

PATRÍCIA CAMPOS BERNARDES

**MODELAGEM DA ADESÃO DE *Bacillus cereus* AO AÇO INOXIDÁVEL EM
FUNÇÃO DO TEMPO E DA TEMPERATURA E INFLUÊNCIA DA
RUGOSIDADE E DA HIDROFOBICIDADE SOBRE A ADESÃO**

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
2008

PATRÍCIA CAMPOS BERNARDES

**MODELAGEM DA ADESÃO DE *Bacillus cereus* AO AÇO INOXIDÁVEL EM
FUNÇÃO DO TEMPO E DA TEMPERATURA E INFLUÊNCIA DA
RUGOSIDADE E DA HIDROFOBICIDADE SOBRE A ADESÃO**

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: 11 de julho de 2008.

Prof. Luís Antônio Minim
(Co-orientador)

Prof. Sukarno Olavo Ferreira
(Co-orientador)

Dr^a. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Dr. Cleuber Antônio de Sá Silva

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida.

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

Ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa.

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos proporcionados.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pelos ensinamentos, simpatia e colaboração preciosa.

Ao professor Luís Antônio Minim, pela participação e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Helenice e Daniel, pela dedicação, pelo carinho e estímulo em mais essa etapa.

Ao meu irmão Leandro pela alegria de tê-lo como irmão.

Ao Vinicius pelo companheirismo e amor durante todos esses anos.

À minha sogra pelos momentos agradáveis em sua companhia.

Aos meus tios Lucimar e José Mauro, por acreditarem em mim.

À minha amiga Lanna pela convivência agradável em todos esses anos.

Às minhas amigas Lívia e Pati pela amizade e ajuda em diversas etapas do experimento.

Ao meu amigo Natan pela companhia sempre agradável.

À amiga Aniella que mesmo longe sempre esteve ao meu lado.

À colega de laboratório Priscilla pela convivência agradável e ajuda durante o experimento.

Aos meus estagiários João, Deyse, Danni Colombari pela amizade e ajuda durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos Dani Leocadio, Dani Lanna, Evelyn, Silvia e Roberta.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Leite, Maurício e Adenilson pelo cafezinho das tardes e pelas conversas.

À Emiliane pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, pela convivência agradável.

Aos funcionários do DTA, pelo auxílio na concretização deste trabalho.

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

BIOGRAFIA

PATRÍCIA CAMPOS BERNARDES, filha de Daniel Flávio Bernardes e Helenice Campos Bernardes, nasceu em Andrelândia, Minas Gerais, em 13 de junho de 1983.

Em maio de 2002, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduou-se em outubro de 2006, e, no mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Bacillus cereus</i>	4
2.2. Adesão bacteriana e formação de biofilmes.....	5
2.3. Fatores que influenciam a adesão e formação de biofilmes.....	7
2.3.1. Fatores físico-químicos e termodinâmicos que influenciam a adesão e a formação de biofilmes	8
2.3.1.1. Hidrofobicidade	11
2.3.1.1.1. Medição do ângulo de contato	12
2.3.1.2. Teoria termodinâmica da adesão	15
2.3.2. Aspectos microbiológicos da adesão	16
2.3.3. Rugosidade e microtopografia.....	17
2.4. Aço inoxidável	20
2.5. Microbiologia preditiva.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Superfície	23
3.2. Suspensão do microrganismo	23
3.3. Adesão de <i>Bacillus cereus</i> a cupons de aço inoxidável.....	24
3.4. Determinação do número de células aderidas	25
3.5. Determinação da tensão interfacial e da hidrofobicidade pelo goniômetro	25
3.6. Determinação da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$)	28

3.7. Determinação da microtopografia e rugosidade por microscopia de força atômica e perfilômetro	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Adesão de <i>Bacillus cereus</i> ao aço inoxidável.....	30
4.2. Modelagem da adesão	33
4.3. Análises dos ângulos de contato e tensões interfaciais	37
4.4. Análises da energia livre global de interação (ΔG_{sas}^{TOT})	40
4.5. Análises da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre <i>Bacillus cereus</i> e aço inoxidável em meio aquoso.....	42
4.6. Análise da rugosidade e da microtopografia das superfícies	44
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS	50

RESUMO

BERNARDES, Patrícia Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão.** Orientador: Nélio José de Andrade. Co-orientadores: Sukarno Olavo Ferreira e Luís Antônio Minim.

Adesão de *Bacillus cereus* à superfície de aço inoxidável 304 #4 foi avaliada após diferentes tempos e temperaturas de contato. Foram construídos modelos matemáticos capazes de prever a adesão, como função da temperatura, (4 °C – 35 °C) e do tempo, (1 d - 10 d). A interação entre a superfície de aço inoxidável e *B. cereus* foi estudada por meio das características de interação interfacial, determinadas a partir da medição do ângulo de contato das superfícies das células de *B. cereus*, do aço inoxidável e do aço inoxidável com células de *B. cereus* aderidas, em associação com a teoria DLVO Estendida e a teoria termodinâmica da adesão. Avaliou-se a rugosidade e a microtopografia da superfície de aço inoxidável e aço inoxidável aderido com células de *B. cereus* com auxílio da microscopia de força atômica e da perfilometria. O aumento de temperatura de 4 °C para 35 °C propiciou o aumento do número de células de *B. cereus* aderidas em mais de 3 ciclos log para o tempo de adesão de 1 dia e em mais de 4 ciclos log para o tempo de adesão de 10 dias o que indicou a influência da temperatura para o processo

de adesão. O número máximo de células aderidas detectadas nos cupons incubados por 35 °C, durante 10 dias foi de log 4,43 UFC/cm², semelhante ao número observado para as células aderidas nos cupons incubados na mesma temperatura, durante 1 dia que foi de log 4,01 UFC/cm². Esse resultado reforçou a influência da temperatura em relação ao tempo para adesão desta bactéria. Quando a temperatura aumentou de 7 °C para 15 °C houve o aumento do número de UFC/cm² em cerca de 3 ciclos log. Apenas na região de alta temperatura (25 °C a 35 °C) houve um bom ajuste dos dados pelo modelo matemático obtido. A estirpe de *B. cereus* estudada foi considerada hidrofílica enquanto o aço inoxidável foi considerado hidrofóbico. A adesão não foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} > 0$) entre o aço inoxidável e a estirpe de *B. cereus*. Assim, a interação entre elas não foi favorecida pelo aspecto termodinâmico da adesão. Não houve diferença ($p > 0,05$) na rugosidade das superfícies de aço inoxidável com células de *B. cereus* aderidas, observadas por microscopia de força atômica e por perfilometria. O efeito da temperatura foi mais importante do que o efeito do tempo na adesão das células de *B. cereus* ao aço inoxidável 304 #4. *B. cereus* aderiu aos cupons de aço inoxidável 304 #4 a baixas temperaturas, 4 °C, 7 °C e 10 °C. Os resultados indicaram que abusos na temperatura de armazenamento, sob refrigeração, influenciaram decisivamente no número de bactérias aderidas podendo alterar a qualidade do leite.

ABSTRACT

BERNARDES, Patrícia Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2008. **Modeling of adhesion of *Bacillus cereus* to stainless steel as function of time and temperature and influence of roughness and hydrophobicity in the adhesion.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Sukarno Olavo Ferreira and Luís Antônio Minim.

Adhesion of *Bacillus cereus* to stainless steel 304 #4 was evaluated after different times and temperatures of contact. Mathematical models were obtained capable of predicting the adhesion of *B. cereus* in stainless steel, as a function of temperature (4 °C – 35 °C) and time (1d - 10 d). The interaction between the surface of stainless steel and *B. cereus* was studied by the characteristics of interfacial interaction, determined from the measurement of contact angle of the surface of *B. cereus*, stainless steel and stainless steel attachment with *B. cereus*, in association with the extended DLVO theory and the thermodynamic theory of adhesion. It was evaluated the microtopographies and the roughness of the surface of stainless steel and stainless steel attachment with *B. cereus* with the help of atomic force microscopy and profilometry. The increase in temperature of 4 °C to 35 °C increased the number of *B. cereus* attached more than 3 cycles log for the time of adhesion of 1 d and more than 4 cycles log for the time of adhesion of 10 d showing the importance of temperature in adhesion. The maximum number of attached

cells, found in coupons incubated for 35 °C for 10 days (log 4.43 CFU/cm²) was close to that of cells attached when the coupons remained at the same temperature for 1 day (log 4.01 CFU/cm²) showing once again the importance of temperature in relation to time to adhesion of this bacteria. When the temperature rose from 7 °C to 15 °C the number of CFU/cm² increased about 3 cycles log. Only in the region of high temperature was a good adjustment of the data obtained by the mathematical model. The strain of *B. cereus* study was considered hydrophilic while the stainless steel was considered hydrophobic. The adhesion was not thermodynamically favorable ($\Delta G_{ades\tilde{a}o} > 0$) between the stainless steel and strain of *B. cereus* studied. Thus, the interaction between them was not favoured by thermodynamic aspect of adhesion. There was no difference ($p > 0.05$) in the roughness of the surfaces of stainless steel attachment with *B. cereus* when analyzed by atomic force microscope and for profilometry. The effect of temperature was more important than the effect of time on the adhesion of *B. cereus* to stainless steel 304 #4. The strain of *B. cereus* study was able to adhere to the coupons of stainless steel 304 #4 at low temperatures (4 °C, 7 °C and 10 °C). The results indicated that possible abuses in the temperature of storage under refrigeration decisively affect the number of attached bacteria, which may adversely affect the quality of milk.

1. INTRODUÇÃO

No mundo biológico as bactérias crescem preferencialmente aderidas às superfícies, protegidas por uma matriz, em comunidades multicelulares ou biofilmes. Este modo de vida é importante porque envolve uma grande mudança no uso da informação genética e energia celular e tem profundas conseqüências para fisiologia e sobrevivência bacteriana. Na maioria das espécies, condições ambientais e nutricionais influenciam no desenvolvimento do biofilme. Os mesmos tipos de moléculas adesivas com freqüência promovem a formação do biofilme em diferentes espécies. Processos sinalizadores e regulatórios que dirigem o desenvolvimento do biofilme são conservados, especialmente entre bactérias relacionadas. O conhecimento desses processos contribui para o entendimento e realização do controle do crescimento do biofilme (LEMON et al., 2008).

A presença de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos é uma preocupação uma vez que as bactérias quando em biofilmes são mais difíceis de serem removidas do que as células que estão livres e podem representar uma fonte constante de contaminação.

A importância das superfícies contaminadas quanto ao potencial de veiculação de microrganismos patogênicos e deterioradores é evidente no processamento de alimentos. Muitas destas bactérias aderirem às superfícies dos equipamentos e permanecerem viáveis mesmo após a limpeza e sanitização das superfícies. Essas bactérias podem se desprender das

superfícies e contaminar os alimentos o que pode influenciar a qualidade e segurança dos alimentos processados colocando em risco à saúde dos consumidores (BAGGE-RAVN et al., 2003).

Considerando que a superfície de adesão é essencial para o desenvolvimento de um biofilme, o entendimento de como as propriedades do substrato influenciam o processo de adesão bacteriana pode ajudar a desenvolver alterações nas superfícies de forma que a adesão seja controlada.

Os aspectos físico-químicos da adesão são explicados pelas teorias de Derjaguin e Landau, em 1941 e Verwey e Overbeek, em 1948 (DLVO) e complementada por Van Oss e colaboradores em 1994 (DLVO Estendida), usadas para prever a adesão microbiana.

A presença de *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos, principalmente em aço inoxidável, é muito comum. Essa bactéria é reconhecida como um microrganismo que possui grande capacidade de aderir-se às superfícies de aço inoxidável em indústrias de produtos lácteos, sendo um obstáculo para a conservação do leite pasteurizado e derivados (PENG, TSAI, CHOU, 2002). Os esporos de *B. cereus* são resistentes à pasteurização e podem formar biofilmes nas superfícies dos equipamentos da linha de processamento. Uma vez que os microrganismos estejam aderidos ou em biofilmes nos equipamentos, estes apresentam maior resistência à remoção pelos procedimentos normais de higienização.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

a) Obter modelos matemáticos capazes de prever a adesão de *B. cereus* em aço inoxidável 304 #4, como função da temperatura (4 °C a 35 °C) e do tempo (1 d a 10 d).

b) Relacionar a interação entre a superfície de aço inoxidável e *B. cereus* por meio do estudo das características de interação interfacial, determinadas a partir da medição de ângulos de contato das superfícies de células de *B. cereus*, do aço inoxidável e do aço inoxidável com células de *B. cereus* aderidas, em associação com a teoria DLVO Estendida e a teoria termodinâmica da adesão.

c) Avaliar a rugosidade e a microtopografia da superfície de aço inoxidável e do aço inoxidável com células de *B. cereus* aderidas com auxílio da microscopia de força atômica e da perfilometria.

d) Fornecer subsídios à indústria de laticínios para o controle de processos de adesão e formação de biofilmes por *B. cereus* em superfícies de aço inoxidável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é reconhecido como um microrganismo patogênico aos homens e deteriorador de alimentos, com morfologia de bastonetes grandes, formador de esporo, Gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel e não apresenta crescimento rizóide. Cresce de 4 °C a 55 °C, sendo a faixa ótima de crescimento entre 30 °C e 40 °C, de acordo com a estirpe (HOLT et al., 1994).

Esse microrganismo é amplamente distribuído na natureza, é isolado do solo, vegetação, água e pêlos de animais. É em geral encontrado em baixos números nos alimentos, $<10^2$ UFC/g, valor considerado aceitável. As intoxicações alimentares iniciam-se quando o alimento é armazenado a temperaturas abusivas por longo período, permitindo que um número baixo de células multiplique até concentrações superiores a 10^5 UFC/g, capazes de causar intoxicação alimentar (FORSYTHE, 2002).

B. cereus tem um potencial deteriorador sobre os alimentos. Esta bactéria é capaz de produzir proteases e fosfolipases extracelulares termorresistentes, que resultam na coagulação doce e no sabor amargo do leite pasteurizado (COLLINS, 1981).

De acordo com Wong, Chang e Fan (1998), apesar da alta incidência desse microrganismo em produtos lácteos, as intoxicações alimentares causadas por ingestão de leite ou derivados são raras. Assim, o principal

problema da presença de *B. cereus* no leite é sua influência como fator limitante à vida-de-prateleira do produto e o desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis (FROMM; BOOR, 2004).

Jullien et al. (2002) relataram a presença de aproximadamente 1.000 esporos de *B. cereus* por cm², aderidos à superfície de aço inoxidável, após a realização do procedimento de higienização completo em equipamentos de laticínios.

A recontaminação do leite pasteurizado por *B. cereus*, na linha de produção leva à perda de qualidade, diminuição da vida útil do produto e, eventualmente, a riscos à saúde do consumidor. Além disso, esse microrganismo está intimamente envolvido com a vida de prateleira do leite pasteurizado o que causa perdas econômicas consideráveis para indústria de laticínios (SALUSTIANO, 2007).

2.2. Adesão bacteriana e formação de biofilmes

A adesão bacteriana é importante em diferentes campos, desde a microbiologia médica e patologia à indústria de alimentos, além da engenharia de meio ambiente na área de ciência de biomateriais. Na indústria de alimentos as características da superfície microbiana têm importância no processamento de alimentos e também no campo dos alimentos probióticos (UBBINK; ZAMMARETTI, 2007).

A formação de um biofilme inclui diversas etapas, e um dos pré-requisitos é a adesão das células microbianas à superfície. Em estudo das propriedades de adesão de bactérias Azeredo e Oliveira (2000) consideram que as características físico-químicas da superfície da célula contribuem para o processo de adesão. Tais fatores incluem a hidrofobicidade, presença de polímeros extracelulares e carga superficial.

Para o início da formação de um biofilme é necessário que primeiro ocorra adsorção de resíduos orgânicos à superfície o que leva a formação de um filme condicionante sobre o qual as bactérias iniciam a adesão (SHENG et al., 2007).

No processo de adesão da bactéria à superfície ocorre inicialmente a adsorção reversível regulada pela atração eletrostática e por forças físicas,

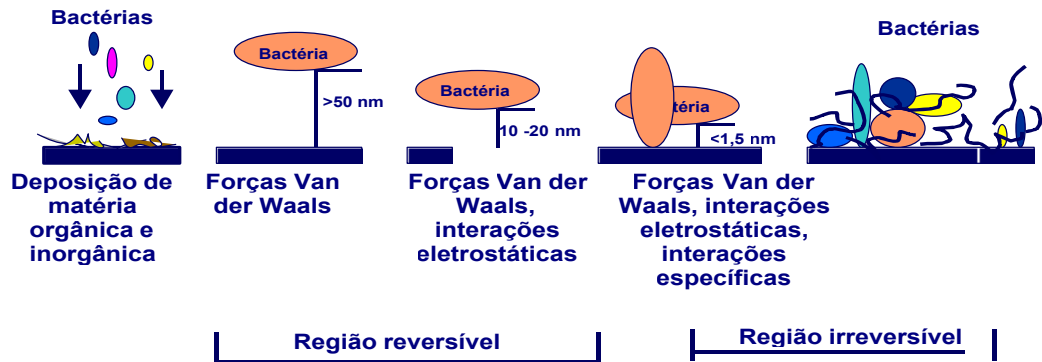
como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. Estas forças de adesão são dependentes das propriedades físico-químicas da superfície e da superfície da bactéria, que são a hidrofobicidade e a carga elétrica. A adesão inicial da bactéria é a etapa crítica para o desenvolvimento do biofilme (RAZATOS et al., 1998).

As células presentes no biofilme são mantidas unidas por uma matriz extracelular composta por exopolissacarídeos, proteínas e, algumas vezes, ácidos nucléicos (LEMON et al., 2008). O desenvolvimento do biofilme ocorre em resposta a sinais extracelulares do meio ambiente ou produzidos pela própria bactéria. Os biofilmes podem proteger as bactérias de algumas condições ambientais adversas, como antibióticos e o sistema imune humano (LEMON et al., 2008).

Vários mecanismos para explicar a adesão bacteriana em superfícies de contato foram propostos (ZOTTOLA, 1994; ZOTTOLA, 1997). A teoria, descrita por Marshall et al. (1971), afirma que a adesão em superfícies sólidas é um processo que acontece em duas etapas. A primeira é reversível, pois o microrganismo está fracamente aderido à superfície por meio de forças de van der Waals e interações eletrostáticas, o que propicia fácil remoção da célula bacteriana. Já a segunda etapa é irreversível, uma vez que o tempo de aderência inclui adesão física da célula à superfície por material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pelo microrganismo, o que é denominado matriz de glicocálix. O glicocálix auxilia a formação do biofilme, e é produzido apenas após a adesão superficial fornecendo condições para adesão do peptidoglicano presente na parede celular de bactérias Gram-positivas e na parte externa da membrana externa das bactérias Gram-negativas de natureza, principalmente, lipoprotéica.

Na Figura 1 está esquematizado o mecanismos de adesão e formação de biofilmes.

A redução da distância entre o substrato e a bactéria faz com que as forças de adesão predominem, o que é favorecido pela presença de apêndices e polímeros extracelulares (DENYER et al., 1993).



Fonte: Busscher e Weerkamp (1987), Characklis (1984), Marshall (1971), Notermans et al. (1991)

Figura 1 - Mecanismo teórico dos estágios de adesão e formação de biofilmes.

Segundo Characklis (1990) a adsorção reversível resulta principalmente de interação de forças de longas distâncias de fraca especificidade, enquanto adesão irreversível é, em geral, considerada resultante de interações de forças de curta distância mais definitivas e de alta especificidade. Essas últimas interações, na maioria das vezes, contam com o encurtamento da distância entre as forças físicas de atração e são favorecidas pela interação entre os grupos componentes da célula e receptores de ligação (DENYER et al., 1993).

A dinâmica biológica e físico-química do desenvolvimento do biofilme, segue uma seqüência temporal ordenada, e o desenvolvimento do biofilme envolve as fases de adesão, crescimento celular, produção de polissacarídeos e maturação, seguida de liberação do biofilme da superfície (ANDRADE, 2008).

O alimento pode ser contaminado pelo contato com superfícies contaminadas com bactérias deterioradoras e patogênicas indesejáveis provenientes dos biofilmes. Portanto, a formação de biofilme conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas em função da deterioração do alimento e persistência de patógenos o que reduz o prazo de validade dos produtos (BEER et al., 1994; FORSYTHE, 2002).

2.3. Fatores que influenciam a adesão e formação de biofilmes

A adesão de células microbianas às superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e que depende das propriedades superficiais dos suportes de adesão e das células dos microrganismos

envolvidos na adesão, como carga superficial e hidrofobicidade, das propriedades microbiológicas das células microbianas, como presença exopolímeros ou estruturas extracelulares, e das características do meio de crescimento, como temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes (CHAVES, 2004).

Outros fatores inerentes à morfologia das superfícies podem ser determinantes para a adesão, como a sua composição, rugosidade e porosidade (PEREIRA et al., 2000).

Fatores genotípicos como a expressão de genes que codificam a presença de flagelo, fímbria, pili na superfície dos microrganismos e produção de polissacarídeos são associados ao processo de adesão (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

A expressão genética de bactérias que vivem em biofilmes é diferente daquelas células que vivem de maneira livre, e isso pode ser mediado por um processo conhecido como *Quorum Sensing* (PARSEK; GREENBERG, 2005).

O papel de fatores físico-químicos na regulação da estrutura do biofilme deve ser analisado em associação com os fatores genotípicos. Estes estudos, em combinação com estudos de modelagem matemática buscarão uma teoria unificada, de forma a explicar melhor o ciclo de desenvolvimento do biofilme (ANDRADE, 2008).

2.3.1. Fatores físico-químicos e termodinâmicos que influenciam a adesão e a formação de biofilmes

O estudo da adesão da bactéria à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas da superfície da bactéria, da superfície de adesão e da interação entre elas. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e superfície depende da composição química dessa e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE et al., 2002). Além disso, deve se considerar as características do meio onde a célula se encontra como a presença de substâncias que podem condicionar as superfícies, pH, temperatura, tempo de exposição, concentração de células microbianas, tensão interfacial e força iônica do meio (CHAVES, 2004).

A termodinâmica das superfícies microbianas é um reflexo das características físico-químicas das células microbianas e das características biológicas, e está teoricamente fundamentada na termodinâmica das superfícies de colóides usando a teoria clássica de estabilidade de colóides conhecida como teoria DLVO, desenvolvida inicialmente por Derjaguin e Landau, em 1941 e complementada por Verwey e Overbeek, em 1948 (STREVETT; CHEN, 2003).

As propriedades físicas da maioria das bactérias são semelhantes às daquelas dos colóides. Assim, estas podem ser consideradas partículas coloidais vivas por apresentarem, em geral, forma de bastonetes curtos, carga global negativa, densidade pouco superior à da água, aproximadamente 1 μm de comprimento e serem cobertas com biomacromoléculas (MARSHALL, 1971; UBBINK; ZAMMARETTI, 2007).

A teoria DLVO afirma que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de van der Waals e as forças de dupla camada elétrica. A intensidade das forças de van der Waals é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que interagem e inversamente proporcional à distância da superfície.

As forças de dupla-camada elétrica estão associadas à carga elétrica superficial e aos movimentos brownianos. A superfície de um sólido eletricamente carregado em contato com uma solução aquosa atrai íons de sinal contrário ao do meio e simultaneamente repele os de sinais iguais. Em sistemas biológicos a carga superficial é resultante da adsorção de íons ou ionização dos grupos superficiais (CHAVES, 2004).

Em geral, as bactérias apresentam carga elétrica negativa em pH neutro. Nas bactérias Gram-positivas a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e lipoteicóicos da parede e dos polipeptídios do glicocálix; nas bactérias Gram-negativas, esta carga é associada a presença de lipopolissacarídeos e proteínas presentes na membrana externa, em associação com os polímeros do glicocálix (WICKEN, 1985).

A teoria DLVO considera apenas as forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula ou célula microbiana encontra-se muito próxima de uma superfície (entre 2 nm e 5 nm), forças de curto alcance passam a regular o processo. Estas forças denominadas de não-DLVO são

representadas pelas forças de repulsão de Born, forças de hidratação, interações hidrofóbicas e pontes poliméricas. Estas forças permitem justificar os desvios da teoria DLVO, contudo estes tipos de interações não são facilmente quantificáveis com exceção da interação hidrofóbica (ELIMELECH, 1995), que é considerada a força de curto alcance mais importante para a adesão bacteriana (BUSSCHER et al., 1990; VAN OSS, 1997).

Para considerar os aspectos termodinâmicos no processo de adesão, van Oss et al. (1994), adicionaram à teoria DLVO as influências das interações de Lifshitz-van der Waals, de ácido base de Lewis, das forças de dupla camada elétrica e movimentos brownianos. Esta teoria é conhecida como XDLVO ou DLVO Estendida e considera as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas.

A energia livre global das interações numa superfície (ΔG^{TOT}) é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz-van der Waals (ΔG^{LW}), interações ácido-base de Lewis (ΔG^{AB}), forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (ΔG^{DL}) e interações resultantes de movimentos Brownianos (ΔG^{BR}), conforme a equação 1 :

$$\Delta G^{\text{TOT}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} + \Delta G^{\text{DL}} + \Delta G^{\text{BR}} \quad (\text{Equação 1})$$

Portanto, a equação acima leva em consideração as forças de Lifshitz-van der Waals que estão relacionadas às forças de interação apolares, cuja energia livre está diretamente relacionada com a tensão interfacial. A equação também prevê a quantificação das interações do tipo ácido base de Lewis que consideram as interações entre doadores e receptores de elétrons, normalmente designadas de AB. A equação acima contempla a quantificação dos movimentos Brownianos que são característicos de partículas ou moléculas em suspensão e que apresentam caráter repulsivo.

O contato direto entre a bactéria e a superfície pode ser estabelecido em nível molecular por meio de substâncias poliméricas extracelulares, sintetizadas pelas bactérias. Esses compostos não estão sujeitos ao mesmo tipo de repulsão que as bactérias, portanto podem facilitar a adesão entre a bactéria e a superfície por várias combinações de ligações químicas (eletrostáticas, covalente e de hidrogênio), interações dipolo (dipolo-dipolo,

dipolo-induzido e íon-dipolo), além de interações hidrofóbicas. Conseqüentemente, a bactéria poderá ter diferentes tipos de adesividade (MARSHALL, 1992).

2.3.1.1. Hidrofobicidade

Segundo van Oss e Giese (1995), a hidrofobicidade é expressa como energia hidrofóbica de atração e estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. A hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de interação entre as moléculas das superfícies imersas em água (ΔG_{sas}^{TOT}). Quando a energia livre global de interação entre as moléculas imersas em água é atrativa, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é negativo, significa que as moléculas do sólido têm maior afinidade entre si do que pela água. Assim, uma superfície hidrofóbica apresenta valores de ΔG_{sas}^{TOT} negativos. Quando a energia livre global de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é positivo, a superfície é considerada hidrofílica.

Uma superfície que não possui grupos polares ou iônicos ou locais de ligação de hidrogênio, não tem afinidade pela água é considerada hidrofóbica. Para que uma adesão entre duas superfícies ocorra em meio aquoso, é preciso que o filme de água que as separa seja removido e a hidrofobicidade contribui para essa remoção. Inicialmente a hidrofobicidade era considerada de forma qualitativa, significando que a superfície não poderia ser molhada pela água.

van Oss e Giese em 1995 definiram um critério quantitativo que permite avaliar a hidrofobicidade de minerais a partir da energia de coesão entre as moléculas da superfície imersa em água.

Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, em função do crescimento bacteriano e das condições de cultivo. A hidrofobicidade de bactérias Gram-negativas é aumentada quando a quantidade de água no meio é reduzida porque a membrana externa tem grande concentração de lipídios e pouco peptidoglicano. A hidrofobicidade é a propriedade termodinâmica mais facilmente influenciada pela quantidade de água do meio. Já as bactérias Gram-positivas são menos influenciadas pela modificação da

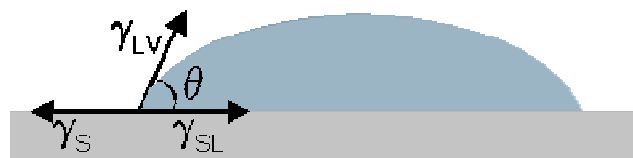
umidade do meio, em função da grande concentração de peptideoglicano em suas membranas e menor quantidade de lipídeos (STREVETT ; CHEN, 2003).

Dentre os vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade, incluem-se a adesão microbiana a hidrocarbonetos, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adesão a superfícies hidrofóbicas, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico e a medida do ângulo de contato. No entanto, o único método que permite determinar um valor quantitativo da hidrofobicidade é a medida do ângulo de contato, pois os demais fornecem apenas um valor relativo para comparação entre microrganismos ou superfícies (CHAVES, 2004).

2.3.1.1.1. Medição do ângulo de contato

A determinação das energias livres de superfície pode ser realizada pela medição do ângulo de contato, que é um método clássico e que permite medir a interação entre uma superfície e um determinado líquido. Para o uso desta técnica os sólidos devem ser planos, lisos e homogêneos. O ângulo de contato (θ) formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida (Figura 2) é o ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido encontra se depositado. Este ângulo permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado à hidrofobicidade da superfície.

Para van Oss e Giese, (1995), ângulos inferiores a 50° indicam uma superfície hidrofílica e ângulos superiores a 50° , hidrofóbicas.



Fonte: VAN LOOSDRECHT et al. (1987)

Figura 2 - Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. As tensões interfaciais da superfície do sólido (γ_S), do líquido em equilíbrio com o vapor (γ_{LV}) e superfície/líquido (γ_{SL}).

Para a determinação do ângulo da superfície de células bacterianas é necessária a construção de um filme plano de microrganismos, obtido por filtração de uma suspensão de células por uma membrana de baixa porosidade (BUSSCHER et al., 1984). O filme de bactérias formado deve ser o mais homogêneo possível. A etapa de secagem é considerada um ponto crítico e deve durar de 30 a 60 minutos para garantir que o excesso de água seja removido da superfície (VAN DER MEI et al., 1998). De acordo com Busscher et al. (1984) a camada de bactérias formada pode ser mantida por algumas horas em placas com ágar sem interferir na medida do ângulo de contato. Como esta camada tem uma grande porosidade, a água é rapidamente absorvida o que dificulta a medição do ângulo de contato. Apesar desta dificuldade este é o único método que permite uma estimativa da hidrofobicidade global da célula (DOYLE ; ROSENBERG, 1990).

A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (Equação 2) relaciona o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida com os componentes da tensão interfacial do líquido (γ_l^{LW} , γ_l^+ , γ_l^-) e da superfície (γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^-). Para a realização das medidas, deve-se utilizar um líquido apolar e dois polares. Os líquidos usados devem cumprir o requisito de ter tensão interfacial superior à tensão interfacial do sólido para que este não se espalhe muito rapidamente e impossibilite a medida.

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

Na equação 2, γ_l^{TOT} é a tensão interfacial total do líquido; γ_l^{LW} é a tensão interfacial das forças de interações de Lifshitz-van der Waals; γ_l^+ é a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons do componente ácido-base e γ_l^- é a tensão interfacial do componente doador de elétrons do componente ácido-base e os subscritos *s* e *l* indicam superfície e líquido, respectivamente.

Para líquidos apolares, a componente polar da tensão interfacial é nula e, portanto, a Equação 2 reduz-se a:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l}{4}(1 + \cos\theta)^2 \quad (\text{Equação 3})$$

Na Tabela 1 são mostradas os componentes da tensão interfacial de alguns líquidos, a 25 °C.

Tabela 1 - Componentes da tensão de interfacial de líquidos a 25 °C

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

Fonte: VAN DER MEI et al. (1998).

Após a medição do ângulo de contato da superfície com três líquidos de polaridades diferentes usando-se as equações 2 e 3 e, com auxílio da Tabela 1 podem ser obtidos os valores das tensões interfaciais da superfície (γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^-).

A energia livre global de interação, ΔG_{sas}^{TOT} , entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (a) é calculada pelo somatório das componentes apolar (ΔG_{sas}^{LW} - interações de Lifshitz-van der Waals) e polar (ΔG_{sas}^{AB} - interações ácido-base de Lewis) da energia livre global de interação.

$$\Delta G_{sas}^{TOT} = \Delta G_{sas}^{LW} + \Delta G_{sas}^{AB} \quad (\text{Equação 4})$$

sendo ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} , as componentes apolar e polar respectivamente, de energia livre global de interação, entre a superfície (s) e a água (a).

A componente apolar é determinada por:

$$\Delta G_{sas}^{LW} = -2(\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_a^{LW}}) \quad (\text{Equação 5})$$

A componente polar é calculada por:

$$\Delta G_{sas}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_s^-}\right) \quad (\text{Equação 6})$$

Quanto maior o valor absoluto de ΔG_{sas}^{TOT} mais hidrofóbica é a superfície por apresentar valores negativos ou mais hidrofílica quando apresenta valores positivos (VAN OSS ; GIESE, 1995).

2.3.1.2. Teoria termodinâmica da adesão

A adesão de uma célula microbiana a uma superfície sólida em solução aquosa só se estabelece se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido (bl) e a interface superfície de adesão/líquido (sl) terá que ser substituída pela interface bactéria/superfície de adesão (bs). Segundo a teoria termodinâmica, a energia livre permutada neste fenômeno tende a ser minimizada e a adesão só se verifica se o processo conduzir a uma diminuição da energia livre global (CHAVES, 2004).

A energia livre total de adesão, $\Delta G_{adesão}$, entre duas superfícies é dada pela equação de Dupré (VAN OSS, 1991).

$$\Delta G_{adesão} = \gamma_{bs} - \gamma_{bl} - \gamma_{sl} \quad (\text{Equação 7})$$

em que γ_{bs} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão, γ_{bl} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido e γ_{sl} é a tensão interfacial entre as superfícies superfície de adesão/líquido.

Pela teoria de van Oss et al., (1988) a tensão interfacial corresponde ao somatório da componente apolar das interações de Lifshitz-van der Waals (LW) e da componente polar das interações ácido-base de Lewis (AB).

Assim, a tensão interfacial total é dada pela seguinte expressão:

$$\gamma^{tot} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (\text{Equação 8})$$

Sendo as componentes apolar e polar das tensões interfaciais aditivas, a equação de Dupré pode ser reformulada de forma a obter a energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) (CHAVES, 2004).

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (\text{Equação 9})$$

Termodinamicamente para que a adesão seja favorecida é necessária uma diminuição da energia livre global ($\Delta G_{adesão} < 0$), no entanto, nem sempre este critério é verificado sendo que a adesão ocorre mesmo quando o $\Delta G_{adesão}$ é > 0 . Isto pode ser explicado pelo fato de que nenhuma destas teorias leva em conta os aspectos microbiológicos da adesão.

2.3.2. Aspectos microbiológicos da adesão

As propriedades da superfície da parede celular bacteriana têm um papel importante na adesão, na fase inicial das infecções bacterianas e na formação de biofilmes. Por serem sistemas vivos, as bactérias podem mudar a composição da sua superfície durante a fase de crescimento ou em função de mudanças de composição do meio (UBBINK ; ZAMMARETTI, 2007). Essas mudanças, conseqüentemente, refletem nas suas propriedades físico-químicas.

Características bacterianas, como carga superficial, hidrofobicidade e apêndices celulares podem aumentar a capacidade de adesão (BUSSCHER ; WEERKAMP, 1987).

A termodinâmica da superfície microbiana é uma consequência das características físico-químicas dessa superfície que é controlada por componentes macromoleculares, por exemplo, lipopolissacarídeos, proteínas e exopolímeros que variam em quantidade com as condições de crescimento e de estirpe para estirpe (STREVETT ; CHEN, 2003).

Em bactérias Gram-positivas, como *B. cereus*, existe uma variação relevante na composição química e no peso molecular dos polissacarídeos presentes na superfície bacteriana. Quando secretados para o meio, os polissacarídeos são chamados de exopolissacarídeos, mas como eles freqüentemente são reabsorvidos na superfície da bactéria, continuam a determinar suas propriedades (UBBINK ; ZAMMARETTI, 2007).

Algumas estruturas extracelulares, conhecidas como apêndices celulares, podem facilitar a adesão das bactérias à superfícies. Quando a bactéria não faz contato direto com a superfície, a adesão é mediada por estes apêndices que são capazes de sobrepor os efeitos da repulsão eletrostática (DENYER et al., 1993). Eles podem variar em tamanho e rigidez e chegam a

ter várias vezes a dimensão da célula (BUSSCHER, 1987). Dentre estas estruturas extracelulares destacam-se i) os flagelos, que são estruturas responsáveis pela motilidade das bactérias e medeiam a adesão irreversível que é estabelecida por pontes poliméricas; ii) polímeros extracelulares, que correspondem às substâncias excretadas por muitas bactérias para o ambiente, sendo sua produção associada à adesão irreversível de bactérias a superfícies de adesão por pontes poliméricas; e iii) fímbrias que são apêndices que não estão associados à motilidade das bactérias, no entanto, são responsáveis pela capacidade de adesão das bactérias a outras bactérias, a células animais ou vegetais ou a partículas sólidas (CHAVES, 2004).

2.3.3. Rugosidade e microtopografia

A rugosidade é um fator importante na formação de biofilmes porque a maioria das superfícies em que ocorrem a deposição de microrganismos possui irregularidades. A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de microrganismos, pois representam locais de abrigo menos influenciados pelas forças do fluido. O efeito da rugosidade da superfície é importante quando ocorre a adesão da primeira camada de microrganismos tendo menor influência quando uma superfície de adesão já tem biofilme formado (MACHADO, 2005).

O aumento do grau de adesão associado à rugosidade da superfície atribui-se à proteção das células no interior das irregularidades da superfície e das forças de cisalhamento, o que permite a adesão irreversível seja estabelecida mais facilmente, sendo, por isso, locais preferenciais para a colonização inicial. Além disso, as irregularidades da superfície contribuem para o aumento na área superficial disponível para a adesão (QUIRYNEN et al., 1994).

Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície, e podem apresentar fissuras, microfissuras ou fendas com tamanho suficiente para alojar microrganismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de

procedimentos de higienização e favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de microrganismos (BOWER et al., 1996).

Nos Estados Unidos existe um padrão sanitário (US 3-A 01-07 Associação Internacional Higienistas de Leite, Alimentos e Meio Ambiente, 1990) que especifica que superfícies que entram em contato com alimentos precisam ter grau de polimento $n^{\circ}4$. Um padrão alemão específico para indústria de laticínios determina que a rugosidade da superfície não deve exceder valores superiores a $0,8 \mu\text{m}$ de rugosidade média (R_a) (DIN 11 480, 1992).

A Microscopia de Força Atômica (MFA) é uma técnica que permite a avaliação da rugosidade das superfícies. Ela baseia-se na varredura da superfície estudada por meio de sondas de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas, da ordem de alguns angstroms (10^{-10} metros), o que proporciona uma alta resolução espacial, tanto lateral como vertical na visualização de superfícies, em nível atômico, de diferentes naturezas, como metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes e em diversos meios como vácuo, pressão atmosférica e meios líquidos (FERREIRA, 2006).

O princípio de funcionamento do MFA baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal ou ponteira de alguns micrometros de comprimento entre 100 e $200 \mu\text{m}$ e em geral com menos de 20 nm de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever (Figura 3). À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bidimensionais e tridimensionais. A força

mais comumente associada com MFA na deflexão do cantilever é a força de van der Waals (FERREIRA, 2006).

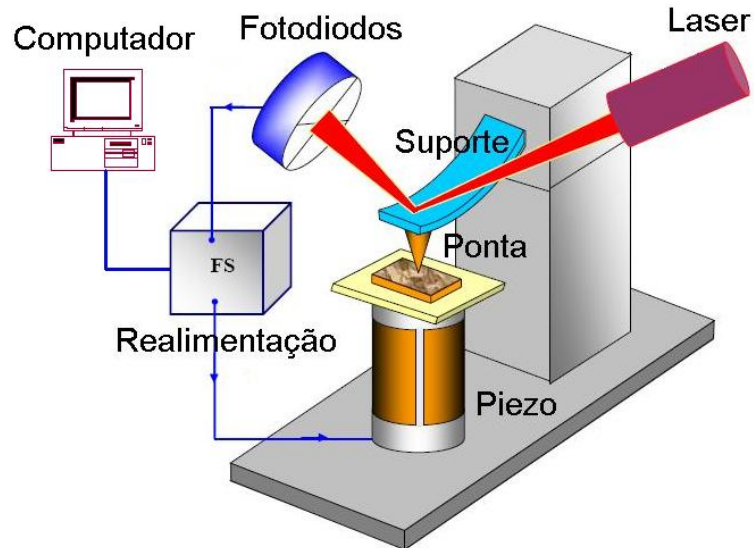


Figura 3 - Figura esquemática do sistema de microscopia de força atômica.

A técnica de MFA (Figura 4), pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente.

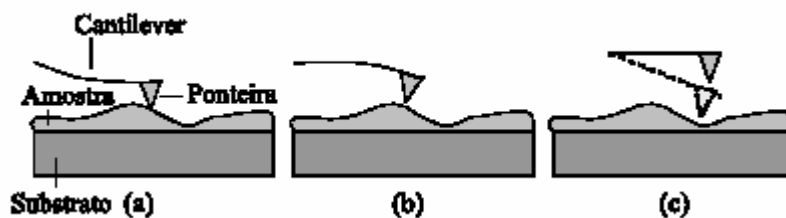


Figura 4 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: a) modo contato, b) modo não-contato, c) modo contato intermitente. (Fonte: Ferreira, 2006).

Para amostras biológicas que geralmente são sensíveis e nem sempre estão fortemente aderidas ao substrato utiliza-se o modo contato intermitente.

A MFA é uma ferramenta indispensável no estudo das características da superfície da célula bacteriana uma vez que permite observar os aspectos físico-químicos e os aspectos microbiológicos que influenciam à adesão (UBBINK; ZAMMARETTI, 2007).

Com o advento da MFA, tornou-se possível correlacionar as propriedades físico-químicas das bactérias com as propriedades moleculares em nanoescala, incluindo a natureza química dos constituintes da superfície bacteriana. A resolução espacial da MFA permite obter imagens com alta resolução da estrutura e topografia da bactéria. Por meio do uso de pontas modificadas hidrofobicamente ou com carga elétrica controlada, a distribuição espacial da hidrofobicidade e da carga elétrica, respectivamente, podem ser analisadas (DUFRENE, 2000).

Assim como a MFA a perfilometria é uma técnica que permite avaliar a rugosidade de superfícies por meio do perfilômetro. O princípio de funcionamento do perfilômetro é semelhante ao do microscópio de força atômica e está baseado na varredura da superfície da amostra com uma ponta de tamanho reduzido.

2.4. Aço inoxidável

O aço inoxidável é um material comumente usado na construção de equipamentos e utensílios de processamento de alimentos em geral como, tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, mesas, pias, bancadas para manuseio, entre outras aplicações (JULLIEN et al., 2002). Este material é estável a uma variedade de temperaturas de processamento e apresenta alta resistência à corrosão em função da camada protetora de óxido de cromo que se forma na presença de oxigênio (HAYES, 1993; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Segundo Boulange-Petermann (1996), este material é relativamente o mais resistente ao ataque de agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes usados na indústria de alimentos, como hipoclorito de sódio, ácido peracético e iodóforos. Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo fluxo do alimento, detergentes e sanitizantes (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

O aço inoxidável pode ser produzido em diferentes graus e diferentes polimentos de acordo com a finalidade o que influencia a adesão bacteriana em função das suas várias microtopografias e propriedades físico-químicas

(JULLIEN et al., 2002). A principal diferença entre os graus disponíveis comercialmente é sua composição relativa de ferro, cromo e níquel. Dentre os vários tipos de aços inoxidáveis disponíveis, os mais utilizados são os do chamado grupo 18-8, ou seja, que apresentam em sua composição, aproximadamente, 18 % de cromo e 8 % de níquel. Deste grupo, as alterações do grau 300, por exemplo, 304 e 316, satisfazem à maioria das necessidades da indústria de alimentos. O grau 304 é resistente à corrosão originada pela maioria dos alimentos e agentes de limpeza, não apresenta problemas de manchas, é de fácil higienização e relativamente barato. Em situações em que a possibilidade de corrosão é mais intensa, como no caso de salmouras e alimentos muito ácidos, como o vinagre, deve ser empregado o grau 316 que apresenta cerca de 10 % de níquel e 3 % de molibdênio. O aço inoxidável difere também no acabamento da superfície que pode variar de acordo com o polimento empregado que se classifica de 1, sem polimento, até 8, cuja superfície é espelhada. O polimento mecânico e o eletropolimento são tratamentos adicionais que podem ser feitos na superfície do aço inoxidável os quais tem por objetivo reduzir a rugosidade (JULLIEN et al, 2002). Em geral, a indústria de alimentos utiliza o aço inoxidável 304 com polimento 4 (HAYES, 1993).

2.5. Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva é uma área de estudo que utiliza equações matemáticas para prever o crescimento e a atividade de um microrganismo em um alimento, ao longo do tempo (JAY, 2005). A microbiologia preditiva é fundamentada na premissa de que as respostas das populações microbianas às condições ambientais são reprodutíveis (ROSS et al., 2000).

O uso de modelos matemáticos em microbiologia de alimentos teve seu início aproximadamente em 1920, com a implementação de métodos para cálculo do tempo de destruição térmica de microrganismos relacionados com a indústria de enlatados. Porém, o interesse de aplicação por técnicas de modelagem matemática para descrever o crescimento e a sobrevivência de microrganismo começou a partir da década de 80 (ROSS; MCMEEKIN, 1994). O aumento da atenção na modelagem foi impulsionado pela preocupação com

microrganismos veiculados por alimentos assim, foram desenvolvidos modelos de crescimento de patógenos em diferentes alimentos. Embora um grande número de fatores possa influenciar o crescimento ou sobrevivência de um dado microrganismo, na maioria dos alimentos é usual que somente alguns tenham maior efeito, sendo, portanto importante que estes estejam incluídos no modelo (PEÑA, 2005).

Pesquisas têm mostrado a influência da temperatura e do tempo sobre a adesão bacteriana e a formação de biofilmes. Assim é importante formular modelos matemáticos para estudar os efeitos desses fatores e suas interações. A metodologia de superfície de resposta é usada para otimizar e modelar operações de processamento de alimentos (FLOROS et al., 1992; GUILLOU; FLOROS, 1993) e também pode ser usada para o melhor entendimento do processo de adesão e auxiliar na tomada de decisões quanto a procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos na indústria de alimentos (PEÑA, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

3.1. Superfície

Foram utilizados cupons-teste de aço inoxidável AISI 304 #4, dimensões 10 mm x 10 mm x 0,5 mm para avaliar adesão de células de *B. cereus* em diferentes tempos e temperaturas de contato e a influência da hidrofobicidade e da rugosidade da superfície sobre a adesão.

3.2. Suspensão do microrganismo

Foi utilizada uma suspensão de células vegetativas de *B. cereus* isolado de superfície de aço inoxidável da máquina de envase de leite pasteurizado, identificada por ribotipagem como Ribo 1 222-173-S4 (SALUSTIANO, 2007).

A partir da cultura pura de *B. cereus* mantida à temperatura de -80 °C em tubo Eppendorf contendo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol (80:20), prepararam-se suspensões com cerca de 10^7 UFC/mL. Para o uso nos experimentos, suspensões de células vegetativas foram produzidas em duas

repicagens consecutivas em caldo BHI, incubadas a 32 °C por 24 horas. O número de células nas suspensões foi determinado por espalhamento em superfície em PCA, e incubação a 32 °C por 24 horas.

3.3. Adesão de *Bacillus cereus* a cupons de aço inoxidável

Antes de cada análise, os cupons de aço inoxidável foram limpos por meio de escovação com esponja de poliuretano empregando-se água e detergente líquido, enxaguados com água destilada e imersos em álcool etílico 70% por 1 hora para remoção de gordura, enxaguados novamente com água destilada, secos e esterilizados em autoclave 121 °C/15 minutos (PARIZZI, 2004).

Os cupons teste da superfície foram imersos em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente acrescido de um volume de suspensão de células vegetativas de forma a obter uma contagem aproximada de 10^3 UFC/mL. As amostras foram incubadas sob diferentes condições de tempo e temperatura.

Para determinar os tempos e temperaturas utilizadas na adesão foi usado um planejamento fatorial completo a dois níveis. Deste modo foram determinadas três regiões de temperatura. A região de baixa temperatura de 4 °C a 10 °C sendo 7 °C o ponto central, a região de alta temperatura de 25 °C a 35°C com ponto central em 30 °C e a região que compreendeu toda a faixa de temperatura estudada de 4 °C a 35 °C. As temperaturas de 15 °C e 20 °C foram adicionadas para fazer a ligação entre as regiões de baixa e de alta temperatura. O tempo de adesão foi de 1 dia a 10 dias sendo 5,5 dias o ponto central. As avaliações da quantidade de células aderidas por cm^2 foram realizadas após os tempos de adesão definidos.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a resposta observada y (UFC/cm^2), por meio de uma relação polinomial de segunda ordem, do tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \beta_4 (X_1)^2 + \beta_5 (X_2)^2 \quad (\text{Equação 10})$$

Os coeficientes do modelo dado pela equação 10 foram determinados pelo método dos mínimos quadrados, usando o pacote estatístico SAS (versão 9.1). A significância estatística do modelo (equação 10) foi verificada pelo teste

de F e análise de variância (ANOVA). A significância dos parâmetros individuais (β_i) foram baseadas pelo teste t de *student*.

3.4. Determinação do número de células aderidas

Inicialmente, os cupons foram retirados do caldo nutriente, com o auxílio de uma pinça esterilizada e imersos em 10 mL de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram imersos em tubos contendo volume apropriado da mesma solução diluente e submetidos ao vórtex, durante 1 minuto para remoção de células sésseis (PARIZZI, 2004). Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri com ágar padrão para contagem (PCA) e incubadas a 32 °C/ 24 horas. O número de UFC/cm² foi determinado usando a seguinte fórmula:

$$UFC / cm^2 = \frac{(V_D / V_A) \times M \times D}{A}$$

Onde: V_D : volume do diluente utilizado na rinsagem (mL)

V_A : volume da alíquota utilizada no plaqueamento (mL)

M: média da contagem obtida nas placas (UFC)

D: diluição realizada

A: área do cupom (cm²)

Foi determinado também o número de bactérias na suspensão onde os cupons estavam imersos no momento da retirada dos cupons. Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri com PCA e incubadas à 32° C/ 24 horas. A contagem foi expressa em UFC/mL.

3.5. Determinação da tensão interfacial e da hidrofobicidade pelo goniômetro

Foram determinados os ângulos de contato com água, formamida e α -bromonaftaleno para superfícies avaliadas (Tabela 2) utilizando-se o equipamento Goniômetro (Kruss®, Alemanha).

Após a temperatura e tempo de contato definidos, os cupons foram retirados do caldo nutriente com o auxílio de uma pinça e imersos em 10 mL de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Foi feita a medição do ângulo de contato de uma gota de 2,0 µL durante trinta segundos consecutivos, a cada segundo, para todos os líquidos (água, formamida e α-bromonaftaleno) e superfícies avaliadas. As medidas foram realizadas entre 20 °C e 25 °C. Foram feitas três repetições para cada líquido em cada superfície.

Tabela 2 - Superfícies avaliadas quanto ao ângulo de contato

1. Aço inoxidável AISI 304, #4.
2. Aço inoxidável AISI 304, #4 com suspensão de células vegetativas de <i>B. cereus</i> aderida.
3. Superfície de células vegetativas de <i>B. cereus</i> .

As medidas do ângulo de contato da superfície das células de *B. cereus* foram realizadas sobre uma camada de células vegetativas usando o método descrito por Busscher et al. (1984). Primeiramente, *B. cereus* foi ativado duas vezes em caldo BHI com a finalidade de se obter uma suspensão da cultura ativa com aproximadamente 10^7 UFC/mL. Posteriormente, 30 mL da suspensão ativa foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos, sendo em seguida lavada por três vezes em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M. A massa celular foi ressuspendida neste mesmo tampão sendo depositada sobre um filtro de membrana de acetato de celulose de 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro, por filtração à vácuo. Foram adicionados 30 mL de água ultra-pura (Milli-Q) no momento da filtração. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para Placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v). As membranas foram cortadas em três partes sendo cada parte usada para medição do ângulo de contato com cada líquido diferente. As medidas de ângulos de contato foram realizadas para três líquidos com diferentes polaridades, ou seja, água, formamida e α-bromonaftaleno.

Os componentes da tensão interfacial das superfícies nas condições avaliadas foram determinados pela Equação 2 apresentada anteriormente.

Para se determinar às três componentes da tensão interfacial das superfícies, o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes sobre a superfície foi determinado.

Com os valores contidos na Tabela 1 e aplicando-se a Equação 2 para cada um dos líquidos usados obteve-se o seguinte sistema de equações:

$$\gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos\theta_B)^2 \quad (\text{Equação 11})$$

$$5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} = 36,4(1 + \cos\theta_A) - 15,55(1 + \cos\theta_B) \quad (\text{Equação 12})$$

$$6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos\theta_F) - 20,806(1 + \cos\theta_B) \quad (\text{Equação 13})$$

Pela resolução destas três últimas equações, obtêm-se as três componentes da tensão interfacial da superfície, γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^- , que permitem calcular a tensão interfacial global de uma superfície (s), γ_s^{TOT} :

$$\gamma_s^{TOT} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (\text{Equação 14})$$

$$\gamma_s^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-}) \quad (\text{Equação 15})$$

A energia livre global de interação ΔG_{sas}^{TOT} entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (a) é calculada pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interação, ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} respectivamente, conforme as equações 4, 5 e 6 apresentadas anteriormente no item 2.3.1.1.1.

Os valores dos componentes da tensão interfacial da água (γ_a^{LW} , γ_a^+ e γ_a^-) encontram-se na Tabela 3.

Quando o ΔG_{sas}^{TOT} for negativo, a superfície de adesão ou da bactéria será considerada hidrofóbica ($\Delta G_{sas}^{TOT} < 0$). Ao contrário, quando o ΔG_{sas}^{TOT} for positivo, a superfície será considerada hidrofílica ($\Delta G_{sas}^{TOT} > 0$).

3.6. Determinação da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$)

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial é possível determinar a energia livre total de adesão entre duas superfícies ($\Delta G_{adesão}$). Os valores das componentes das tensões interfaciais são determinados a partir dos valores calculados ou tabelados (Tabela 3), das tensões interfaciais das bactérias, das superfícies de adesão e do líquido em que estas duas superfícies se encontram imersas, que neste caso considera-se a água, através das seguintes equações definidas para um sistema bifásico de interação (bactéria/superfície) pela teoria termodinâmica:

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad (\text{Equação 16})$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW} \gamma_s^{LW}} \quad (\text{Equação 17})$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_b^+ \gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^- \gamma_s^+}\right) \quad (\text{Equação 18})$$

em que γ_{bs} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão, γ_{bl} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido e γ_{sl} é a tensão interfacial entre as superfícies superfície de adesão/líquido.

Como a energia livre está diretamente relacionada à tensão interfacial $\Delta G_{adesão}$ pode ser representado da seguinte forma (CHAVES, 2004):

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (\text{Equação 19})$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (\text{Equação 20})$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (\text{Equação 21})$$

O valor de $\Delta G_{ades\tilde{a}o}$ permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando $\Delta G_{ades\tilde{a}o} < 0$ e, ao contrário, desfavorável quando $\Delta G_{ades\tilde{a}o} > 0$.

3.7. Determinação da microtopografia e rugosidade por microscopia de força atômica e perfilômetro

A microtopografia do aço inoxidável foi avaliada utilizando-se o microscópio de força atômica (Universal SPM System Ntegra Prima/NT-MDT) e o perfilômetro (Ambios Technology, XP1) do Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV. As análises das imagens obtidas permitiram a determinação da rugosidade das amostras por meio do valor da rugosidade média (R_a), medida como a média das diferenças de altura observadas. No MFA as medidas foram realizadas utilizando o modo denominado de semi-contato, no qual a ponta fica em contato intermitente com a superfície.

Após as temperaturas e tempos de contato definidos pelo desenho experimental os cupons foram retirados do caldo nutriente, com o auxílio de uma pinça e imersos em 10 mL água peptonada a 0,1%, por 1 minuto, para remoção de células planctônicas. Eles foram colocados em placas de Petri e levados para análise no MFA e perfilômetro. A área total da varredura foi de $100 \mu\text{m}^2$ no MFA. No perfilômetro foi analisada uma linha de 1mm em cada cupom. As medidas foram feitas em três repetições com duplicatas.

Para comparar a rugosidade das superfícies de aço inoxidável antes e após a adesão de diferentes quantidades de *B. cereus* foi realizada uma análise de regressão à 5 % de probabilidade. Foi realizado o teste Tukey para comparar as médias das rugosidades observadas ($\alpha=0,05$) com auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável

Os dados relativos ao número de células de *B. cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável após diferentes tempos e temperaturas de adesão são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias da adesão de células de *Bacillus cereus* nos cupons de aço inoxidável após diferentes temperaturas e tempos de contato, expressas em log UFC/cm²

Experimentos	Log UFC/cm ² *
E1 (4 °C/ 1 d)	0,91 ± 0,66
E2 (10 °C/ 1 d)	1,40 ± 1,00
E3 (25 °C/ 1 d)	3,21 ± 0,67
E4 (35 °C/ 1 d)	4,01 ± 0,80
E5 (7 °C/ 5,5 d)	0,50 ± 0,42
E6 (15 °C/ 5,5 d)	3,32 ± 0,43
E7 (20 °C/ 5,5 d)	3,15 ± 0,21
E8 (30 °C/ 5,5 d)	3,66 ± 0,61
E9 (4 °C/ 10 d)	0,31 ± 0,61
E10 (10 °C/ 10 d)	1,16 ± 0,95
E11 (25 °C/ 10 d)	3,43 ± 0,81
E12 (35 °C/ 10 d)	4,43 ± 0,77

* média de três repetições.

Com o aumento de temperatura de 4 °C para 35 °C observou-se o aumento do número de células de *B. cereus* aderidas em mais de 3 ciclos log para o tempo de adesão de 1 dia e em mais de 4 ciclos log para o tempo de adesão de 10 dias resultado que indicou a importância e a influência da temperatura no processo de adesão (Tabela 3).

O número máximo de células aderidas, detectado nos cupons incubados a 35 °C durante 10 dias, 4,43 UFC/cm², foi próximo daquele das células aderidas quando os cupons permaneceram a esta mesma temperatura durante 1 dia, log 4,01 UFC/cm², (Tabela 3) o que reforçou a importância da temperatura em relação ao tempo para adesão desta bactéria.

A Figura 5 representa o logaritmo do número de UFC/cm² de células de *B. cereus* aderidas a cupons de aço inoxidável após 1 dia e 10 dias de adesão em diferentes temperaturas.

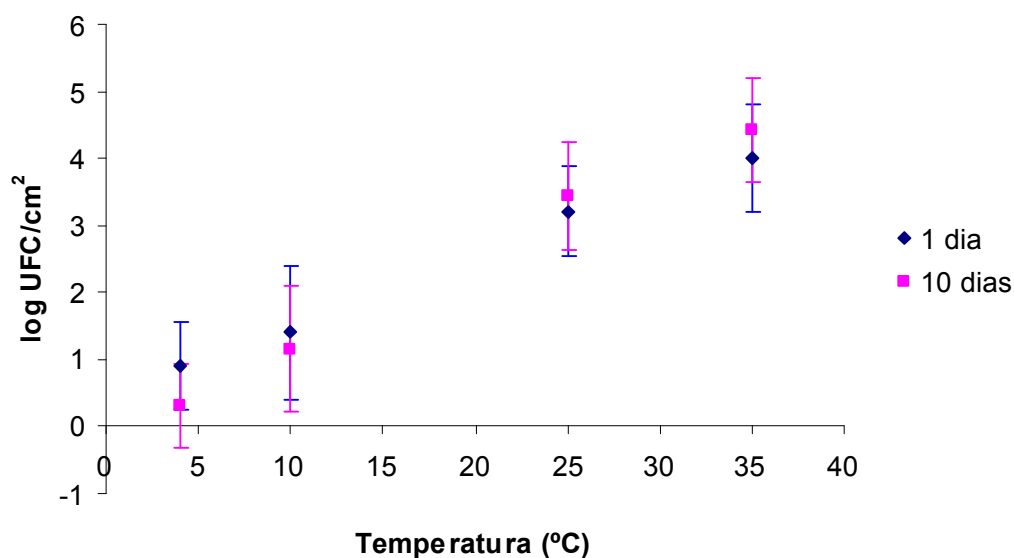


Figura 5 - Logaritmo do número de UFC/cm² de células de *Bacillus cereus* aderido em cupons de aço inoxidável após 1 dia e 10 dias de adesão a 4 °C, 10 °C, 25 °C e 35 °C.

Peña et al. (2007) ao usarem leite como meio de crescimento encontraram resultados semelhantes de adesão de *B. cereus* em superfície de aço inoxidável, em que um aumento na temperatura de 4 °C para 36 °C levou a um aumento de 4 ciclos log no número de células aderidas. Esses autores também detectaram a adesão de células de *B. cereus* à temperaturas tão baixas quanto 4 °C.

Outras pesquisas já demonstraram a importância da temperatura na adesão microbiana a superfícies. Hood e Zottola (1995) observaram que *Yersinia enterocolitica* aderiu melhor na superfície de aço inoxidável a 21 °C do que a 10 ou 35 °C, isto porque esta bactéria não produz flagelo a 35 °C o que influenciou a capacidade de adesão. Estudos mostraram que a adesão de *Listeria monocytogenes* à superfície de aço inoxidável também foi influenciada pela temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (MAFU et al., 1991; PEREZ et al., 1999).

A contagem da suspensão de células onde os cupons de aço inoxidável estavam imersos foi realizada paralelamente à contagem do número de células aderidas aos cupons. Observou-se que a estirpe de *B. cereus* não cresceu a 4°C, 7°C e 10 °C, resultado que pode explicar o menor número de células aderidas nestas temperaturas.

Houve aumento considerável da adesão quando a temperatura foi alterada de 7 °C para 15 °C após 5,5 dias de incubação (Figura 6).

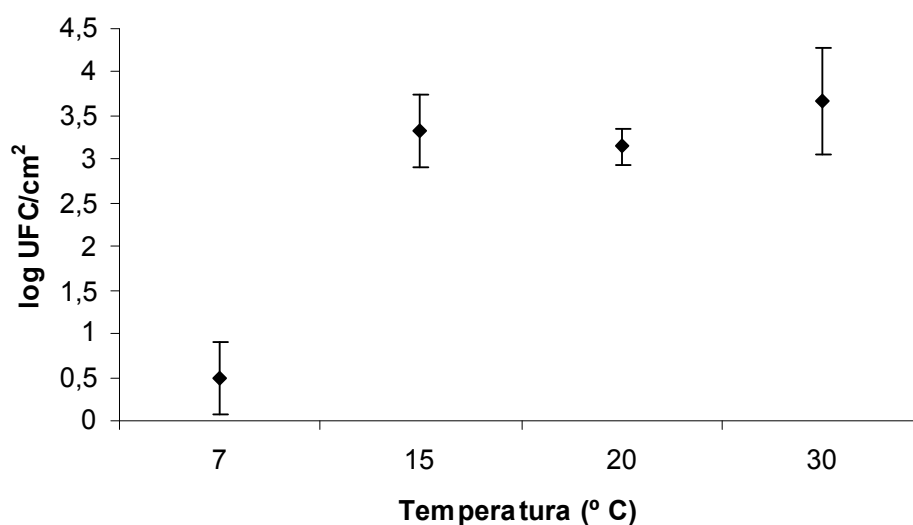


Figura 6 - Logaritmo do número de UFC/cm² de *Bacillus cereus* aderidos em cupons de aço inoxidável após 5,5 dias de adesão a 7 °C, 15 °C, 20 °C e 30 °C.

De acordo com a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na indústria de laticínios o leite pode ficar armazenado à 7 °C, por 24 horas (BRASIL, 2002). *B. cereus* foi capaz

de aderir a baixas temperaturas, 4 °C e 10 °C, alcançando log 0,91 UFC/cm² e log 1,40 UFC/cm² após um dia de adesão e log 0,31 UFC/cm² e log 1,16 UFC/cm² após dez dias de adesão (Tabela 3).

Portanto abusos na temperatura de armazenamento influenciam decisivamente o número de bactérias aderidas. Quando a temperatura aumentou de 7 °C para 15 °C o número de UFC/cm² aumentou em cerca de 3 ciclos log.

Peng, Tsai, Chou (2002), avaliaram a ação do hipoclorito de sódio no controle de *B. cereus* em indústrias de laticínios, nas concentrações de 25 mg/L e 50 mg/L de cloro residual total, expresso em Cl₂. Em ambas as concentrações, esse agente químico sanitizante foi eficiente para inativação de células planctônicas, com uma redução de 5,5 log UFC/mL nos números de *B. cereus*, após 15 segundos de exposição. Entretanto, no mesmo estudo, quando o mesmo experimento foi conduzido com cupons contendo biofilmes formados a partir de adesão de *B. cereus* em superfícies com resíduos de leite, houve uma maior resistência das células microbianas do biofilme ao agente químico. Apenas 0,94 e 1,51 log UFC/cupom de redução na população bacteriana foram observadas, após uma exposição de 30 segundos e 300 segundos, respectivamente, a 50 mg/L de cloro residual total.

Faille et al. (2001) constataram que 10% dos esporos de *B. cereus* aderidos ao aço inoxidável resistiram a um procedimento de higienização *Cleaning in Place* (CIP) da superfície.

Os dados desses estudos demonstram a importância do controle da adesão de células microbianas para a eficiência da higienização das superfícies usadas na indústria. A permanência de células bacterianas aderidas nas superfícies pode levar à formação de biofilmes ao longo do tempo.

4.2. Modelagem da adesão

Nas Tabelas 4, 5, e 6 estão apresentadas as análises de variância do logaritmo decimal do número de UFC/cm² de células de *B. cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável nas três regiões de temperatura estudadas.

Tabela 4 - Análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC/cm² de células de *Bacillus cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável na região de baixa temperatura (4 °C – 10 °C)

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Tempo	1	0.406614	0.406614	221.3095	0.004488*
Temperatura	1	0.773743	0.773743	421.1284	0.002366*
TempoxT	1	0.199143	0.199143	108.3886	0.0091*

*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 5 - Análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC/cm² de células de *Bacillus cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável na região de alta temperatura (25 °C – 35 °C)

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Tempo	1	0.101932	0.101932	1.31152	0.370677 ^{ns}
Temperatura	1	0.805156	0.805156	10.35967	0.084476*
TempoxT	1	0.009421	0.009421	0.121213	0.760953 ^{ns}

*significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 6 - Análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC/cm² de células de *Bacillus cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável para toda faixa de temperatura estudada (4 °C – 35°C)

FV	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Tempo	1	0.005386	0.005386	0.017444	0.89783 ^{ns}
Temperatura	1	21.38315	21.38315	69.25306	0.0001*

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Na região de baixa temperatura os fatores estudados, tempo e temperatura, foram significativos ($p < 0,05$) assim como a interação entre eles (Tabela 4).

Na região de alta temperatura apenas a temperatura foi significativa ($p < 0,1$) (Tabela 5).

Pôde-se observar por meio da análise de variância feita para toda faixa de temperatura estudada apenas a temperatura foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Foram obtidos modelos matemáticos que descreveram os logaritmos do número de UFC/cm² de células de *B. cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável nas três regiões de temperaturas estudadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Modelos matemáticos obtidos para as três regiões de temperatura estudadas

Regiões de Temperatura	Modelo matemático (log UFC/cm ²)
Baixa (4 °C a 10 °C)	= - 0,18842 - 0,186547 x t + 0,055701 x T + 0,016528 x t x T
Alta (25 °C a 35 °C)	= 1,292649 + 0,077868 x T
Total (4 °C a 35 °C)	= 0,248919 + 0,120499 x T

t = tempo; T = temperatura.

Na região de baixa temperatura o logaritmo do número de UFC/cm² de células de *B. cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável diminuiu com o aumento do tempo de adesão (1d a 10 d) e aumentou com o aumento da temperatura de adesão (4 °C a 10 °C). A diminuição do número de células bacterianas aderidas aos cupons após 10 dias de incubação na região de baixa temperatura pode ter ocorrido pelo fato de que, após um longo período de incubação à baixas temperaturas as células de *B. cereus* podem ter entrado em um estado de estresse, e apesar de ainda poderem estar metabolicamente ativas não foram recuperadas quando cultivadas nos meios de culturas usados rotineiramente para contagem de bactérias. Em condições favoráveis de crescimento estas bactérias são capazes de retomar seu crescimento normal e podem então se multiplicar na superfície. Outra possibilidade refere se ao fato de que a temperatura baixa poderia levar à esporulação das células vegetativas de *B. cereus* e, por exemplo, após 10 dias, parte dos esporos foi incapaz de germinar nas condições de cultivo.

Na região de alta temperatura e para faixa total de temperatura estudada o logaritmo do número de UFC/cm² de células de *B. cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável aumentou com o aumento de temperatura. Nestas duas faixas de temperatura o tempo não foi significativo para adesão.

Na Tabela 8 são apresentados os valores observados e preditos do logaritmo do número de UFC/cm² de células de *B. cereus* aderidas em cupons de aço inoxidável nas diferentes temperaturas e tempos de adesão.

Tabela 8 - Valores observados e preditos do logaritmo do número de UFC/cm² de células de *Bacillus cereus* aderidas a cupons de aço inoxidável, nas diferentes temperaturas e tempos do desenho experimental

Experimentos	Valores observados* (log UFC/cm ²)	Valores preditos (log UFC/cm ²)
E1 (4 °C/ 1 d)	0,91	-0,09
E2 (10 °C/ 1 d)	1,40	0,35
E3 (25 °C/ 1 d)	3,21	3,24
E4 (35 °C/ 1 d)	4,01	4,02
E5 (7 °C/ 5,5 d)	0,50	-0,19
E6 (15 °C/ 5,5 d)	3,32	2,05
E7 (20 °C/ 5,5 d)	3,15	2,66
E8 (30 °C/ 5,5 d)	3,66	3,63
E9 (4 °C/ 10 d)	0,31	-1,17
E10 (10 °C/ 10 d)	1,16	0,16
E11 (25 °C/ 10 d)	3,43	3,24
E12 (35 °C/ 10 d)	4,43	4,02

* média de três repetições.

Os valores preditos foram calculados usando-se os modelos matemáticos apresentados na Tabela 7. Pelos valores apresentados na Tabela 8 pôde-se observar que apenas na região de alta temperatura houve um bom ajuste dos dados pelo modelo matemático obtido. Uma possível explicação seria que na região de baixa temperatura o número de células aderidas aos cupons foi muito baixo o que dificulta a enumeração das bactérias aderidas uma vez que a técnica utilizada para contagem possui um limite de detecção. O mesmo pode ter ocorrido com o modelo da região total de temperatura já que este também engloba baixas temperaturas.

Na Figura 7 é apresentado o erro experimental para os valores preditos pelos modelos matemáticos obtidos para as três regiões de temperatura estudadas. Na região de alta temperatura, onde o modelo obtido proporcionou um bom ajuste dos dados, os erros apresentaram os menores valores.

Por meio da análise de variância e dos modelos obtidos ficou clara a importância da temperatura na adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável.

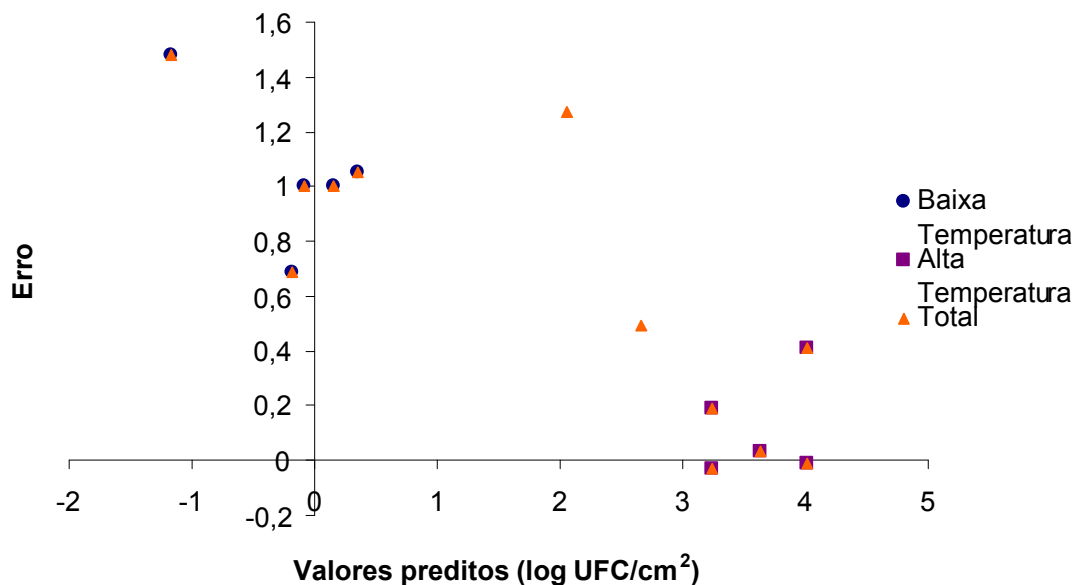


Figura 7 - Erro experimental para os valores preditos pelos modelos matemáticos obtidos para as três regiões de temperatura estudadas (Baixa, Alta e Total).

4.3. Análises dos ângulos de contato e tensões interfaciais

Na Tabela 9 são apresentados os valores médios dos ângulos de contato (Θ) com as superfícies de células de *B. cereus*, aço inoxidável e aço inoxidável com células de *B. cereus* aderidas, com água (Θ_A), formamida (Θ_F) e α -bromonaftaleno (Θ_B).

O critério primário de avaliação qualitativa da hidrofobicidade permite avaliar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície com base no valor do ângulo de contato da superfície formado com a água (θ_A). Assim, para ângulos superiores a 50° a superfície é considerada hidrofóbica. Caso contrário, se o ângulo é inferior a 50° a superfície será hidrofílica (AZEREDO, 1998).

De acordo com este critério a estirpe de *B. cereus* utilizada pode ser considerada hidrofílica já que forma um ângulo de contato com a água inferior a 50° (Tabela 9). Por este mesmo critério a superfície dos cupons com células *B. cereus* aderidas e incubados a $20^\circ\text{C}/5,5$ dias (E7) e $10^\circ\text{C}/10$ dias (E10) também são consideradas hidrofílicas. Já a superfície do aço inoxidável e aquelas avaliadas nos demais experimentos foram hidrofóbicas (Tabela 9).

Faille et al (2001) encontram ângulo de contato para o aço inoxidável com a água de 75° o que confirmou o caráter hidrofóbico deste material.

Tabela 9 - Valores médios dos ângulos de contato (Θ) com as superfícies de células de *Bacillus cereus*, aço inoxidável e aço inoxidável com células de *Bacillus cereus* aderidas, com água (Θ_A), formamida (Θ_F) e α -bromonaftaleno (Θ_B)

Superfície de Adesão	Ângulo de Contato (°)*		
	Θ_A	Θ_F	Θ_B
Aço Inoxidável	70,77 \pm 7,9	53,36 \pm 9,4	28,1 \pm 3,1
<i>B. cereus</i>	24,52 \pm 2,8	15,37 \pm 1,3	45,17 \pm 0,5
E1 (4 °C/ 1 d)	72,1 \pm 2,6	56,1 \pm 8,6	34,6 \pm 6,7
E2 (10 °C/ 1 d)	73,2 \pm 0,5	57,0 \pm 7,2	30,5 \pm 5,9
E3 (25 °C/ 1 d)	57,3 \pm 11,9	57,5 \pm 6,7	25,3 \pm 6,7
E4 (35 °C/ 1 d)	60,1 \pm 10,5	40,5 \pm 1,5	32,0 \pm 3,5
E5 (7 °C/ 5,5 d)	69,6 \pm 1,4	52,2 \pm 4,2	35,6 \pm 4,7
E6 (15 °C/ 5,5 d)	56,7 \pm 10,7	56,7 \pm 7,0	32,2 \pm 4,3
E7 (20 °C/ 5,5 d)	49,3 \pm 6,1	44,2 \pm 2,6	39,0 \pm 7,3
E8 (30 °C/ 5,5 d)	73,7 \pm 5,0	53,5 \pm 8,3	34,5 \pm 0,2
E9 (4 °C/ 10 d)	77,6 \pm 8,9	57,6 \pm 6,0	33,6 \pm 6,7
E10 (10 °C/ 10 d)	48,9 \pm 14,8	19,2 \pm 3,2	34,2 \pm 3,3
E11 (25 °C/ 10 d)	62,8 \pm 8,2	43,2 \pm 6,0	31,5 \pm 1,6
E12 (35 °C/ 10 d)	58,9 \pm 12,7	39,4 \pm 11,9	32,8 \pm 6,3

* média de três repetições.

Os valores dos ângulos de contatos com os três líquidos de polaridades diferentes foram usados para determinar os valores das tensões interfaciais (Tabela 10).

De acordo com Strevett e Chen (2003), γ^- tem um papel importante entre os parâmetros termodinâmicos da superfície. Estes autores demonstraram que γ^- é sempre maior do que γ^+ em *E.coli*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Isto comprova a teoria de que as células têm predominantemente caráter doador de elétrons (γ^-). Segundo Van der Mei et al. (1998), todas as superfícies biológicas são predominantemente doadoras de elétrons como consequência da presença do oxigênio na atmosfera e da hidratação da superfície da célula microbiana. Para *B. cereus* e para o aço inoxidável com o microrganismo aderido a tensão interfacial do componente doador de elétrons (γ^-) é sempre maior do que a tensão interfacial do

componente acceptor de elétrons (γ^+), o que confirma o caráter doador de elétrons das superfícies biológicas (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores das componentes apolar (γ^{LW}), polar (γ^{AB}) e respectivos parâmetros (γ^+ e γ^-) da tensão interfacial (γ^{TOT}) das superfícies de células de *Bacillus cereus*, aço inoxidável e aço inoxidável com células de *Bacillus cereus* aderidas

Superfície de Adesão	Tensão Interfacial (mJ/m ²)				
	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}	γ^{TOT}
Aço Inoxidável	39,3206	0,0899	6,3333	1,5091	40,8297
<i>B. cereus</i>	32,2682	3,2454	45,2929	24,2482	56,5164
E1 (4 °C/ 1 d)	36,8944	0,0956	12,2929	2,1681	39,0625
E2 (10 °C/ 1 d)	38,4688	0,0207	11,6946	0,9840	39,4528
E3 (25 °C/ 1 d)	40,2433	0,3842	0,4922	0,8697	41,1130
E4 (35 °C/ 1 d)	37,9096	1,0378	16,8009	8,3510	46,2606
E5 (7 °C/ 5,5 d)	36,4894	0,3478	12,4987	4,1699	40,6593
E6(15 °C/ 5,5 d)	37,8335	0,1378	7,6388	2,0519	39,8854
E7(20 °C/ 5,5 d)	35,0565	0,4573	32,1712	7,6712	42,7277
E8(30 °C/ 5,5 d)	36,9345	0,3508	9,1703	3,5871	40,5216
E9(4 °C/ 10 d)	37,2915	0,1260	7,6212	1,9598	39,2513
E10(10 °C/ 10 d)	37,0542	3,3996	20,0995	16,5324	53,5866
E11(25 °C/ 10 d)	38,0982	0,8236	15,1795	7,0715	45,1697
E12(35 °C/ 10 d)	37,6033	1,1625	17,5686	9,0384	46,6417

A superfície de aço inoxidável sem adesão bacteriana também possui tensão interfacial do componente doador de elétrons (γ^-) maior do que a tensão interfacial do componente acceptor de elétrons (γ^+). Chaves (2004), ao estudar a tensão interfacial do aço inoxidável 316, observou resultados semelhantes em relação aos componentes doadores e aceptores de elétrons da tensão interfacial, o que demonstra que esta superfície de adesão é predominantemente doadora de elétrons, como a maioria das superfícies sólidas.

É também possível estimar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico das superfícies a partir das componentes da tensão superficial. Quanto maior for o valor de γ^{LW} mais apolar é a superfície e, portanto, menor é sua afinidade com líquidos polares; quanto maior for o valor da componente γ^{AB} , mais água de hidratação tem a superfície e, portanto é mais hidrofílica. Assim, de acordo

com este critério a superfície das células de *B. cereus* e a superfície dos cupons com células de *B. cereus* aderidas e incubados a 10 °C/ 10 dias (E10) por apresentarem maiores valores de γ^{AB} em relação aos demais seriam considerados hidrofílicos. Este resultado difere do resultado encontrado quando se usa o critério do ângulo de contato com a água, já que por este critério a superfície dos cupons aderidos com *B. cereus* e incubados a 20 °C/ 5,5 dias (E7) também é considerada hidrofílica.

De acordo com Azeredo (1998), o parâmetro γ^- pode ser um indicador semiquantitativo do grau de hidrofobicidade. Para valores de $\gamma^- \leq 25,5$ mJ/m² a superfície é hidrofóbica, independente do valor da componente apolar. Quando $25 < \gamma^- < 35$ mJ/m² a hidrofobicidade é dependente da componente apolar e, neste caso, a superfície é hidrofílica quando $\gamma^{LW} \leq 45$ mJ/m² e hidrofóbica quando $\gamma^{LW} \geq 46$ mJ/m². Mais uma vez de acordo com os resultados (Tabela 10) a superfície das células de *B. cereus* e a superfície dos cupons com células de *B. cereus* aderidas e incubados a 20 °C/ 5,5 dias (E7) por não apresentarem $\gamma^- \leq 25,5$ mJ/m² são consideradas hidrofílicas. E as demais superfícies seriam hidrofóbicas por apresentarem $\gamma^- \leq 25,5$ mJ/m² inclusive a superfície dos cupons com células de *B. cereus* aderidas e incubados a 10 °C/ 10 dias (E10) que pelo critério qualitativo do ângulo de contato com água é considerada hidrofílica.

4.4. Análises da energia livre global de interação (ΔG_{sas}^{TOT})

Na Tabela 11 encontram-se os valores da energia livre global de interação, que permitem quantificar a hidrofobicidade. Estes valores foram calculados por meio das equações apresentadas no item 3.5.

Pelos valores da energia livre global de interação (ΔG_{sas}^{TOT}) (Tabela 11), que é um critério quantitativo de avaliação da hidrofobicidade, a superfície de células de *B. cereus* e a superfície dos cupons com células de *B. cereus* aderidas incubados a 20 °C/ 5,5 dias (E7) são consideradas hidrofílicas por apresentarem $\Delta G_{sas}^{TOT} > 0$, enquanto as demais superfícies são consideradas hidrofóbicas pois o ΔG_{sas}^{TOT} é < 0 . Resultados semelhantes foram obtidos quando a análise foi feita pelo critério semiquantitativo usando-se o valor de γ^- .

Por outro lado, estes diferem dos resultados obtidos quando comparados aos resultados do critério qualitativo de determinação da hidrofobicidade, ou seja, pelo ângulo de contato com água (Θ_A), o qual considera a superfície dos cupons com células de *B. cereus* aderidas e incubados a 10 °C/ 10 dias (E10) hidrofílica.

Tabela 11 - Valores das componentes apolar (ΔG_{sas}^{LW}), polar (ΔG_{sas}^{AB}) e da energia livre global de interação (ΔG_{sas}^{TOT}) das superfícies de células de *Bacillus cereus*, aço inoxidável e aço inoxidável com células de *Bacillus cereus* aderidas

Superfície de Adesão	Energia livre global de interação (mJ/m ²)		
	ΔG_{sas}^{LW}	ΔG_{sas}^{AB}	ΔG_{sas}^{TOT}
Aço Inoxidável	-5,1300	-23,6028	-28,7328
<i>B. cereus</i>	-2,0468	21,8664	19,8195
E1 (4 °C/ 1 d)	-3,9462	-29,2732	-33,2194
E2(10 °C/ 1 d)	-4,7024	-31,9868	-36,6892
E3(25 °C/ 1 d)	-5,6075	-77,0592	-82,6668
E4(35 °C/ 1 d)	-4,4238	-15,3336	-19,7574
E5(7 °C/ 5,5 d)	-3,7673	-27,0336	-30,8009
E6(15 °C/ 5,5 d)	-4,3900	-42,7792	-47,1692
E7(20 °C/ 5,5 d)	-3,1313	10,8848	7,7535
E8(30 °C/ 5,5 d)	-3,9668	-36,0436	-40,0104
E9(4 °C/ 10 d)	-4,1335	-42,9876	-47,1211
E10(10 °C/ 10 d)	-4,0224	-7,2648	-11,2872
E11(25 °C/ 10 d)	-4,5199	-19,1152	-23,6351
E12(35 °C/ 10 d)	-4,2813	-13,6348	-17,9161

O valor ΔG_{sas}^{LW} nas interações microbianas são geralmente negativas, o que indica que as forças de Lifshitz van der Waals são predominantemente atrativas enquanto ΔG_{sas}^{AB} pode ser positiva ou negativa, sendo repulsiva ou atrativa, respectivamente (BOS et al., 1999).

A componente apolar da energia livre global de interação é sempre atrativa ($\Delta G_{sas}^{LW} < 0$), enquanto a componente polar pode ser atrativa ou repulsiva ($\Delta G_{sas}^{AB} < 0$ ou $\Delta G_{sas}^{AB} > 0$), sendo, neste caso, atrativas para maioria das superfícies analisadas (Tabela 11). Apenas as superfícies consideradas hidrofílicas apresentaram $\Delta G_{sas}^{AB} > 0$. O que demonstra que a hidrofobicidade é predominantemente determinada pelas forças polares de

atração. A componente ΔG_{sas}^{AB} representa o grau de hidratação da superfície, ou seja quanto maior for o seu valor menor será a hidrofobicidade e conseqüentemente maior a hidrofiliidade da superfície.

Pode-se concluir que o critério qualitativo e o critério quantitativo de avaliação da hidrofobicidade apresentaram uma pequena divergência em relação aos resultados da hidrofobicidade da superfície dos cupons com células de *B. cereus* aderidas incubados a 10 °C/ 10 dias (E10). Já em relação à hidrofobicidade das células de *B. cereus* e da superfície do aço inoxidável sem adesão ambos os critérios permitem concluir que esta bactéria pode ser considerada hidrofílica enquanto o aço inoxidável é considerado hidrofóbico.

Uma possível explicação para que uma superfície de aço inoxidável com células de *B. cereus* aderidas tenha sido considerada hidrofílica, pelo critério quantitativo, é o fato de que ao realizar as medidas dos ângulos de contato as gotas dos líquidos usados foram depositadas aleatoriamente. Estas gotas podem ter sido depositadas em regiões com diferentes concentrações de bactérias aderidas. Assim os ângulos de contato medidos podem estar relacionados a hidrofobicidade do aço inoxidável ou da superfície das células de *B. cereus*, refletindo as características de umas dessas duas superfícies.

4.5. Análises da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre *Bacillus cereus* e aço inoxidável em meio aquoso.

Na Tabela 12 são apresentados os dados da energia livre de adesão entre *B. cereus* e aço inoxidável em meio aquoso. Estes valores foram calculados usando-se as equações apresentadas no item 3.6.

De acordo com a teoria termodinâmica da adesão quando a bactéria e a superfície de adesão ultrapassam a energia imposta pelas forças de repulsão as interações de curto alcance passam a assumir o papel mais importante na adesão. Estas forças de curto alcance consideram as interações polares e apolares. Segundo esta teoria a adesão será termodinamicamente favorável se a interação conduzir a uma diminuição da energia livre total de adesão, ou seja, quando a energia livre total de adesão for negativa ($\Delta G_{adesão} < 0$) (CHAVES, 2004).

Tabela 12 - Valor da energia livre total de adesão ($\Delta G_{ades\tilde{a}o}$) entre *Bacillus cereus* (b) e a superfície de adesão de aço inoxidável 304 (s) em meio aquoso (l) e suas componentes apolar (ΔG_{bls}^{LW}) e polar (ΔG_{bls}^{AB})

Superfície de Adesão	Energia livre total de adesão (mJ/m ²)		
	ΔG_{bls}^{LW}	ΔG_{bls}^{AB}	$\Delta G_{ades\tilde{a}o}$
<i>B. cereus</i>	-3,3353	5,8849	2,5496

Observou-se que a adesão entre o aço inoxidável e *B. cereus* não foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{ades\tilde{a}o} > 0$) (Tabela 12). Teixeira et al (2005) encontraram resultados semelhantes ao estudarem a termodinâmica de adesão entre estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Staphylococcus sciuri* isolados de ordenhadeira mecânica e aço inoxidável 304. As bactérias foram consideradas hidrofílicas e o aço hidrofóbico e a energia livre de adesão ($\Delta G_{ades\tilde{a}o}$) não foi termodinamicamente favorável entre esses dois tipos de superfície.

Segundo van Oss (1997), é bem conhecido que, em meio aquoso, a adesão é favorável entre superfícies hidrofóbicas que podem expulsar a água entre elas. Entretanto, deve ser enfatizado que a adesão entre uma superfície hidrofóbica e uma hidrofílica ou duas superfícies hidrofílicas pode ocorrer.

Para demonstrar a importância das interações hidrofóbicas Husmark e Rönner (1990), expuseram esporos de *B. cereus* a vidro hidrofílico, vidro hidrofóbico e a diferentes concentrações de etanol. Os esporos aderiram preferencialmente ao vidro hidrofóbico, entretanto com o aumento da concentração de etanol, o número de esporos aderidos reduziu em função da redução na polaridade do meio, causando distúrbio nas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e assim limitando as interações hidrofóbicas. Em água deionizada, a adesão dos esporos de *B. cereus* foi 15 vezes maior na superfície hidrofóbica do que na superfície hidrofílica, entretanto, nenhuma diferença na adesão entre as diferentes superfícies foi observada em 95% de etanol.

Apesar de a estirpe estudada ser considerada hidrofílica algumas espécies de *Bacillus* produzem esporos altamente hidrofóbicos sendo capazes de aderirem fortemente ao aço inoxidável que também é considerado

hidrofóbico. Após ocorrer a adesão dos esporos se as condições forem favoráveis, estes podem germinar e iniciar a colonização da superfície (HÜSMARK; RÖNNER, 1992).

4.6. Análise da rugosidade e da microtopografia das superfícies

Na Figura 8 é apresentada a rugosidade média (R_a) do aço inoxidável aderido com diferentes números de células de *B. cereus*, avaliada pela MFA.

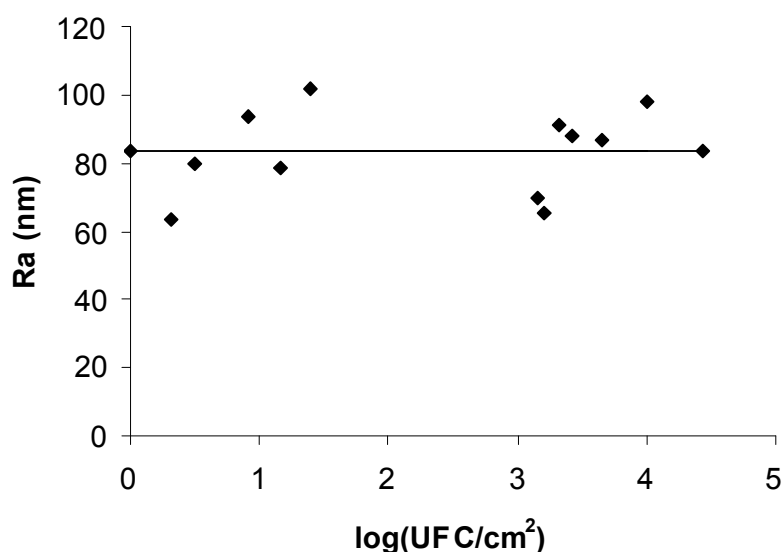


Figura 8 - Rugosidade média (R_a) da superfície do aço inoxidável aderido com diferentes números de células de *Bacillus cereus* avaliada pela MFA.

Na Tabela 13 estão apresentados os valores da rugosidade média (R_a) da superfície de aço inoxidável e das superfícies de aço inoxidável aderido com células de *B. cereus* obtida por microscopia de força atômica (MFA).

Na Figura 9 é apresentada a rugosidade média (R_a) do aço inoxidável aderido com diferentes números de células de *B. cereus* avaliada pelo perfilômetro.

Na Tabela 14 são apresentados os valores da rugosidade média (R_a) da superfície de aço inoxidável e da superfície de aço inoxidável aderido com células de *B. cereus* obtida com auxílio do perfilômetro.

Tabela 13 - Valor da rugosidade média (R_a) da superfície de aço inoxidável e da superfície de aço inoxidável aderido com células de *Bacillus cereus*, em diferentes tempos e temperaturas, obtida por microscopia de força atômica (MFA)

Superfícies	¹ Rugosidade Média* (nm)
Aço inoxidável	83,35 a
E1 (4 °C/ 1 d)	93,58 a
E2(10 °C/ 1 d)	101,71 a
E3(25 °C/ 1 d)	65,05 a
E4(35 °C/ 1 d)	97,87 a
E5(7 °C/ 5,5 d)	79,85 a
E6(15 °C/ 5,5 d)	90,91 a
E7(20 °C/ 5,5 d)	69,65 a
E8(30 °C/ 5,5 d)	86,43 a
E9(4 °C/ 10 d)	63,41 a
E10(10 °C/ 10 d)	78,84 a
E11(25 °C/ 10 d)	88,03 a
E12(35 °C/ 10 d)	83,60 a

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* Média de três repetições.

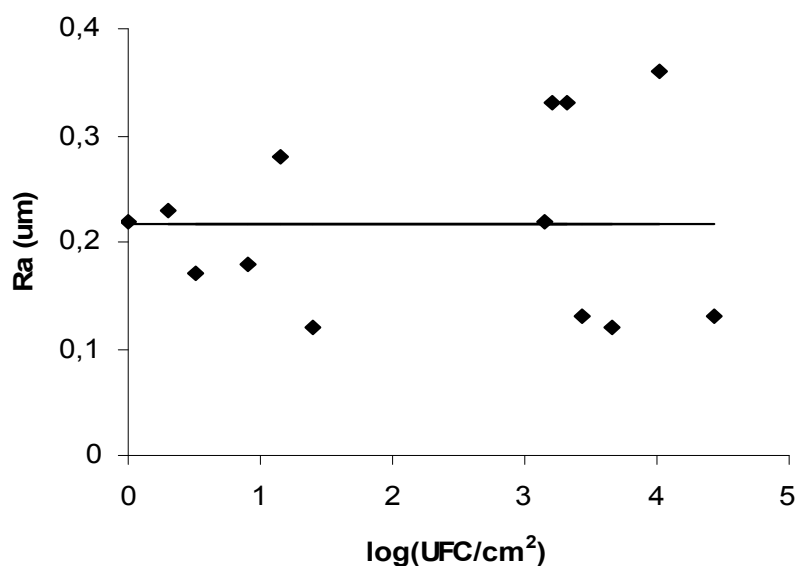


Figura 9 - Rugosidade média (R_a) da superfície do aço inoxidável aderido com diferentes números de células de *Bacillus cereus* avaliada pelo perfilômetro.

Tabela 14 - Valor da rugosidade média (R_a) da superfície de aço inoxidável e da superfície de aço inoxidável aderido com células de *Bacillus cereus*, em diferentes tempos e temperaturas, medida pelo perfilômetro

Superfícies	¹ Rugosidade Média* (μm)
Aço inoxidável	0,22 a
E1 (4 °C/ 1 d)	0,18 a
E2(10 °C/ 1 d)	0,12 a
E3(25 °C/ 1 d)	0,33 a
E4(35 °C/ 1 d)	0,36 a
E5(7 °C/ 5,5 d)	0,17 a
E6(15 °C/ 5,5 d)	0,33 a
E7(20 °C/ 5,5 d)	0,22 a
E8(30 °C/ 5,5 d)	0,12 a
E9(4 °C/ 10 d)	0,23 a
E10(10 °C/ 10 d)	0,28 a
E11(25 °C/ 10 d)	0,13 a
E12(35 °C/ 10 d)	0,13 a

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

* Média de três repetições.

Não houve diferença ($p > 0,05$) na rugosidade das superfícies quando analisadas pela MFA e pela perfilometria. O aumento do número de células aderidas aos cupons não levou a um aumento da rugosidade da superfície.

A diferença da rugosidade entre as superfícies de aço inoxidável aderidas com diferentes números de células de *B. cereus* reflete a rugosidade média do aço inoxidável.

Nas Figuras 10 e 11 estão apresentadas as microtopografias da superfície do aço inoxidável observada pela MFA. Nestas figuras pode-se observar que a superfície apresenta várias fendas e irregularidades.

Segundo Flint et al. (2000), algumas pesquisas mostram que existe uma relação positiva entre a adesão e o aumento da rugosidade da superfície enquanto outras reportam que esta relação não ocorre. Esta aparente divergência está provavelmente relacionada ao grau de rugosidade estudado, às espécies bacterianas testadas, as características físico-químicas da superfície e ao método usado para detectar as bactérias.

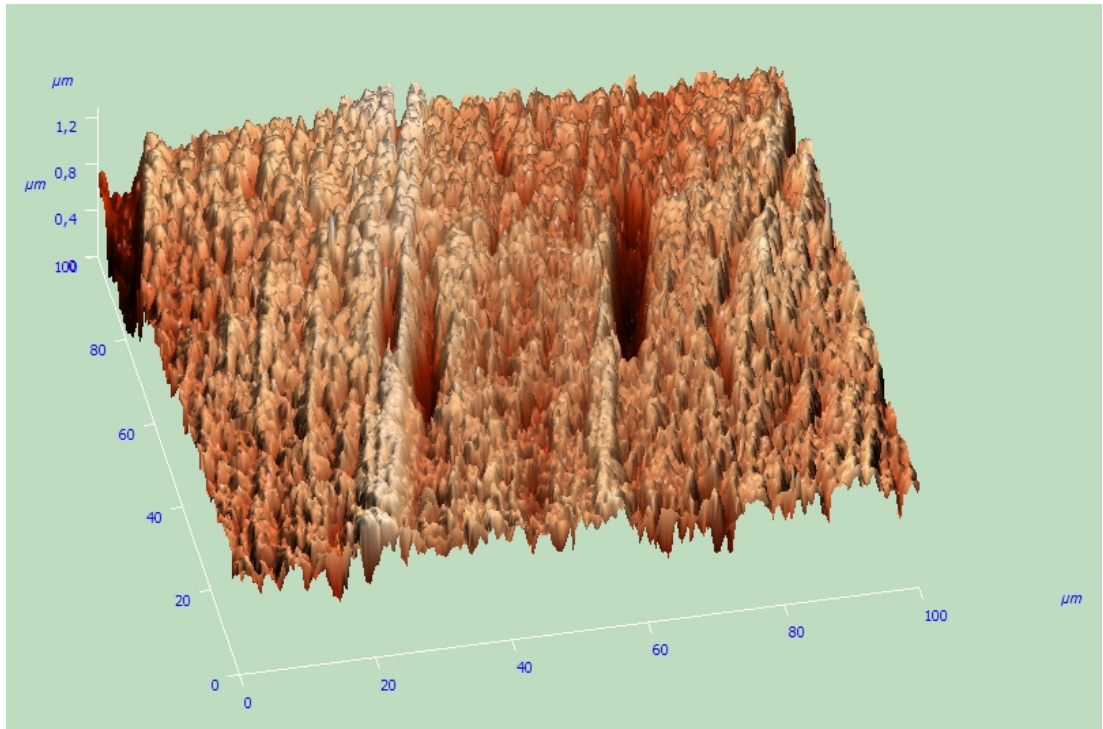


Figura 10 - Microtopografia da superfície de aço inoxidável observada por MFA com área de varredura total de $100 \mu\text{m}^2$.

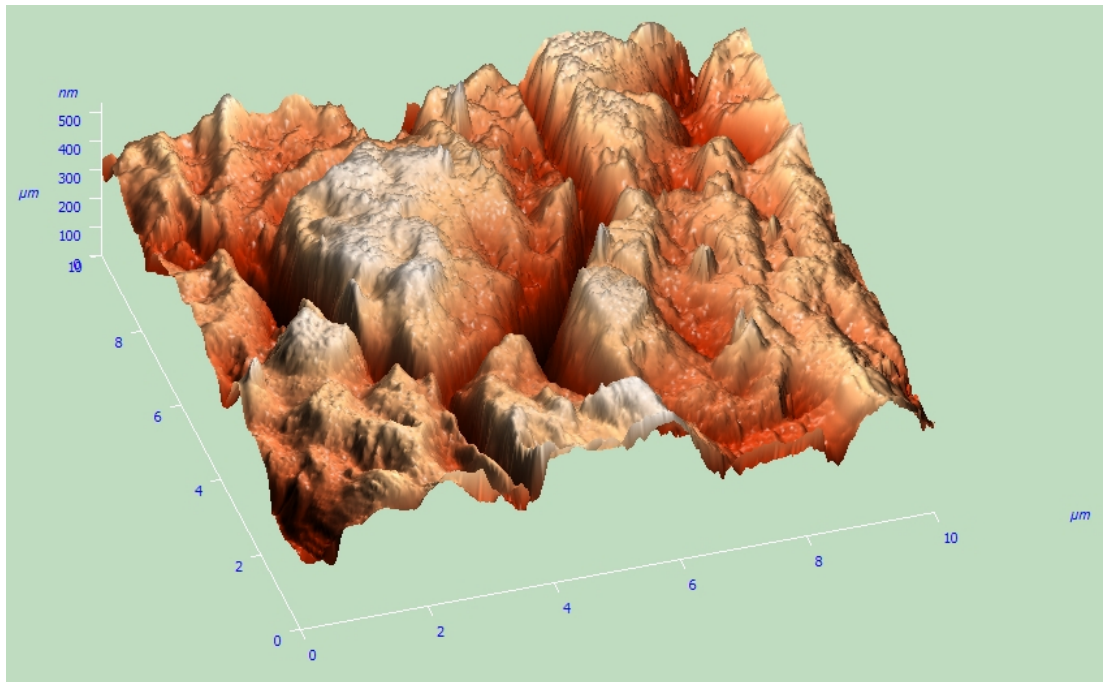


Figura 11 - Microtopografia da superfície de aço inoxidável observada por MFA com área de varredura total de $10 \mu\text{m}^2$.

Flint et al. (2000) concluíram que é difícil encontrar uma relação entre adesão de estreptococos termo-resistentes ao aço inoxidável e a rugosidade da superfície. Entretanto eles observaram que a adesão máxima ocorre em valores de rugosidade média (R_a) próximo ao comprimento médio da bactéria estudada ($0,9\mu\text{m}$). Os autores sugerem que ocorre proteção da bactéria e concluíram que a adesão não pode ser relacionada ao aumento da rugosidade da superfície, mas quando esta rugosidade é próxima ao tamanho da célula bacteriana, ela pode ser protegida nesse espaço.

5. CONCLUSÃO

O efeito da temperatura foi mais importante do que o efeito do tempo na adesão de *B. cereus* ao aço inoxidável 304 #4.

A estirpe de *B. cereus* estudada aderiu aos cupons de aço inoxidável 304 #4 a baixas temperaturas (4 °C, 7 °C e 10 °C).

Na região de alta temperatura (25 °C – 35 °C), o modelo matemático obtido proporcionou um bom ajuste dos dados. Portanto, este modelo pode ser usado para prever a adesão de *B. cereus* em aço inoxidável nesta região de temperatura.

Os resultados indicaram que abusos na temperatura de armazenamento sob refrigeração influenciam decisivamente o número de bactérias aderidas, podendo alterar a qualidade do leite.

Foi observada uma pequena diferença entre o critério qualitativo de avaliação da hidrofobicidade por meio da medição do ângulo de contato com a água e o critério quantitativo de avaliação da hidrofobicidade obtido por meio das tensões interfaciais medidas com auxílio do ângulo de contato de três líquidos de polaridade diferentes.

A adesão não foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} > 0$) entre o aço inoxidável 304 #4 e a estirpe de *B. cereus* estudada. Assim, a interação entre elas não foi favorecida pelo aspecto termodinâmico da adesão.

Não houve diferença ($p > 0,05$) na rugosidade das superfícies de aço inoxidável aderida com diferentes números de células de *B. cereus* analisadas por MFA e perfilometria. O aumento do número de células aderidas aos cupons não levou a um aumento da rugosidade da superfície.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008, cap.1, p. 15 - 60.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The role of exopolymers in the attachment of *Sphingomonas paucimobilis*. **Biofouling**, v. 16, p. 59-67, 2000.

AZEREDO, J. **Adesão de Microrganismos e Composição da Matriz de Bioagregados. Desenvolvimento de Técnicas e Estudo da Influência de Exopolímeros**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal. 1998.

BAGGE-RAVN, D.; GARDSHODN, K.; GRAM, L.; VOGEL, B. F. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 592–598, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. **Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**.

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

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

BOULANGE-PETERMANN, L. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, v. 5, p. 21-36, 1996.

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

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

BUSSCHER, H. J.; SJOLLEMA, J.; VAN DER MEI, H. Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to surfaces. In: DOYLE, R.J.; ROSENBERG, M. (Eds). **Microbial cell surface hydrophobicity**. Washington, D. C.: American Society of Microbiology, 1990.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; VAN DER MEI, H. C.; VAN PELT, A. W.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 980-983, 1984.

CHARACKLIS, W. G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Eds.). *Biolims*. New York: Jonh Wiley and Sons, 1990.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Minho, Braga: Universidade do Minho, Portugal. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2004.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.

DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Londres: Blackwell Scientific Publications. 1993, 333 p.

DERJAGUIN, B. W., LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sots and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Acta Physicochimie**, v. 14, p. 633-662, 1941.

DIN 11 480. Deutsches Institu für Normung e.v. (1992). *Milshwirtschaftliche Maschinen. Tanks und Apparate, Oberflächen (Dairy Machines, Tanks and Apparatus Surfaces), Deutsche Norm DIN 11 480*. Berlin: Deutsches Institut für Normung e.v., Beuth Verlag GmbH.

DOYLE, R. J.; ROSENBERG, M. Microbial Cell Surface Hydrophobicity. **American Society of Microbiology**, Washington, D. C. 1990.

DUFRENE, Y. F. Direct characterization of the physicochemical properties of fungal spores using functionalized AFM probes. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 3286-3291, 2000.

ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; JIA, X.; WILLIAMS, R. **Particle deposition and aggregation-measurements, modeling and simulation**. Oxford. Colloid and surface engineering series, Butterworth-Heinemann Ltda., 1995.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BÉNEZECH, T. Potencial occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 892-900, 2001.

FERREIRA, A. A. P. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, p. 137-142, 2006.

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

FLOSOS, J. D.; EKANAYAKE, G. P.; ABIDE, G. P. AND NELSON, P. E. Optimization of a diced tomato calcification process. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1144 -1148, 1992.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Consultoria, supervisão e revisão técnica: Eduardo César Tondo. Porto Alegre: Artmed, p. 151-154, 2002.

FROMM, H. I.; BOOR, K. J. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 207-214, 2004.

GUILLOU, A. A.; FLOSOS, J. D. Multiresponse optimization minimizes salt in natural cucumber fermentation and storage. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 1381-1389, 1993.

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.A.; SATLEY, J.T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians e Wilkins. p. 754, 1994.

HOOD, S., ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**. v. 6, p. 8-18, 1995.

HÜSMARK, U.; RÖNNER, U. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. **Biofouling**, v. 5, p. 335-344, 1992.

International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians. **3-A sanitary standards for storage tanks for milk and milk products**. 3-A Sanitary Standard 01-07. Ames, Iowa: International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, 1990.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. Trad. por TONDO, E. C.; RECH, R.; GEIMBA, M. P.; FLÔRES, S. H.; FRAZZON, J.; CARVALHO, A. L. O.; FRAZZON, A. P. G.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, F. C.; BIANCHINI, A.; SILVA, A. C. A. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 471-490, 2005.

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

LEMON, K. P.; EARL, A.M.; VLAMAKIS, H.C.; AGUILAR, C.; KOLTER, R. Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. In: Romeo, T. (Ed). **Bacterial Biofilms**. Berlin: Springer. cap. 01, p. 1-16, 2008.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho. Braga, 2005.

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

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

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society Microbiology News**, v. 58, n. 4 p. 202-207, 1992.

NORTEMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A., MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, v. 5, p. 1-16, 1991.

PARIZZI, S. Q. F., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., SILVA, C. A. S., MONTEIRO, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, PR, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. Sociomicrobiology: the connection between quorum sensing and biofilmes. **Trends Microbiology**, v. 13, p. 27-33, 2005.

PEÑA, W. E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** 2005. 355 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PEÑA, W. E. L.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F. Modeling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel surface as a function of temperature, pH and time. **5th International Conference Predictive Modeling in foods**. Athens. Greece. p. 99-102, 2007.

PENG, J. S. W. C. TSAI, AND C. C. CHOU. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p.11-18, 2002.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 181-186, 2000.

PEREZ, E.; SALIERON, F. J.; ALBISU, J AND CASWS, C. Formación de películas biológicas en la industria alimentaria. **Food Science Technology International**, v. 5, p. 25-30, 1999.

QUIRYNEN, M.; VAN DER MEI, H. C.; BOLLEN, C. M. L.; GEERTSEMADOORNBUSCH, G. I.; BUSSCHER, H. J.; VAN STEENBERGHE, D. Clinical relevance of the influence of surface free energy and roughness on the supragingival and subgingival plaque formation in man. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, p. 25-31, 1994.

RAZATOS, A.; ONG, Y. L.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. **Applied Biological Science**, v. 95, p. 11059-11064, 1998.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology: Review paper. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 241-246, 1994.

ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal Food Microbiology**, v. 62, p. 231-245, 2000.

SALUSTIANO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite.** 2007. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SAS/STAT Users Guide. Version 9.1. Cary, NC: SWS Institute Inc., 2006.

SCHWACH, T. S.; ZOTTOLA, E. A. Use of scanning electron microscopy to demonstrate microbial attachment to beef and beef contact surfaces. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1401-1405, 1982.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metal using a cell probe atomic force microscope. **Journal of colloid and interface science**, v. 310, p. 661-669, 2007.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 329-335, 2003.

TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M., J. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, p. 247-251, 2005.

UBBINK, J.; ZAMMARETTI, P. S. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 263-270, 2007.

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

VAN DER MEI, BOS, R.; BUSSCHER, H. J. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces**, v. 11, p. 213-221, 1998.

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

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfactants. **Current Opinion Colloids International Science**, v. 2, p. 503-512, 1997.

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

VAN OSS, C. J.; CHAUNDHURY, M. K.; GOOD, R. J. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. **Chemical Reviews**, v. 88, p. 927-941, 1988.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1893-1897, 1987.

VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. T. G. **Theory of The Stability of Lyophobic Colloids**. Elsevier, Amsterdam, 255 p. 1948.

WICKEN, J. S. Thermodynamics and the conceptual structure of evolutionary theory. **Journal of theoretical biology**, v. 117, p. 363-383, 1985.

WONG, H. C.; CHANG, M. H.; FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 699-702, 1998.

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

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