,45 µm. O caldo obtido foi armazenado a - 20 °C em alíquotas de 10 mL e quando necessário foi descongelado sob refrigeração a 7 °C ± 1 °C e utilizado para os ensaios experimentais (MEIRA et al., 2012).

4.4. Análise da composição dos meios de cultivo

O leite e o caldo base de vegetais foram caracterizados com relação a sua composição química (umidade, proteína, gordura, cinzas e carboidrato) e valor de pH, de acordo com os procedimentos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A concentração de proteínas e lipídeos para o leite integral UHT foi obtida considerando os valores fornecidos pelo fabricante na embalagem do produto.

A determinação de umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa a 105 °C, até peso constante. Para quantificação de proteínas utilizou-se o método de Kjeldahl, multiplicando o fator 5,75 pela porcentagem de nitrogênio para o caldo base de vegetais. Para a determinação do conteúdo de lipídeos procedeu-se pelo método de Bligh & Dyer, utilizando solução de metanol:clorofórmio:água (2:1:0,8) e solução de sulfato de sódio 1,5 % (m/v). As cinzas foram analisadas por incineração em mufla a 550 °C. Os carboidratos foram obtidos pela diferença entre os valores de umidade, proteína, lipídeo e cinzas, totalizando 100 % da amostra. O pH foi determinado com o auxílio de um potenciômetro de bancada (LUCA-210; Lucadema®) previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do fabricante.

4.5. Formação do biofilme em aço inoxidável

O processo de formação de biofilme por *P. aeruginosa* em aço inoxidável foi conduzido em contato com leite integral UHT e caldo de vegetais para estudar seu comportamento durante 120 h de cultivo a 15 °C. Cupons de aço inoxidável foram colocados em poços de microplaca de poliestireno de 24 poços (Kasvi®), adicionou-se 1 mL do meio de cultivo inoculado com $1,0 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹ da cultura padronizada e incubados a 15 °C por 24 h. Após o período de incubação, os cupons foram retirados dos poços, lavados com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85 % (m/v) para remover as células não aderidas, e colocados em outro poço cotendo 1 mL do meio de cultivo sem inóculo bacteriano. Esse processo foi repetido por cinco vezes, completando

um período de 120 h, e a cada intervalo de incubação, cupom de cada tratamento foi submetido à enumeração das células aderidas (item 4.6).

4.6. Enumeração das células bacterianas aderidas

O número de células bacterianas aderidas aos cupons de aço inoxidável foi determinado após 24, 48, 72, 96 e 120 h de cultivo. Cada cupom foi lavado por três vezes com solução NaCl 0,85 % (m/v), posteriormente imerso em 5 mL de solução NaCl 0,85 % (m/v) e sonicados por 10 min utilizando banho de ultrassom (frequência 40 kHz; potência 160 W; Branson®) para o desprendimento das células aderidas na superfície (MALHEIROS et al., 2010). Diluições apropriadas foram preparadas em água peptonada 0,1 % (m/v), plaqueadas pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em ágar Cetrimide (Himedia®) e incubadas a 28 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em log UFC·cm⁻² (CARELI et al., 2009).

4.7. Avaliação do potencial de biotransferência

Após 48 h, antes da troca de cada meio de cultivo, foi realizada a contagem de células planctônicas para determinar o potencial de biotransferência das células aderidas para o meio. Esse procedimento foi repetido nos tempos 72, 96 e 120 h. Para tanto, alíquotas foram retiradas e diluídas em água peptonada 0,1 % (m/v), plaqueadas pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em ágar Cetrimide, incubadas a 28 °C por 24 h, e os resultados expressos em log UFC·mL⁻¹.

4.8. Preparo das soluções surfactantes

Utilizou-se nesse experimento três diferentes surfactantes: cloreto de benzalcônio (CB), dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS) e Tween 80, em cinco concentrações cada, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de surfactantes e concentrações utilizadas para avaliação da remoção de *Pseudomonas aeruginosa* aderida em aço inoxidável AISI 304 # 4

Surfactantes	Marca	Concentração (mg·L ⁻¹)
Cloreto de benzalcônio	Vetec®	800
		1200
		1800
		2200
		2800
Dodecilbenzeno sulfonato de sódio	Sigma®	100
		300
		600
		900
		1200
Tween 80	Sigma®	5
		10
		15
		30
		60

Inicialmente, foram preparados 500 mL de solução estoque na concentração mais alta de cada tipo de surfactante em água destilada esterilizada, entre 20 °C e 25 °C. A partir de cada solução mais concentrada, foram preparadas por diluição as demais concentrações de trabalho (CARELI, 2009).

O critério de seleção dessas concentrações foi realizado de modo a avaliar as diferentes soluções surfactantes em concentrações inferiores, próximas e superiores à concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas, denominado Concentração Micelar Crítica (CMC). Dessa forma, a CMC de CB, DBS e TWE são 1876 mg·L⁻¹ (SMITH et al., 2002), 620 mg·L⁻¹ (ZHU et al., 2012) e 15 mg·L⁻¹ (SIGMA ALDRICH, 2017), respectivamente.

4.9. Ação dos surfactantes sobre células aderidas

A ação dos surfactantes sobre as células aderidas de *P. aeruginosa* em aço inoxidável, cultivada no leite integral UHT ou no caldo base de vegetais, foi realizada após 72 h a 15 °C.

Após esse período, os cupons foram retirados do meio e lavados por três vezes com solução NaCl 0,85 % (m/v) para a retirada de células planctônicas. Posteriormente, cada cupom foi transferido para um volume de 10 mL de solução surfactante na concentração desejada por 10 min a 20 °C, como sugerida pelo teste de diluição de uso (ANDRADE, 2008). Os cupons tratados com as soluções surfactantes foram enxaguados por três vezes com solução NaCl 0,85 % (m/v) para remover os produtos residuais. A quantificação das células que permaneceram aderidas aos cupons após a aplicação dos surfactantes foi realizada conforme descrito no item 4.6.

O número de reduções decimais (RD) para cada tratamento de aplicação do surfactante foi calculado. A diferença logarítmica decimal das contagens de *P. aeruginosa* aderidas em aço inoxidável obtida antes e após a aplicação do surfactante representou a eficiência de redução da população bacteriana no biofilme (CARELI, 2009).

4.10. Microscopia confocal de varredura a laser

Biofilmes de *P. aeruginosa* formados por 72 h a 15 °C sobre cupons de aço inoxidável inoculados em leite integral e caldo base de vegetais, antes e após aplicação de soluções surfactantes foram observados por microscopia confocal de varredura a laser. Após o período de formação do biofilme e após a aplicação da solução surfactante, os cupons foram lavados duas vezes por imersão em PBS (0,2 M; pH 7,2) e incubados na ausência de luz por 15 min em uma mistura de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de iodeto de propídeo (IP) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, Alemanha) em PBS (0,2 M; pH 7,2) preparada imediatamente antes do uso. Após incubação, os cupons foram lavados com PBS e analisados em Microscópio Confocal de Varredura a Laser modelo LSM 510 META (Zeiss,

Alemanha) utilizando o laser Argônio com comprimento de onda de 458 nm e 514 nm.

4.11. Análise dos resultados

Para estudar a adesão bacteriana e o potencial de biotransferência foi realizado a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para a ação sanitizante de cada surfactante foi realizada ANOVA e análise de regressão, cujos coeficientes foram testados pelo teste t a 5 % de probabilidade.

Todos os resultados foram analisados com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química dos meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados para a formação do biofilme por *P. aeruginosa* foram caracterizados quanto a composição química e pH (Tabela 2). O leite integral UHT possui em sua composição maior quantidade de gordura, proteína, cinzas, carboidratos em relação ao caldo de vegetais.

Tabela 2. Composição química e pH do leite integral UHT e do caldo de vegetais

	Leite integral UHT	Caldo de vegetais
Gorduras (%)	3,00*	0,04 ± 0,03
Proteínas (%)	3,00*	0,38 ± 0,01
Carboidratos (%)	4,62 ± 0,01	0,71 ± 0,03
Cinzas (%)	0,82 ± 0,01	0,19 ± 0,04
Umidade (%)	88,56 ± 0,02	98,68 ± 0,01
pH (T = 24,9 °C)	6,73 ± 0,01	5,16 ± 0,06

* Valores obtidos na embalagem do produto adquirido comercialmente.

Nesse estudo, o processo de adesão bacteriana e o potencial de biotransferência foram conduzidos utilizando-se substratos alimentares como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Os meios à base de alimentos podem ser úteis para obter resultados mais realistas, em comparação ao uso de meios sintéticos laboratoriais, considerando a disponibilidade de nutrientes e a interação com o ambiente (HERRERA et al., 2007; MEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

5.2. Formação de biofilme em aço inoxidável por *P. aeruginosa* em diferentes meios de cultivo

Resultados apresentados na Tabela 3 mostram que *P. aeruginosa* aderiu ao aço inoxidável nas primeiras 24 h. As contagens de células sésseis aumentaram ao longo do tempo, atingindo valores acima de 7 log UFC·cm⁻² e estabilidade após 96 h, independente do meio de cultivo (Tabela 3).

Tabela 3. Número de células sésseis (log UFC·cm⁻²) de *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável AISI 304 # 4, incubado a 15 °C em diferentes meios de cultivo

Tempo (h)	Leite integral UHT	Caldo de vegetais
24	5,85 ± 0,03 Da	5,90 ± 0,05 Da
48	6,31 ± 0,09 Cb	6,58 ± 0,13 Ca
72	6,98 ± 0,33 Ba	7,17 ± 0,08 Ba
96	7,53 ± 0,11 Aa	7,48 ± 0,07 Aa
120	7,55 ± 0,10 Aa	7,36 ± 0,04 ABb

Média ± desvio padrão

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

P. aeruginosa é uma bactéria com crescimento ótimo a 28 °C, no entanto a estirpe estudada apresentou capacidade de multiplicação e formação de biofilme a 15 °C. Esse valor foi utilizado para simular um excesso na

temperatura de armazenamento de produtos refrigerados, o que pode acarretar na produção de enzimas, principalmente com atividade lipolítica e proteolítica, capazes de deteriorar produtos já processados (PUKANČÍKOVÁ et al., 2016). Em ambientes de processamento de alimentos, as bactérias são geralmente expostas a diferentes níveis de nutrientes (ABDALLAH et al., 2014). Já foi relatado que meios de crescimento ricos em nutrientes podem aumentar a formação de biofilmes (HERRERA et al., 2007), porém nesse estudo o tipo de meio de cultivo não influenciou a formação do biofilme, apesar do leite integral apresentar maior quantidade de nutrientes. Portanto, as condições nutritivas do caldo de vegetais foram suficientes para promover a formação do biofilme de *P. aeruginosa*.

5.3. Potencial de biotransferência de *P. aeruginosa*

Um dos grandes problemas da formação de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é o desprendimento de células para os alimentos ou outras superfícies, tornando uma fonte constante de contaminação. Dessa forma tornou-se importante estudar o potencial de biotransferência, no qual pode ser observado através das contagens de células planctônicas a partir de 48 h de formação de biofilme (Tabela 4). As contagens de *P. aeruginosa* foi praticamente constante durante o período avaliado, atingindo valores próximos de 8 log UFC·mL⁻¹ e 7 log UFC·mL⁻¹ no leite e no caldo, respectivamente.

Tabela 4. Contagem de células planctônicas (log UFC·mL⁻¹) de *Pseudomonas aeruginosa*, em diferentes meios de cultivos, ao longo da formação do biofilme a 15 °C

Tempo (h)	Leite integral UHT	Caldo de vegetais
48	8,35 ± 0,02 Ba	7,55 ± 0,30 Ab
72	8,58 ± 0,06 Aa	7,41 ± 0,32 Ab
96	8,65 ± 0,09 Aa	7,34 ± 0,16 Ab
120	8,61 ± 0,04 Aa	7,06 ± 0,06 Ab

Média ± desvio padrão

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

As células sésseis de *P. aeruginosa* em aço inoxidável apresentaram capacidade de retorno à fase planctônica e atingiram altas densidades populacionais em ambos os meios de cultivo. Dessa forma, o micro-organismo encontrou condições adequadas de crescimento na temperatura e nutrientes fornecidas nesse experimento. Na fase planctônica, as células estão completamente imersas no meio de cultivo, o que facilita a obtenção de energia e faz com que a multiplicação celular ocorra mais rapidamente.

Observou-se que a diferença na composição de nutrientes dos meios de cultivo (Tabela 2) não afetou significativamente ($p > 0,05$) a formação do biofilme (Tabela 3), entretanto a presença de células no estado planctônico foi maior no leite integral (Tabela 4). Provavelmente as células que se desprenderam do biofilme para o leite se multiplicaram com mais intensidade devido a maior quantidade de lipídeos e proteínas disponíveis, visto que o micro-organismo estudado possui capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas (CALDERA et al., 2016). Assim, a composição de nutrientes foi mais relevante no desprendimento das células e multiplicação na fase líquida do que na formação do biofilme.

De modo geral, as altas contagens nos meios indica que, caso um biofilme desse micro-organismo se forme em superfícies de processamento, haverá quantidade de células suficientes para alterar as propriedades sensoriais dos alimentos, bem como torná-los impróprios para o consumo humano.

O retorno das células sésseis a fase planctônica pode ser resultado de diversos fatores, como alterações na disponibilidade de nutrientes, mudanças de oxigênio e presença de produtos tóxicos ou outras condições de indução ao estresse (SAUER et al., 2004; KARATAN; WATNICK, 2009; LANDINI et al., 2010; KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). Para algumas bactérias, o aumento de nutrientes no ambiente pode induzir a dispersão do biofilme (SAUER et al., 2004; KARATAN; WATNICK, 2009). Sauer et al. (2004) relataram que um aumento na concentração de várias fontes de carbono e/ou

nitrogênio, como glutamato, succinato, citrato, glicose e cloreto de amônio, em meio mínimo pode levar ao desprendimento do biofilme de *P. aeruginosa*.

Os mecanismos que envolvem o desprendimento de células do biofilme são numerosos, mas ainda não são bem elucidados (KARATAN; WATNICK, 2009; KAPLAN, 2010; LANDINI et al., 2010). A degradação da matriz do biofilme é uma das estratégias para as células se desprenderem do biofilme. Várias espécies sintetizam enzimas degradativas com especificidade para os componentes da matriz. *P. aeruginosa*, por exemplo, é capaz de degradar o alginato (um dos componentes da sua matriz de EPS) através da produção de alginato-liase (KARATAN; WATNICK, 2009; LANDINI et al., 2010).

5.4. Efeito de surfactantes na remoção do biofilme

Os gráficos do número de reduções decimais de *P. aeruginosa*, quando aderida ao aço inoxidável por 72 h a 15 °C em contato com os meios de cultivo, em função da concentração do surfactante estão apresentados na Figura 8. De modo geral, a eficiência na remoção de células aderidas indicou uma relação linear entre o número de RD e a concentração do surfactante, sugerindo que todos os compostos avaliados apresentaram melhor eficiência em valores mais elevados, acima da CMC.

Conforme mostrado na Figura 8, houve diferença na redução do número de células sésseis entre cada surfactante, e a redução também foi significativamente ($p < 0,05$) afetada pelas concentrações empregadas, independente do tipo de resíduo alimentar presente na formação do biofilme. Observou-se maior RD quando se aplicou o CB em comparação com Tween 80 e DBSS. O Tween 80 e o DBSS reduziram menos de 2 log UFC·cm⁻² de células viáveis, enquanto o CB reduziu acima de 4 UFC·cm⁻². Alguns estudos verificaram que a eficácia de produtos sanitizantes pode estar relacionada com a estrutura e a classe do agente ativo, o que pode alterar a absorção celular e as interações com os componentes da matriz do biofilme (ABDALLAH et al., 2015a; ABDALLAH et al., 2015b).

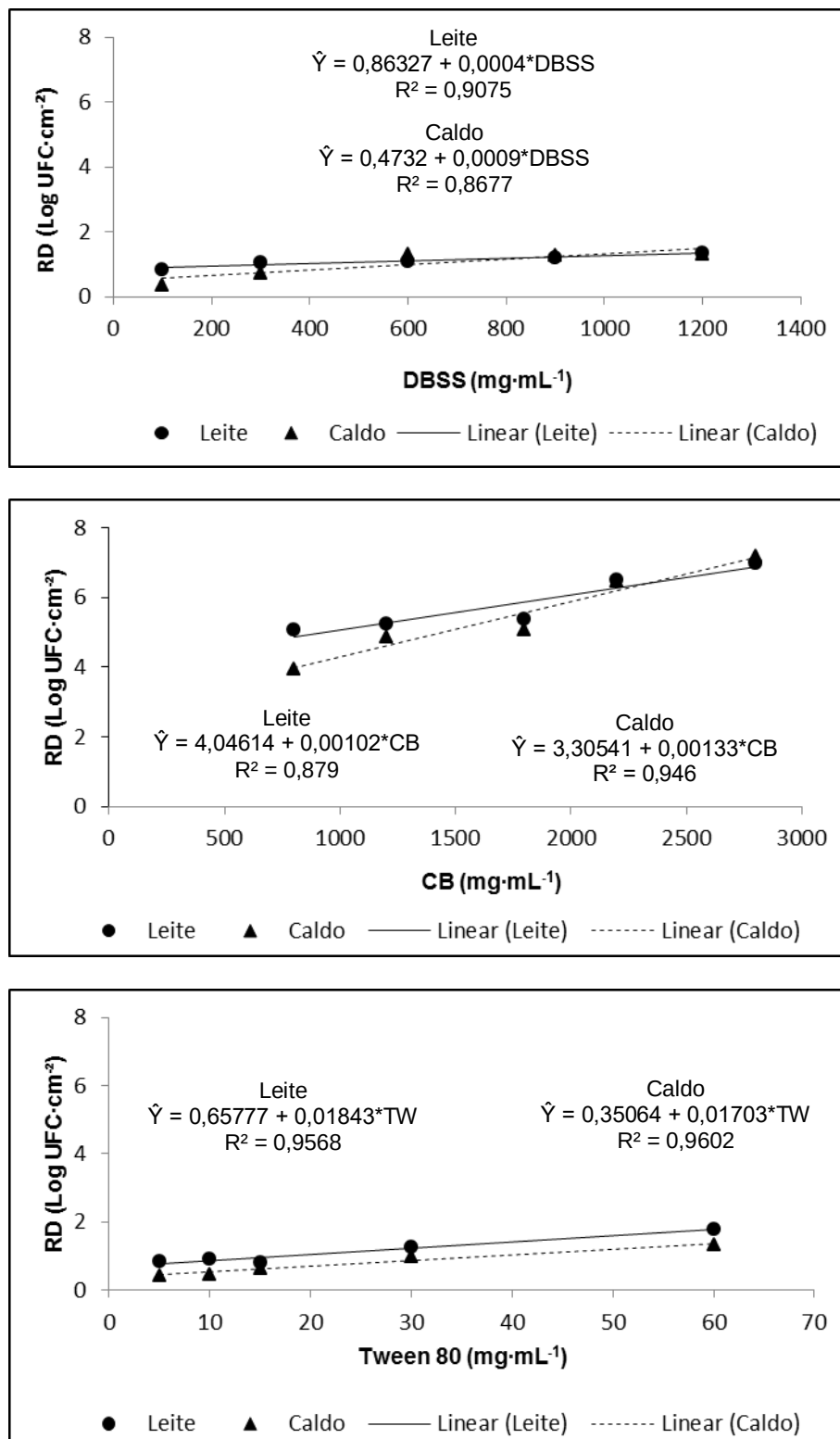


Figura 8. Redução decimal (RD) de *Pseudomonas aeruginosa* (log UFC·cm⁻²), aderida em aço inoxidável cultivada em leite integral UHT e caldo de vegetais, após tratamentos por 10 min de contato com diferentes concentrações de dodecilbenzeno sulfato de sódio (DBSS), cloreto de benzalcônio (CB) e Tween 80 (TW). *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t ($p < 0,05$).

No presente estudo, os surfactantes foram capazes de reduzir parte do biofilme formado. A ação do DBSS e Tween 80 foi mais limitada na redução de células aderidas comparando com o CB. De fato, algumas pesquisas demonstraram que compostos da classe quaternário de amônio, como o CB, possuem propriedades antimicrobianas mais elevadas em relação às demais classes (SIMÕES; PEREIRA; VIEIRA, 2005; WANG et al., 2016). Contudo, vale ressaltar que as concentrações dos surfactantes aplicadas foram diferentes, visto que considerou valores próximos da CMC, uma propriedade intrínseca e característica de cada composto.

Vários estudos já constataram que células sésseis de *P. aeruginosa* apresentam alta resistência a diferentes agentes antimicrobianos, em comparação com as células planctônicas (BRIDIER et al., 2011; BATISTA et al., 2014; PAGEDAR; SINGH, 2015). Abdallah et al. (2015b) verificaram que alguns agentes sanitizantes eliminaram bactérias viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa*, mas não conseguiram removê-lo completamente da superfície. Pagedar e Singh (2015) também avaliaram a ação de sanitizantes, incluindo o CB, sobre biofilmes de isolados de *P. aeruginosa* de origem láctea. As células sésseis foram resistentes a concentrações muito mais elevadas do que o recomendado para aplicações de rotina, e observaram uma tendência na diminuição da concentração na eliminação do biofilme com o tempo de contato prolongado.

Existem poucas pesquisas que avaliaram a eficiência de surfactantes sobre biofilmes desenvolvidos na presença de resíduos alimentares. Wang et al. (2016) simularam um ambiente de processamento de carnes e estudaram a formação de biofilme de sete isolados de *Salmonella* spp. cultivados em caldo de descongelamento de carne, em aço inoxidável, e a aplicação de quatro tipos de surfactantes. Verificaram que o brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) (catiônico) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) (aniônico) apresentaram maior redução do biofilme do que o ramnolípídeo (bio-surfactante) e o Tween 80 (aniônico). Além disso, relataram uma remoção mais eficiente quando o biofilme foi tratado com enzima celulase seguido da imersão em CTAB.

5.5. Biofilmes de *P. aeruginosa* observados por microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal permitiu a visualização dos biofilmes através da combinação dos corantes iodeto de propídeo (IP) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) para a caracterização de células viáveis e não viáveis, antes e após a aplicação dos surfactantes. Ambos os corantes penetram nas células viáveis e não viáveis, entretanto as células vivas são capazes de expulsar o IP e apenas o FITC permanece no interior delas, conferindo uma coloração esverdeada. Enquanto nas células mortas o vermelho intenso do iodeto de protídeo sobrepõe-se ao verde do FITC (ANDRE, 2015). As áreas em preto representam o fundo da superfície de aço inoxidável, sem a presença de células aderidas.

Nas Figuras 9 e 10 é possível visualizar por microscopia confocal as imagens de biofilmes de *P. aeruginosa* em aço inoxidável, formado na presença de leite integral UHT e de caldo de vegetais, antes e após o tratamento com soluções surfactantes. As imagens obtidas das superfícies sem tratamento (Figuras 9A e 10A) apresentam uma grande densidade de células vivas no biofilme. E após aplicação dos surfactantes, DBSS a $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figuras 9B e 10B), CB a $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figuras 9C e 10C), e Tween 80 a $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figuras 9D e 10D) por 10 min, observou-se uma diminuição da densidade do biofilme, independente do meio de cultivo utilizado.

Morte e remoção de células em um biofilme são considerados processos distintos, visto que a seleção de um agente antimicrobiano adequado deve ser capaz de penetrar na matriz de EPS e matar as bactérias presentes (ARAÚJO et al., 2014). Então verificou-se que o CB promoveu redução e morte de células aderidas, decorrente da diminuição da densidade do biofilme e maior presença de células mortas (Figuras 9C e 10C), confirmando os resultados previamente obtidos através das contagens por plaqueamento (Figura 8).

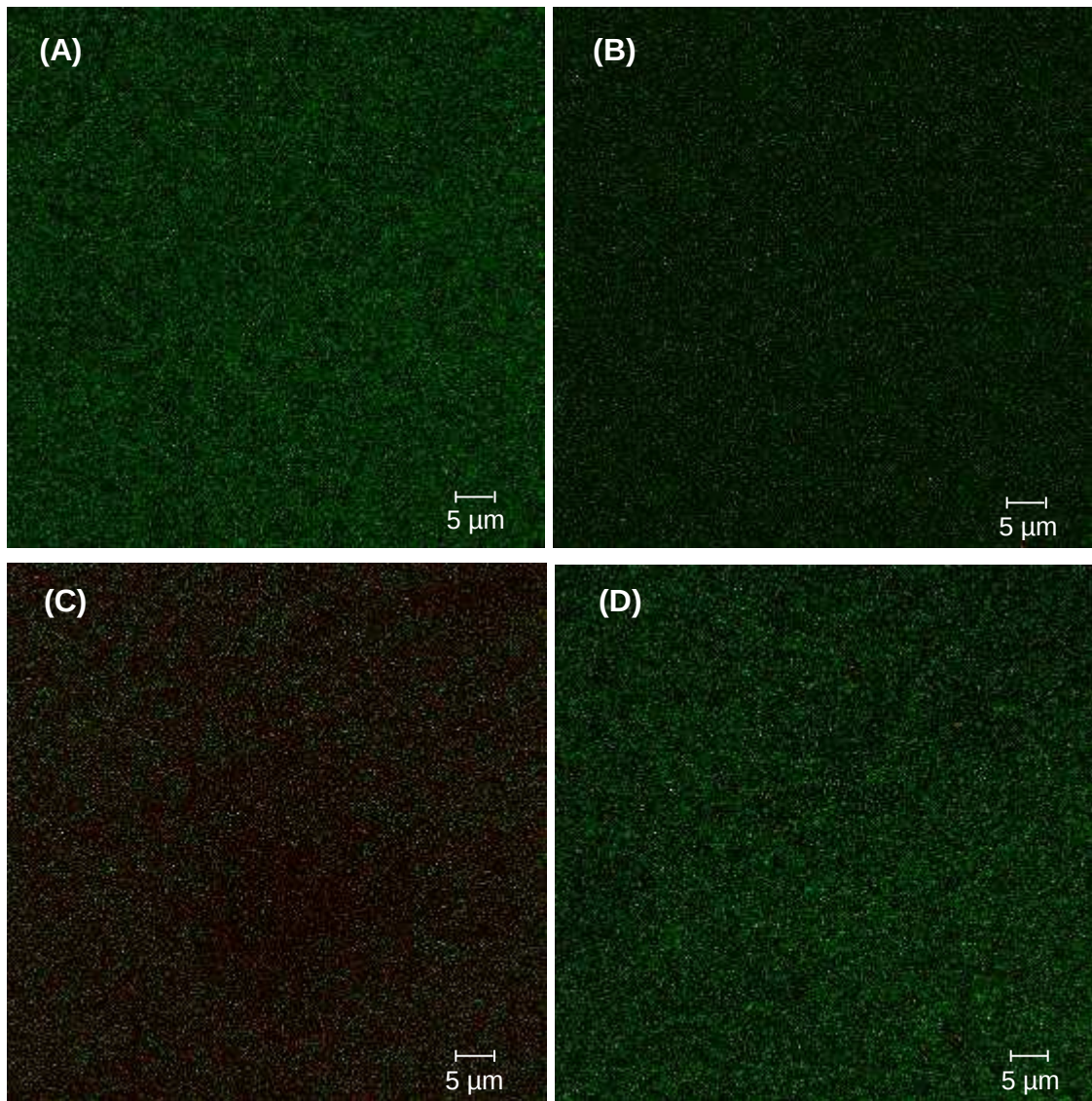


Figura 9. Imagens de microscopia confocal de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, sobre aço inoxidável formado por 72 h a 15 °C, em leite integral UHT, sem tratamento (A), e após aplicação de dodecilbenzeno sulfonato de sódio (B), cloreto de benzalcônio (C) e Tween 80 (D).

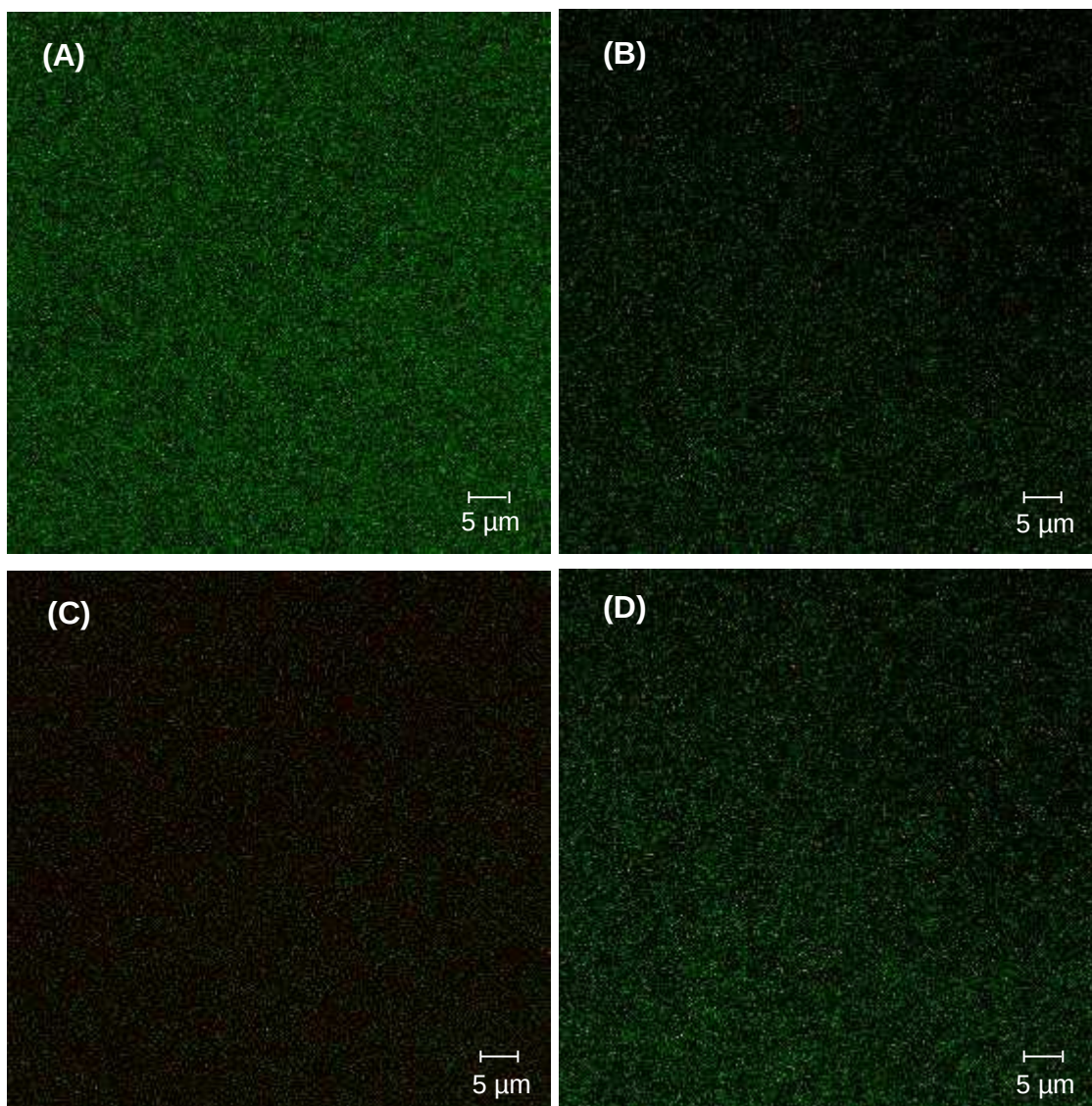


Figura 10. Imagens de microscopia confocal de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, sobre aço inoxidável formado por 72 h a 15 °C, em caldo de vegetais, sem tratamento (A), e após aplicação de dodecilbenzeno sulfonato de sódio (B), cloreto de benzalcônio (C) e Tween 80 (D).

6. CONCLUSÃO

Pseudomonas aeruginosa formou biofilme em superfície de aço inoxidável na presença de leite integral UHT e de caldo de vegetais, na temperatura de 15 °C, durante 120 h (5 dias). Durante a formação do biofilme o micro-organismo demonstrou capacidade de desprendimento da superfície e multiplicação nos meios de cultivo.

Os surfactantes demonstraram melhor eficiência na redução do biofilme de *P. aeruginosa* com o aumento da concentração empregada, ou seja, acima da concentração crítica de micela. O CB apresentou maior capacidade de remoção e morte das células aderidas em relação ao Tween 80 e o DBSS, confirmado pela microscopia confocal de varredura a laser.

7. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N.E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453–472, jul. 2014.
- ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; FERREIRA-THERET, P.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N. E. Effect of culture conditions on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to disinfecting agents. **Biofouling**, v. 31, n. 1, p. 49–59, 2015a.
- ABDALLAH, M.; KHELISSE, O.; IBRAHIM, A.; BENOLIEL, C.; HELIOT, L.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N.-E. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 38–47, dez. 2015b.
- ALLYDICE-FRANCIS, K.; BROWN, P. D. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- ANDRADE, N. J. **Higiene e Sanitização na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ANDRE, C. **Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina**. 2015. 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848–858, 2013.
- ARAÚJO, P. A.; MALHEIRO, J.; MACHADO, I.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. Influence of flow velocity on the characteristics of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 7, p. 04016031, jul. 2016.
- ARAÚJO, P. A.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. The ability of an antimicrobial agent to penetrate a biofilm is not correlated with its killing or removal efficiency. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 675–683, 3 jul. 2014.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. de; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, abr. 2007.

BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 25, n. 1, p. 19–24, 2014.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492–495, jun. 2004.

BERNARDES, P. C.; ARAÚJO, E. A.; PIRES, A. C. dos S.; FIALHO JÚNIOR, J. F. Q.; LELIS, C. A.; ANDRADE, N. J. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1261–1268, dez. 2012a.

BERNARDES, P. C.; ARAÚJO, E. A.; VIDIGAL, M. C. T. R.; ANDRADE, N. J.; MINIM, L. A.; MINIM, V. P. R. Physicochemical parameters for biological and synthetic surfactants used as detergents. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 2, p. 359–366, 2012b.

BHAIRI, S. M.; MOHAN, C. A Guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. In: **Calbiochem**, 2007. 43p.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886–895, dez. 2009.

BRANDL, M. T.; HUYNH, S. Effect of the surfactant tween 80 on the detachment and dispersal of *Salmonella enterica* Seroovar Thompson single cells and aggregates from cilantro leaves as revealed by image analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5037–5042, ago. 2014.

BRIDIER, A.; DUBOIS-BRISSENET, F.; GREUB, G.; THOMAS, V.; BRIANDET, R. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2648–2654, 2011.

CAIXETA, D. S.; SCARPA, T. H.; BRUGNERA, D. F.; FREIRE, D. O.; ALVES, E.; ABREU, L. R. De; PICCOLI, R. H. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 142–150, 2012.

CALDERA, L.; FRANZETTI, L.; VAN COILLIE, E.; DE VOS, P.; STRAGIER, P.; DE BLOCK, J.; HEYNDRICKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142–153, 2016.

CARELI, R. T. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de**

alface (*Lactuca sativa* L.), sua captura e retenção por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* e seu controle por surfactantes. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; ROSADO, M. S.; BERNARDES, P. C. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 171–176, 2009.

DALTIN, D. **Tensoativos:** química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blücher, 2011. 330p.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930–936, abr. 2015.

ECOLAB. **NOSB Petition for Organic Processing and Handling.** 2015. 912p.

FARN, R. J. **Chemistry and Technology of Surfactants.** Blackwell, 2007. 315p.

FAZLARA, A.; EKHTLAT, M. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens department of food hygiene, faculty of veterinary medicine. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, n. 1, p. 23–29, 2012.

FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; LARA, G. H. B.; LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 745–748, 2009.

FERREIRA, C.; PEREIRA, A. M.; PEREIRA, M. C.; MELO, L. F.; SIMOES, M. Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1036–1043, 1 maio 2011.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2 ago. 2010.

FRANKLIN, M. J.; NIVENS, D. E.; WEADGE, J. T.; LYNNE HOWELL, P. Biosynthesis of the *pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–16, 2011.

GHAFOOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5238–5246, 2011.

HARMSSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253–268, ago. 2010.

HARRISON, J.; TURNER, R.; MARQUES, L.; CERI, H. Biofilms. **American Scientist**, v. 93, n. 6, p. 508, 2005.

HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585–591, set. 2007.

IAL - Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Ed Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the environment. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 95–110, 1 jan. 2010.

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 205–218, 2010.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013.

LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J. G.; NIJLAND, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 813–823, 2010.

LUCCHESI, G. I.; LIFFOURRENA, A. S.; BOERIS, P. S.; SALVANO, M. A. Adaptative response and degradation of quaternary ammonium compounds by *Pseudomonas putida* A ATCC 12633. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 1297–1303, 2010.

MA, L.; CONOVER, M.; LU, H.; PARSEK, M. R.; BAYLES, K.; WOZNIAK, D. J. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000354, 27 mar. 2009.

MACHADO, S. G.; BAGLINIÈRE, F.; MARCHAND, S.; VAN COILLIE, E.; VANETTI, M. C. D.; DE BLOCK, J.; HEYNDRIKX, M. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in

processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 302, p. 1–22, 1 mar. 2017.

MACHADO, S. G.; DA SILVA, F. L.; BAZZOLLI, D. M. S.; HEYNDRIKX, M.; COSTA, P. M. de A.; VANETTI, M. C. D. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842–M1849, ago. 2015.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K. **Microbiologia de Brock**. 14^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MALHEIROS, P.; DOS PASSOS DA SILVA, C. T.; CASARIN, L. S.; SERRAGLIO, L.; TONDO, E. C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 298–301, mar. 2010.

MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 893–916, 2012.

MARCHAND, S.; DE BLOCK, J.; DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; HEYNDRIKX, M.; HERMAN, L. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 133–147, mar. 2012.

MEIRA, Q. G. da S.; BARBOSA, I. de M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. de; SOUZA, E. L. de. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 469–475, jun. 2012.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO K (Eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: **American Public Health Association**, cap. 7, p. 66 – 67, 2001.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, n. 1, p. 11–13, 2010.

NEU, T. R.; LAWRENCE, J. R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 233–242, abr. 2015.

OLIVEIRA, M. M. M. de; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. Evaluation of antibiofilm effect of benzalkonium chloride, iodophore and sodium hypochlorite against biofilm of *Pseudomonas*

aeruginosa of dairy origin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5317–5322, 2015.

PAULUS, W. **Directory of Microbicides for the Protection of Materials**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005. 786 p.

PUKANČÍKOVÁ, L.; LIPNIČANOVÁ, S.; KAČÁNIOVÁ, M.; CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. Natural microflora of raw cow milk and their enzymatic spoilage potential. **Nova Biotechnologica et Chimica**, v. 15, n. 2, p. 142–155, jan. 2016.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 518–521, 2009.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81–85, 2000.

SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; RIBEIRO, J. I.; FERNANDES, P. E.; LOPES, J. P.; BERNARDES, P. C.; PORTUGAL, J. G. Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1478–1483, 2010.

SAUER, K.; CULLEN, M. C.; RICKARD, a H.; ZEEF, L. a H.; GILBERT, P.; DAVIES, D. G. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7312–7326, 2004.

SIGMA ALDRICH. **TWEEN® 80 Sigma Ultra**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p8074pis.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2016.

SIMÕES, M. **Use of biocides and surfactants to control *Pseudomonas fluorescens* biofilms**: role of the hydrodynamic conditions. 2005. 256 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Porto, 2005.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes. **Water Research**, v. 39, n. 2–3, p. 478–486, jan. 2005.

SOUZA, E. L. de; MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. de M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; CONCEIÇÃO, M. L. da; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. de. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 67–75, 2014.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

TAFFAREL, S. R.; RUBIO, J. Adsorption of sodium dodecyl benzene sulfonate from aqueous solution using a modified natural zeolite with CTAB. **Minerals Engineering**, v. 23, n. 10, p. 771–779, 2010.

TONDO, E. C.; MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S.; PADRÃO, D. K.; CARVALHO, A. L.; BRANDELLI, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1027–1037, 2010.

TOUTAIN-KIDD, C. M.; KADIVAR, S. C.; BRAMANTE, C. T.; BOBIN, S. A.; ZEGANS, M. E. Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 136–145, 2009.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K.-H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 3–9, 11 jan. 2012.

WANG, H.; WANG, H.; XING, T.; WU, N.; XU, X.; ZHOU, G. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 298–304, mar. 2016.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing: Communication in Bacteria. **Annual Reviews in Cell Development Biology**, v. 21, n. 1, p. 319–346, 2005.

YANG, Y.; MIKŠ-KRAJNIK, M.; ZHENG, Q.; LEE, S.-B.; LEE, S.-C.; YUK, H.-G. Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, v. 54, p. 98–105, abr. 2016.

ZHU, D.Y.; CHENG, F.; CHEN, Y.; JIANG, S.C. Preparation, characterization and properties of anionic gemini surfactants with long rigid or semi-rigid spacers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 397, p. 1–7, mar. 2012.