



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE-UFCG
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR-CCTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTUS SENSUS* EM SISTEMAS
AGROINDUSTRIAIS-PPGSA

SYLMARA PATRCIO DE SANTANA ROSA

ADESÃO MICROBIANA EM SUPERFÍCIES UTILIZADAS DURANTE A
CADEIA PRODUTIVA DE LEITE

POMBAL-PB

2018

R788a Rosa, Sylmara Patricio de Santana.
Adesão microbiana em superfícies utilizadas durante a cadeia produtiva de leite / Sylmara Patricio de Santana Rosa. – Pombal, 2018.
35 f.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.
"Orientação: Prof. Dr. João Paulo Natalino de Sá".
Referências.

1. Processamento do Leite - Armazenamento. 2. Qualidade do Leite – Higienização. 3. Biofilmes. I. Sá, João Paulo Natalino de. II. Título.

CDU 637.131(043)

SYLMARA PATRICIO DE SANTANA ROSA



CAMPUS DE POMBAL

“ADESÃO MICROBIANA EM SUPERFÍCIES UTILIZADAS DURANTE A CADEIA PRODUTIVA DE LEITE”

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M. Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 31 / 07 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

João Paulo Natalino de Sá
Orientador

Aline Carla de Medeiros
Orientadora

Patrício Borges Maracajá
Examinador Interno

Milena Nunes Alves de Sousa
Examinador Externo

POMBAL-PB
JULHO - 2018

Dedico esta conquista, a meus pais que sempre me apoiam nas escolhas, me incentivam a dar continuidade aos objetivos. Em especial o meu irmão César Patrício, que sempre me ajudou e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar sabedoria e paciência para dar continuidade a esse passo importante na minha vida acadêmica.

A minha família, sempre presente no meu desenvolver de vida acadêmica. Minha mãe M^a do Socorro, com seu carinho de sempre, me acalentando nos momentos de mais dificuldades. Meu pai Cicero, sempre demonstrando a felicidade e o orgulho de ter uma filha cursando o Mestrado e agora mestre. E o meu irmão César, que sempre saiu do seu conforto para acreditar nos meus sonhos, dando total apoio em todos os passos que dei até aqui.

Ao meu querido professor e anjo Patrício Borges Maracajá, que me acolheu e me abraçou, demonstrando total confiança. Obrigada por não desistir de mim.

A minha orientadora Aline Carla de Medeiros, obrigada pela paciência e por ter me ajudado muito até o final.

A minha amiga Beatriz Sousa, que foi como uma ponte que Deus usou para que tudo isso acontecesse. Obrigada por tudo amiga!

Em fim, obrigada a todos que fizeram parte desse sonho. Que Deus abençoe todos vocês e que sejam todos retribuídos.

Muito Obrigada!

RESUMO

O leite é um alimento rico em nutrientes, esses nutrientes podem favorecer a adesão de microrganismos patogênicos ou deterioradores em diferentes superfícies que entram em contato com o leite. Comprometendo sua qualidade. O processo de adesão bacteriana depende de diversos fatores. Entre eles, a hidrofobicidade, a energia da superfície e as interações eletrostáticas. O estudo objetivou fazer um levantamento sobre a adesão de bactérias em superfícies que são utilizadas na produção de leite. Para obtenção dos resultados, foi realizado um estudo qualitativo por meio de uma pesquisa bibliográfica. Onde foi possível notar, que há uma possível relação direta entre a formação de biofilmes e produção de fatores de virulência relacionados á adesão. Em suma, foi possível concluir, que uma etapa primordial para prevenir ou diminuir o processo de adesão e formação de biofilme em diferentes superfícies que entram em contato direto com o leite, é a higienização de forma eficiente.

Palavras-chave: Qualidade do leite; biofilmes; armazenamento do leite; higienização.

ABSTRACT

Milk is a food rich in nutrients, these nutrients may favor the adhesion of pathogenic microorganisms or deteriorates on different surfaces that come into contact with milk. Committing your quality. The process of bacterial adhesion depends on several factors. Among them, hydrophobicity, surface energy and electrostatic interactions. The objective of this study was to investigate the adhesion of bacteria to surfaces that are used in milk production. To obtain the results, a qualitative study was carried out by means of a bibliographical research. Where it was possible to note that there is a possible direct relationship between the formation of biofilms and the production of adhesion-related virulence factors. In summary, it was possible to conclude that a primordial step to prevent or reduce the process of adhesion and formation of biofilm in different surfaces that come in direct contact with milk, is the hygienization in an efficient way.

Key words: Milk quality; biofilms; storage of milk; sanitation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Geral	2
2.2. Específicos	2
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
3.1. Etapas do processo de adesão microbiano	3
3.2. Aspectos físico-químicos da adesão microbiana.....	4
3.3. Formação de biofilme bacteriano.....	5
3.4. Adesão microbiana e formação da cadeia produtiva do leite.....	6
3.5. Adesão bacteriana em superfícies.....	10
4. METODOLOGIA.....	17
4.1 Tipo de pesquisa.....	17
4.2 Dados obtidos.....	17
4.3 Tratamento e análise dos dados.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 Contaminação de superfícies.....	20
6. CONCLUSÕES.....	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento rico em nutrientes, pois contém em sua composição vitaminas, carboidratos, gorduras, minerais e proteínas. O que favorece também, a adesão de microrganismos patogênicos ou deterioradores em diferentes superfícies que entram em contato com o leite. Comprometendo a qualidade do mesmo, que é um dos temas mais discutidos atualmente. A adesão de bactérias às superfícies que são utilizadas durante a produção do leite acontece por diversas formas. Constituído um agregado de células que podem causar danos à qualidade do leite e conseqüentemente a saúde do consumidor (ARAUJO et al, 2010).

O processo de adesão bacteriana que envolve as superfícies onde o leite será produzido, depende de diversos fatores. Entre eles, a hidrofobicidade, energia de superfície e interações eletrostáticas. As bactérias são movidas por efeito de forças químicas. Existem diversas formas para descrever esse processo. Após a adesão, as bactérias se organizam em comunidades, compondo um biofilme que é composto por células embebidas numa matriz de exopolissacarídeos (IST, 2008).

A formação desses biofilmes, pode causar graves conseqüências no processo de produção, entre eles, danificação de equipamentos, corrosão de metais de tubulações e tanques, deterioração de alimentos, substituição de peças e equipamentos, problemas de saúde pública, perda econômica, entre outros. Por isso, é grande importância de se estudar em busca de procedimentos que visam a prevenção ou diminuição do processo de adesão e formação do biofilme para diferentes superfícies de contato direto com o leite, reduzindo assim, todas as conseqüências danosas possíveis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O objetivo desta pesquisa constituiu em fazer um estudo e levantamento sobre a adesão de bactérias em superfícies que são utilizadas na produção de leite. Visando a busca por processos que possam reduzir esse problema comum durante a produção e manejo do leite.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o processo, aspectos e mecanismos aos quais os microrganismos conseguem aderir as superfícies;
- Avaliar a formação dos biofilmes nas superfícies;
- Determinar comportamento que possa prevenir esse problema na contaminação e controle da qualidade do leite.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Etapas do processo de adesão microbiano

O processo de adesão de bactérias às superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e depende de diferentes fatores, tais como: propriedades superficiais (tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, entre outras), das interfaces dos suportes de adesão (aço, polímeros, mármore, etc.) e das membranas dos microrganismos. Além disso, as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, tais como temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes, determinam, em muitos sistemas, o processo de adsorção (ARAUJO et al., 2010; UBBINK, SCHÄR-ZAMMARETTI, 2007).

O processo de adesão pode ser dividido em duas etapas: reversível e irreversível. A adesão de um organismo à superfície envolve a aproximação deste na superfície de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade (pili superficiais, flagelos dentre outros). Quando o microrganismo atinge uma distância crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre as forças atrativas e repulsivas como as interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals, impedimento estereoquímico, entre outras, geradas entre as duas superfícies (SÁ, 2013; CHMIELEWSKI, FRANK, 2003).

A força de repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada por meio de interações moleculares específicas, como por exemplo, pela mediação de adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular. Durante a adesão reversível, as bactérias ainda exibem movimentos brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de uma força mínima (ARAUJO, et al, 2010; CHMIELEWSKI, FRANK, 2003; DAVEY, O'TOOLE, 2000).

Após a adesão reversível, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos que complexam os

materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. Durante este estágio de adesão, os microrganismos individualizados ou planctônicos podem aglomerar uns aos outros, formando agregados na superfície a que aderem. Após a adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme (SÁ, 2013; FRIEDMAN, KOLTER, 2004).

3.2 Aspectos físico-químicos da adesão microbiana

A processo de adesão bacteriana pode ser descrito também em termos de parâmetros físico-químicos, tais como hidrofobicidade, energia de superfície e interações eletrostáticas das partículas celulares com a superfície (ARAUJO, et al. 2010; BAYER, et al., 1990; ABSOLOM, et al., 1983). Segundo Gottenbos et al. (2002), bactérias movem-se ou são movidas para a superfície de um material devido aos efeitos de forças físico-químicas, como movimentos brownianos, forças de atração de van der Waals, forças gravitacionais, efeitos de cargas eletrostáticas e interações hidrofóbicas.

As interações físico-químicas são classificadas como interações de longo e curto alcance. As interações de longo alcance (distância > 50 nm) entre células e superfícies são descritas por forças, que são em função da distância e energia livre. Interações de curto alcance tornam-se efetivas, quando a célula e a superfície entram em contato estreito (distância < 5 nm) e estas, podem ser divididas em ligações químicas, como pontes de hidrogênio, interações iônicas e dipolo, e interações hidrofóbicas (GOTTENBOS, et al. 2002; MAYER, et al. 1999).

Algumas teorias têm sido utilizadas para descrever o processo de adesão bacteriana em superfícies. A teoria DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek) desenvolvida inicialmente por Derjaguin e Landau, em 1941, sumariza as contribuições das forças de van der- Waals e eletrostáticas para a energia de interação interfacial entre duas superfícies, e explica a adesão de micro-organismos com base na interação entre partículas coloidais, desprezando todos os aspectos microbiológicos da adesão. Além disso, as forças de interação contabilizadas por esta teoria são apenas as forças de

longo alcance como forças de van der Waals e forças resultantes da dupla camada elétrica (Sá, 2013; ARAUJO, et al. 2010, OLIVEIRA, 2006).

Quando é utilizada a teoria DLVO os microrganismos são considerados partículas quimicamente inertes, ou seja, seriam como colóides liofóbicos. Isso ocorre uma vez que a maioria das bactérias não excede 2,0 μm de comprimento e a sua densidade é superior à da água, podendo ser considerada, nesse caso, como partículas coloidais vivas. Porém esta teoria não relata os aspectos microbiológicos da adesão, afirmando que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz - van der Waals e as forças de dupla camada elétrica, que geralmente são repulsivas, (NOVELLO, 2012; ARAUJO, et. 2010; MARSHALL, 1992).

A teoria DLVO considera apenas a atração das forças de longo alcance. No entanto, quando uma partícula, como por exemplo, uma bactéria, está muito próximo de uma superfície (2 nm - 5 nm), forças de curto alcance passam a regular o processo. Tais forças, denominadas não-DLVO, são representadas pelas forças de repulsão de Born, forças de hidratação, interações hidrofóbicas e pontes poliméricas (SÁ, 2013; ARAUJO, et., 2010; ELIMELECH, 1995).

Van Oss e uma equipe de pesquisadores, em 1995, integraram os aspectos termodinâmicos da adesão à teoria DLVO. Essa teoria ficou conhecida como XDLVO, ou DLVO Estendida, e considerou as forças de curto alcance, principalmente as interações hidrofóbicas. Segundo esta teoria, a variação da energia livre das interações totais 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_{EL}) e interações resultantes dos movimentos Brownianos (ΔG_{BR}) (NOVELLO, 2012; VAN OSS, 1997).

3.3 Formação de biofilmes bacterianos

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células no estado planctônica, mas com as bactérias organizadas em comunidades com diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme. Esses biofilmes são constituídos por células aderentes a uma superfície inerte ou biológica, embebidas numa

matriz de exopolissacarídeo. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (IST, 2008).

Os biofilmes mais comuns na natureza são heterogêneos, ou seja, compostos por duas ou mais espécies, podendo os produtos do metabolismo de uma espécie auxiliar à multiplicação das demais e a adesão de uma dada espécie fornecer substâncias que promovem a ligação de outras. Inversamente, a competição pelos nutrientes e a acumulação de metabólitos tóxicos produzidos pelas espécies colonizadoras poderão limitar a diversidade de espécies num biofilme (IST, 2008)

Como os biofilmes são constituídos de agregados de células e a formação de sua estrutura tridimensional é um processo dinâmico que envolve vários eventos moleculares, estes se tornam um ambiente propício para a comunicação célula-célula, denominado *quorum sensing*. Neste sistema ocorre a produção de compostos sinalizadores pelas bactérias, pequenas moléculas denominadas de auto indutores, que irão modular e influenciar a formação do biofilme bacteriano, além de modular outras funções celulares como a esporulação, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação de acordo com a densidade populacional. As bactérias gram-negativas usam o sistema *quorum sensing* por moléculas de N-acil Homoserina Lactonas (AHLs), enquanto que as gram-positivas utilizam moléculas com oligopeptídios (VIANA, 2006; FUQUA, GREENBERG, 2002).

3.4 Adesão microbiana e formação na cadeia produtiva do leite

Dentro os diferentes segmentos industriais, as indústrias de alimentos destacam-se como propulsora do processo de adesão e formação de biofilme indesejáveis, principalmente devido à complexidade dos constituintes presentes nas matrizes alimentares. Entre as diferentes matrizes alimentares, destaca-se o leite, que devido a sua característica de composição complexa (minerais, açúcares, proteínas, carboidratos, gorduras), pode ser considerado como um sistema favorável para a adesão de microrganismos patogênicos e ou deterioradores, em diferentes superfícies que entram em contato com o leite

em diferentes etapas que permeia desde sua obtenção até o seu processamento na indústria.

Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes pode possibilitar a elevação da população microbiana e, muitas vezes, torna mais favorável a contaminação com patógenos e ou deteriorantes, devido ao eventual desprendimento de células aderidas neste biofilme, contribuindo para o risco à saúde do consumidor, além de potencializar a velocidade de deterioração do leite e derivados, levando a prejuízos financeiros em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos (KASNOWSKI, et al., 2010; FLACH et al., 2005).

Na obtenção do leite, desde a ordenha até o processamento, diferentes superfícies inertes e ou biológicas podem favorecer que o mecanismo de adesão e possível formação de biofilme possa ser favorecido.

Desde o momento em que o leite é ejetado do úbere da vaca, ele fica exposto a diferentes contaminações posteriores. Uma das fontes mais importantes de contaminação é constituída pelo exterior dos tetos: se estiverem sujos de terra, de esterco, de material das camas, dentre outras sujidades (que podem ter carga microbiana de $10^8 - 10^9$ UFC/g), pode causar grande contaminação do leite, podendo produzir contagens superiores a 10^5 UFC/mL, mas quando higienizadas corretamente antes da ordenha, a quantidade de microrganismos no leite reduz consideravelmente (CAVALCANTI et al., 2010; PEREDA et al. 2005).

Dentre os diferentes microrganismos favorável ao mecanismo de adesão em uma superfície biológica, como a teta da vaca, destaca-se *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria é reportada como um dos agentes de maior preocupação, em função da sua capacidade de aderência na glândula mamária, além de possuir diferentes mecanismo de virulência (proteína A adesinas, hialuronatolise, hialuronidase, dentre outras) o que dificulta a ação de antibióticos em animais mastíticos, representando, assim, uma das fontes de contaminação microbiológica no leite (HERMANS, et al. 2010; ZSCHÖCK et al., 2005).

Diversos fatores de virulência, como exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares de *S. aureus*, têm sido relatados em amostras isoladas de mastite bovina. Além disso, tem-se determinado que a formação de

biofilme por esta espécie de bactéria torna-se também um importante fator de virulência que contribui para a sua patogênese (SALIMENA, 2016; TÜRKYILMAZ, ESKIIZMIRLILER, 2006).

Um grupo de proteínas de superfície vem sendo considerado como um importante elemento no processo de formação de biofilme de diversas espécies bacterianas. O primeiro membro desse grupo de proteínas foi identificado em isolado de *S. aureus* de amostras de mastite bovina, como sendo uma proteína essencial para a formação de biofilme cujo gene foi denominado proteína associada à formação de biofilme (*bap*) (BRAVO, 2016; CUCARELLA et al., 2001).

Estudos de ligação primária, agregação intercelular e formação de biofilme demonstraram que o *bap* promove tanto interação com superfícies abióticas como a adesão intercelular. Uma vez que a interrupção do gene *bap* provoca a diminuição no acúmulo do principal exopolissacarídeo da matriz do biofilme de *S. aureus*, a primeira interpretação desse resultado foi que a deficiência de biofilme em linhagens mutantes de *bap* era causada principalmente pela diminuição do acúmulo desses exopolissacarídeo denominado polissacarídeo adesina intercelular (PIA/PNAG) (BRAVO, 2016; LASA, PENADÉS, 2006).

Importante ressaltar que além dos fatores supracitadas para os possíveis mecanismo no qual determinada célula bactéria adere à superfície da glândula mamaria bovina, pode-se inferir, que a higienização inadequada antes e após o processo de ordenha nas tetas, favorecem a presença de resíduos orgânicos e minerais neste tecido. Desta forma, microrganismos, tal como *S. aureus*, presentes naturalmente nos pelos do animal e do homem, às mãos de manipuladores e as condições do ambiente, pode através de movimentos brownianos e interações eletrostáticas, favorecer a adesão bacteriana nos tetos deste animal. Além destes fatores, a adesão pode ser favorecida pelas interações hidrofóbicas entre o tecido glandular (hidrofóbico) e a superfície bacteriana, e pela provável irregularidade da superfície da teta, que desfavorece um processo de higienização eficiente.

Com relação à adesão inicial, quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana, maior tenderá a ser sua capacidade de interagir diretamente à superfície tecidual (SALIMENA, 2016; BOARI et al., 2009).

Hayes e Boor (2001) ressaltaram que as principais fontes de contaminação durante as diferentes etapas de obtenção e processamento de leite, estão relacionadas com o equipamento de ordenha, tais como a teteira, tubulação pela qual o leite é transportado, o tanque de refrigeração e o tanque do caminhão transportador.

As teteiras, também conhecidas como insufladores ou espremedores, possui superfície predominante constituída de borracha ou silicone. A teteira é a única parte do equipamento de ordenhadeira mecânica que entra em contato direto com o animal, e quando não higienizada de forma eficiente pode favorecer ao mecanismo de adesão e possível formação de biofilmes indesejáveis.

Neste contexto, Santos et al. (2013) avaliaram o efeito do tratamento de higienização de forma simulada na adesão de *Streptococcus agalactiae* em superfícies de máquinas de ordenha. Neste estudo foi utilizado *S. agalactiae* isolados de vaca mastítica e cupons de borracha e silicone. Os cupões de borracha e silicone foram higienizados com 1,5% de hidróxido de sódio a 80 °C em diferentes tempos (0, 10, 30 e 60 h), sendo em seguida enxaguados com água durante 5 min. Posteriormente, os cupons foram imersos em solução contendo 0,5% de ácido nítrico a 70 °C por 0, 4, 12 e 24 h, sendo novamente enxaguados com água. Para finalização do processo de higienização, os cupons foram sanitizados com ácido dicloroisocianúrico por 0, 10, 30 e 60 h a 25 °C. Os cupons higienização foram avaliados por 0, 30, 90 e 180 h após o procedimento de higienização. Posteriormente, os cupons com e sem higienização foram imersos em caldo nutriente com *S. agalactiae* (10^4 UFC.mL⁻¹), e posteriormente incubados a 37 °C por 24 h, para quantificação. Dentre as análises complementares foi determinado a hidrofobicidade e a da variação da energia livre de hidrofobicidade (ΔG^{TOT}) (SILVA, et al., 2013).

De acordo com os resultados reportados por Silva, et al. (2013), não houve diferença entre a adesão de *S. agalactiae* em superfícies de borracha ou silicone, porém, processo de adesão foi diminuído com o tempo do procedimento de limpeza, onde a contagem de células aderidas no cupom controle foi de 4.5 Log₁₀ UFC cm², enquanto após 180 dias de procedimentos de limpeza, a contagem foi de 2,5 Log₁₀ UFC cm² para ambos os cupons. Pelo método do ângulo de contato com a água, isolados de *S. agalactiae* foram

considerados hidrofílicos ($\Theta_w < 65^\circ$). Em contrapartida, os cupons de silicone e borracha foram considerados hidrofóbicos ($\Theta_w > 65^\circ$) para todos os tempos analisados. As superfícies de silicone e borracha foram consideradas hidrofóbicas de acordo com os critérios quantitativos ($\Delta G^{\text{TOT}} < 0$), porém, foi observado diferença significativa da hidrofobicidade para a superfície de silicone no tempo correspondente a 180 dias, onde a mesma apresentou menor hidrofóbica, que pode ter sido favorecido pelas soluções utilizadas no processo de limpeza e higienização, que favoreceram em mudanças nas propriedades de superfície, como por exemplo, pela adsorção de grupos iônicos. A superfície microbiana de *S. agalactiae* foi considerada hidrofílica ($\Delta G^{\text{TOT}} > 0$), indicando que a molécula presente na interface da superfície bacteriana interagiu preferencialmente com moléculas de água (SILVA, et al 2013).

Foi evidenciado também neste trabalho, que não houve diferença significativa entre a adesão de *S. agalactiae* com os tipos de superfícies da teteira (borracha ou silicone). No entanto, verificou-se que o processo de adesão foi relativamente mais rápido quando o processo de higienização foi menos eficiente, além de evidenciarem por fotomicrografias, que os agentes de limpeza utilizados demonstraram um rápido desgaste de ambas as superfícies. (SILVA, et al 2013).

De acordo com o estudo supracitado, a higienização desempenha importante ferramenta no processo de adesão e possível formação de biofilme. De forma geral, superfícies higienizadas de forma ineficientes, favorecem a presença de resíduos de matéria orgânica e ou mineral, em possíveis regiões de irregularidades da superfície, que tendem a favorecer o processo de adesão. Além da hidrofobicidade entre as superfícies inertes e biológicas. De forma geral, quanto mais hidrofóbica uma superfície mais favorável o processo de adesão, pois menos energia será necessária para repelir o filme de água entre as superfícies.

3.5 Adesão bacteriana em superfícies

O processo de adesão é mais favorável quando as superfícies são hidrofóbicas devido a menor energia necessária para a remoção da água entre as duas superfícies. No entanto, mesmo se o microrganismo for hidrofílico e a

superfície for hidrofóbica, o processo de adesão pode ainda ocorrer pois existem diferentes fatores que podem favorecer esta adesão, tais como, a presença de estruturas celulares como os apêndices celulares, e a microtopografia de superfície (CHEN et al., 2005).

Além destes fatores, é possível inferir, que o procedimento de limpeza nos cupons tende a reduzir a possibilidade de adesão microbiana. No entanto, o desgaste das superfícies causado pelos procedimentos de limpeza também deve ser considerado, uma vez que a remoção de células aderidas pode ser difícil, sendo importante o controle da concentração das soluções utilizadas e a troca periódica das teteiras de silicone ou borracha, para prevenir de forma mais eficiente o processo de adesão.

Os processos de limpeza e sanitização de superfícies são mais difíceis na presença de microrganismos aderidos. Isto tem tornado um problema com o aumento do uso de procedimentos automáticos de limpeza e equipamentos complexos, que podem apresentar locais que facilitam o desenvolvimento de processos de adesão (NOVELLO, 2012; POMPERMAYER, GAYLARDE, 2000).

Uma estratégia de evitar a adesão e formação de biofilme microbiano é executar o procedimento de sanitização após a limpeza e antes do início do processamento, se há um intervalo grande entre os turnos de trabalho. Isso porque a fase inicial da aderência dos microrganismos e a formação do biofilme à superfície ocorrem rapidamente, o que leva somente alguns minutos ou horas. Além disso, é importante também conhecer o tipo e a natureza dos resíduos contaminantes, como, carboidratos, lipídeos, proteínas e sais minerais, e os microrganismos a serem removidos (NOVELLO, 2012; MOSTELLER, BISHOP, 1993).

Teixeira, et al. (2005), avaliaram a hidrofobicidade de espécies bacterianas de *Lactobacillus lactis* subsp *lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus sciuri*, isoladas de uma ordenhadeira mecânica, e também a hidrofobicidade de superfícies inertes encontradas em materiais utilizados durante o processo de ordenha, tais como: borracha, aço inoxidável 316 e 304 (a diferença entre o aço inoxidável 316 e o 304 se deve à presença do molibdênio na composição química do 316), vidro e polimetilmetacrilato.

A determinação da hidrofobicidade da superfície foi obtida pela medida do ângulo de contato. Em relação à hidrofobicidade das bactérias, todas as estirpes foram consideradas hidrofóbicas. A grande parte das superfícies avaliadas foram consideradas hidrofóbicas ($\Theta_w > 65^\circ$), sendo a borracha e o aço inoxidável 316 e 304 as superfícies mais hidrofóbicas (Θ_w : $96,4^\circ$; $81,6^\circ$ e $83,2^\circ$ respectivamente). Em contrapartida, a superfície de polimetilmetacrilato (Θ_w : $67,6^\circ$) e a superfície de vidro foram consideradas hidrofílicas (Θ_w : $49,7^\circ$). Para todas as situações estudadas, a adesão foi termodinamicamente favorável ao aço inoxidável 316, 304 e a borracha e menos favorável nas superfícies de polimetilmetacrilato e vidro (TEIXEIRA et al, 2005).

Neste contexto, fica evidenciado que o processo de adesão entre superfícies mais hidrofóbicas, tendem a ser mais favoráveis. A adesão de um microrganismo a uma superfície sólida em solução aquosa só se estabelece se o filme de água que reveste as duas superfícies for removido. Portanto, a interface bactéria/líquido e a interface superfície de adesão/líquido terá que ser substituída pela interface bactéria/superfície de adesão. Entretanto, deve ser enfatizado que a adesão entre uma superfície hidrofóbica e uma hidrofílica ou duas superfícies hidrofílicas também pode ocorrer, porém, é menos favorável energeticamente, pois se duas superfícies são hidrofóbicas, o filme de água é facilmente removido, pois moléculas de superfície tendem a ter menos interação pelas moléculas de água (BERNARDES, 2008; CHAVES, 2004).

A hidrofobicidade da superfície de uma bactéria é influenciada por diferentes fatores. Em bactérias gram negativas, a hidrofobicidade aumenta à medida que a água no meio diminui, pois estas possuem maior quantidade de lipídeos em sua membrana externa. Por outro lado, bactérias gram-positivas são menos influenciadas pela alteração do volume de água no meio em decorrência da maior quantidade de peptidoglicano em suas membranas e menor quantidade de lipídeos. Espécies bacterianas com diferentes constituintes da parede celular apresentam diferentes interações com as superfícies e, conseqüentemente, diferentes velocidades de adesão (CHEN, ZHU, 2005; STREVETT, CHEN, 2003).

Os materiais utilizados nas indústrias de alimentos apresentam diferentes topografias de superfície, podendo exibir fissuras ou 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, o que favorece o processo de adesão (ARAUJO, et al., 2010; BERNADES, et al., 2010; CARELI, 2005).

Diferentes parâmetros ou medidas tem sido utilizado para caracterizar a superfície de determinados materiais inertes, tais como aço inoxidável, silicone, granito, dentre outros. Estes parâmetros são baseados com base nas características bidimensionais, tais como a Rugosidade média (Ra) e Rz (a diferença de altura entre a média de cinco picos mais altos e a média de cinco vales mais baixos, ao longo de um dado perfil). Entre estes (Ra e Rz) a mais utilizada é o valor de Ra da superfície, sendo recomendado um valor máximo de 800 nm para superfícies utilizados em laticínios e alimentos em geral que entram em contato com a matriz alimentícia (MENON, 2016; DÜRR, 2007).

Neste contexto, Careli (2005) avaliou a microtopografia de nove tipos de materiais utilizados em laticínios e na indústria de alimentos em geral. As superfícies inertes utilizadas foram: poliuretano liso em dupla face, silicone, granito, mármore, poli (cloreto de vinila) com revestimentos finos ou grossos e aço inoxidável AISI 304, acabamento nº 4, sendo avaliadas por microscopia eletrônica de varredura.

Neste trabalho também foi analisado a adesão de *Pseudomonas fluorescens* nestas superfícies. Diversas imperfeições que podem diminuir a eficiência da higienização foram observadas de acordo com o material analisado: i) protuberâncias e fissuras que apresentavam diâmetros de 5100 nm e 800 nm; ii) elevações com 27100 nm, microfuros de 6500 nm; iii) ondulações com tamanhos entre 5600 nm e 12600 nm e de depressões com diâmetros de 79000 nm e 27400 nm (CARELI 2005).

Todas estas imperfeições encontradas no trabalho supracitado, podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização e facilitar a penetração de resíduos de alimentos que servirão de substrato para a adesão bacteriana, multiplicação e, conseqüentemente, a possível formação de biofilmes. Algumas imperfeições apresentam tamanhos suficientes para alojar e proteger as células microbianas, visto que, as dimensões de *Pseudomonas* são de aproximadamente 0,5 μ m a 1,0 μ m de largura e 1,5 μ m a 5,0 μ m de comprimento

Segundo Flint et al. (2000), uma superfície rugosa pode ser preferencialmente colonizada por proporcionar aos microrganismos locais de proteção do estresse do ambiente, da turbulência do líquido que envolve a superfície e da atividade de antimicrobianos.

É reportado na literatura que a adesão máxima ocorre em valores de rugosidade média (Ra) próximo ao comprimento médio da bactéria estudada, inferindo que valores de rugosidade próximos ao tamanho da célula bacteriana, pode proteger este microrganismo nestas imperfeições, tornado o processo de higienização menos eficiente, que tende a favorecer o processo de adesão (BERNARDES, 2008; FLINT et al., 2000).

Na literatura, as opiniões variam em relação ao efeito das características da superfície na adesão bacteriana. Alguns pesquisadores relatam que há uma correlação positiva entre adesão e aumento da rugosidade, enquanto outros pesquisadores não reportam nenhuma correlação entre a habilidade da bactéria aderir e irregularidades ou rugosidade das superfícies. Este aparente conflito está relacionado com o nível de rugosidade estudada, com as espécies bacterianas estudadas, os parâmetros físico-químicos da superfície e o método usado para detectar a bactéria na superfície (FLINT et al., 2000).

Bernardes et al., (2010), avaliaram a interação entre a superfície de aço inoxidável 304 polimento nº 4 e a superfície de *Bacillus cereus* isolado de laticínios, a partir da medição do ângulo de contato entre estas superfícies na presença ou ausência de *B. cereus*, além da microtopografia e a rugosidade das superfícies. A estirpe de *B. cereus* foi considerado hidrofílica, enquanto que o aço inoxidável foi considerado hidrofóbica. A adesão não foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{adesão} > 0$) entre o aço inoxidável e a estirpe de *B. cereus*, sendo a interação entre eles desfavorável pelo aspecto termodinâmico de adesão. Não houve diferença na rugosidade da superfície de aço inoxidável aderida por *B. cereus*, quando analisados por microscópio de força atômica e perfilometria (BERNARDES et al., 2010).

Apesar do processo de adesão avaliado no trabalho de Bernardes et al., (2010), ter sido termodinamicamente desfavorável, a adesão entre a superfície de aço inoxidável e *B. cereus* favorável por ensaios *in vitro*, enfatizando que o processo de adesão não é regido apenas por um processo termodinâmico, mas

também influenciado por outros fatores, tais como os fatores microbiológicos, como a possível presença de apêndices celulares.

O tipo de substrato também apresenta uma importante influência no processo de adesão. Segundo Viana (2006) a formação de biofilme em superfície de poliestireno foi amplamente influenciada pelo tipo de meio de cultivo, sendo que os meios nutricionais mais ricos contendo compostos como triptona, peptona e extrato de levedura, foram os que propiciaram maior taxa de multiplicação bacteriana. Assim segundo Boari (2009), o leite é um substrato que pode beneficiar o processo de adesão e formação de biofilmes, já que possui uma constituição rica em carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, além da alta atividade de água e pH próximo a neutralidade.

Biofilmes em laticínios invariavelmente contêm resíduos de leite, particularmente proteínas e minerais como o fosfato e cálcio. Neste contexto, Flach et al., 2005, avaliou a relação entre a produção de fatores de virulência (por testes de produção de cápsula, fímbria, hemolisina, protease e determinação da hidrofobicidade celular), relacionados à colonização e à formação de biofilmes em superfícies de polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão, sobre isolados pertencentes à família Enterobacteriaceae e do gênero *Staphylococcus*. De acordo com os autores, dos 101 isolados obtidos, 57 foram gram negativos e 44, gram positivos; 52,5% foram produtores de cápsula, 49,4% de fímbria, 4,0% de fímbria tipo I, 53,5% de hemolisina e 20,2% de proteases. Entre os isolados da família Enterobacteriaceae, foram observados 4 produtores de fímbria tipo I, sendo dois isolados de aço inoxidável, um de pano de algodão e um de polipropileno. A maioria dos isolados teve hidrofobicidade celular elevada, e a associação entre presença de cápsula e adesão em pano de algodão foi estatisticamente significativa (FLACH et al., 2005).

Os membros da família Enterobacteriaceae utilizados no trabalho de Flach et al (2005), produziram uma maior quantidade de fatores de adesão e foram encontrados com maior incidência no pano de algodão. Todavia, sua adesão foi significativamente menor que a do gênero *Staphylococcus* ao polipropileno. Para explicar esse fato, sugere-se o envolvimento de outros fatores, como características físico-químicas da superfície, capazes de proporcionar filmes condicionantes de diferentes naturezas, provocando a

atração das células bacterianas para próximo da superfície. Outros fatores seriam o número e o estado fisiológico das células no momento da análise. Nesse caso, e baseados na interpretação estatística dos dados, pode-se sugerir que o filme condicionante formado no polipropileno não favoreceu a adesão de células produtoras de cápsula.

Pode-se inferir que a associação entre cápsula e adesão em pano de algodão, justifica o maior número de isolados da família Enterobacteriaceae encontrados neste tipo de superfície. Por ser um material mais poroso, pode ocorrer o favorecimento para alojar aos microrganismos, fazendo com que estes levem menos tempo para iniciar ou persistir na síntese de exopolissacarídeos, ingressando na fase irreversível de adesão. Como os *Staphylococcus* não produzem essa estrutura com tanta frequência, poderiam ser mais facilmente removidos da superfície do pano de algodão com a lavagem deste material (FLACH et al., 2005).

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de Pesquisa

Trata-se de um estudo qualitativo onde realizou-se uma pesquisa bibliográfica.

A pesquisa qualitativa , pode ser definida como uma metodologia que produz dados a partir de observações extraídas diretamente do estudo de pessoas, lugares ou processos com os quais o pesquisador procura estabelecer uma interação direta para compreender os fenômenos estudados. Normalmente, parte de questões mais amplas , que só vão tomando uma forma mais definida quando se desenvolve o trabalho.

4.2 Dados obtidos

Os dados foram extraídos em sistema de busca e em bases de dados sendo utilizados os seguintes descritores para pesquisar os artigos: adesão de bactérias, formação de biofilmes, tecnologia do leite , leite e suas características, ligações químicas e aspectos físico-químicos da adesão dos microrganismos.

4.3 Tratamento e análise dos Dados

Os dados coletados foram analisados e expressos de forma descritiva em texto, com sucessiva discursão baseada em dados de estudos já realizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho, permite predizer que há uma possível relação direta entre formação de biofilmes e produção de fatores de virulência relacionados à adesão, pelos microrganismos, principalmente com relação à produção de cápsula e hidrofobicidade celular. Entretanto, como a formação de biofilmes é um processo multifatorial, é necessário considerar também a influência de outras características, pertinentes ou não à célula bacteriana, tais como presença de apêndices, carga superficial (potencial eletrocinético), dentre outros.

O mecanismo de adesão também pode ser favorecido pelo potencial eletrocinético entre a superfície microbiana e a superfície biológica, como a pele do animal, ou superfícies inertes utilizadas durante a obtenção e processamento do leite. O potencial eletrocinético ou potencial zeta de macromoléculas, partículas, ou superfícies é a diferença de potencial em um meio uniforme entre um ponto a uma distância da superfície e um ponto no plano de cisalhamento (ARAUJO, et al 2010; LAMEIRAS et al., 2008).

O potencial zeta é um importante parâmetro para o estudo de química de superfície, visto que pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de sistemas coloidais, assim como predizer se um processo de adesão pode ou não ser favorecido entre duas superfícies. O potencial zeta de célula bacteriana é, em geral, negativo e uniforme na superfície celular, uma vez que a carga na parede bacteriana é homogênea. Em geral, o potencial zeta de bactérias varia de -10 a -90 mV (ARAUJO et al, 2010; PALMER et al., 2007).

Se a bactéria e a superfície apresentarem o mesmo sinal e o meio apresentar elevada força iônica, haverá um máximo de energia potencial, ou energia de barreira e, um mínimo de energia, designado mínimo primário, que se localiza a distância inferior a 2 nm da superfície. A redução de energia de

barreira ocorre quando se aumenta a força iônica do meio, em consequência da diminuição da energia potencial da dupla camada elétrica (ARAÚJO et al., 2010)

Quando o meio apresenta valores intermediários de força elétrica, o máximo de energia diminui, mas aparece um mínimo secundário. Nessas condições, o máximo de energia é em geral baixo e o seu valor é tanto menor quanto menor for a partícula. Se o máximo de energia for ultrapassado e o mínimo primário for alcançado, a ligação entre a bactéria e o substrato torna-se irreversível. Para valores elevados da força iônica do meio, a energia potencial de interação é negativa, e nesse caso, todas as partículas podem atingir o mínimo primário. A existência de dois mínimos de energia permite distinguir, a adesão reversível, quando ocorre o mínimo secundário, da adesão irreversível, quando ocorre o mínimo primário (GARRETT et al., 2008).

Uma correlação entre carga da superfície e adesão não é fácil. A dificuldade está nas características da superfície celular, que varia entre as espécies bacterianas. Em geral, há heterogeneidade nas superfícies celulares, em que muitos componentes podem diferir entre as espécies (AZEREDO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2010; FLETCHER, 1988).

Apesar da temperatura não ser de forma geral, um parâmetro que possa modificar diretamente superfícies que entram em contato durante a obtenção e processamento do leite, mas um fator muito utilizado durante o processamento de leite e derivados, é reportado na literatura a relação direta da temperatura com o processo de adesão em superfícies de processamento. Bernardes et al. (2013) avaliaram a adesão de *Bacillus cereus* isolados de laticínios, em aço inoxidável 304 polimentos nº 4 em diferentes tempos (1-10 dias) e temperaturas de contato 4 °- 35 °C. Foi observado que o aumento da temperatura de 4 a 35 °C resultou num aumento do número de células de *B. cereus* aderida à superfície em mais dos 3 ciclos em 1 dia e mais de 4 ciclos em 10 dias de condicionamento, indicando a importância da temperatura na adesão.

Além de todos os aspectos supracitados que podem influenciar direta ou indiretamente o mecanismo de adesão microbiano, é importante frisar que a qualidade microbiológica do ambiente também pode favorecer à adesão e formação de biofilme.

Radmore et al. (1988) constataram alta correlação entre o número de microrganismos presentes no ar do ambiente da área de embalagem de leite e o número de microrganismos contaminantes no produto final. Os autores observaram que após 60 segundos de exposição do produto ao ar a contagem foi de $3,0 \times 10^2$ UFC.m⁻³ a $3,9 \times 10^3$ UFC.m⁻³ e que 1,5% dos microrganismos presentes na amostragem de ar, por m³, era capaz de contaminar 1 litro de leite, em um recipiente com abertura de 100 cm², resultando na redução significativa da vida-de-prateleira.

5.1 Contaminação de superfícies

A contaminação em superfícies pode ocorrer pelo contato com manipuladores e superfícies contaminadas e também através da deposição de partículas de ar contendo microrganismos, originando uma contaminação cruzada. Assim, superfícies como as de polietileno, utilizado em placas para corte, cabos de utensílios cortantes e recipientes, podem propiciar o processo de adesão e constituir potencial veículo de contaminantes (SILVA, et al., 2003).

O mecanismo de adesão e formação de biofilme em superfície é um processo complexo, como descrito nos diversos estudos supracitados, onde diferentes fatores podem favorecer este fenômeno, sendo o seu entendimento, tais como, os aspectos termodinâmicos e biológicos importantes ferramentas que podem ajudar a desenvolver novas estratégias visando controlar e ou prevenir este processo em superfícies.

De forma geral, observa-se que os fatores físico-químicos são predominantes nas etapas iniciais da adesão e formação de biofilme, sendo os fatores microbiológicos, fundamentais nas etapas subsequentes, inferindo-se que os fatores microbiológicos, tendem a sobrepor aos fatores termodinâmicos após a etapa inicial do processo de adesão bacteriana.

6. Conclusões

Em suma, uma etapa primordial visando prevenir e ou diminuir o processo de adesão e formação de biofilme em diferentes superfícies que entram em contato com o leite durante o seu processamento, é a higienização realizada de forma eficiente, visando minimizar os inúmeros eventos desfavoráveis para a indústria de leite e derivados, tais como a diminuição da vida de prateleira, mudanças sensoriais indesejáveis, diminuição de rendimento e riscos à saúde pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSOLOM, D. R. et al. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, v.46, p.90 - 97, 1983.

ARAÚJO, E. A. et al. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Química Nova*, v. 33, p, 1940-1948, 2010.

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

BAYER, M. E.; SLOYER, J. L. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *Journal of General Microbiology*, v.136, p. 867 - 874, 1990.

BERNARDES, P. C. **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**. 2008. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BERNARDES, P. C. et al. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 984-992, 2010.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo.** 2008. 94f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BRAVO, M.L.C. **Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp. Formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil.** Piracicaba, SP, 2016. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de São Paulo, 2016.

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

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.

CHEN, G.; ZHU, H. Bacterial adhesion to sílica sand as related to Gibbs energy variations. **Colloids Surfaces Biointerfaces**, v. 44, p. 41-48, 2005

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Institute of Food Technologists**, v.2, p.22 - 32, 2003.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity, Washington**, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

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

DOGAN, B. et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 4, p. 270-282, 2006.

DOYLE, R.J. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. **Microbes Infect.** 2, 391–400, 2000.

DÜRR, H. Influence of surface roughness and wettability of stainless steel on soil adhesion, cleanability and microbial inactivation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 85, n. C1, p. 49-56, 2007.

ELIMELECH, M. et al. Particle Deposition and Aggregation-Measurements, Modelling and Simulation. New York: Oxford. **Colloid and Surface Engineering Series**, Butterworth-Heinemann Ltd, 1995.

FLACH, J. et al. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae.** 33(3), 291-296, 2005.

FLETCHER, M. How do bacteria attach to solid surfaces? **Microbiology of the Science**, v. 4, p. 133-136, 1988.

FLINT, S. H. et al. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant *Streptococci*. **Journal of Food Engineering**, v.43, p.235-242, 2000.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. **Molecular Microbiology**, v.51, p.675- 690, 2004.

FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 685–695, 2002

GARRETT, T.R. et al. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.

GOTTENBOS, B. et al. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: **Materials in Medicine***, v.13. p. 717 - 722, 2002.

HERMANS, K. et al. *Staphylococcus*. In: GYLES C. L. et al. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ° edição ed. Iowa: Wiley-blackwell. p. 75-89, 2010.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 59-75, 2001.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes**. Disponível em <<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>>. Acesso em 05 de setembro de 2016

KASNOWSKI, M. C. et al. REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA – ISSN: 1679-7353 Ano VIII – Número 15 – Julho de 2010 – Periódicos Semestral. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 15, n. VIII, 2010.

LAMEIRAS, F.S. et al. Measurement of the zeta potential of planar surfaces with a rotating disk. **Materials Research**, v. 11, n.2, p.217–219, 2008.

LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 99-107, 2006.

MARSHALL, V. Inoculated ecosystems in a milk environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 127-135, 1992.

MAYER, C. et al. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p.3 -16, 1999.

MENON, K. V. Biofilm and Food industry. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, p. 137-142, 2016.

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

NOVELLO, J.C.L. **Implantação de íons de prata em aço inoxidável e infecção fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de Alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 2012. 134 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2012.

OLIVEIRA, K.M.P. **Adesão de Salmonella Enteritidis em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. Universidade Estadual de Londrina, 115p. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, 2006.

PALMER, J. et al. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p.577, 2007.

PATEL, D. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 297-301, 2009.

PEREDA, J. A. O. et al. **Tecnologia de Alimentos**. v. 2. Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre, Artmed, 2005.

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

RADMORE, K. et al. Proposed guidelines for maximum acceptable airborne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 91-95, 1988.

SÁ, J.P.N. **Influência genotípica de estirpes de *Bacillus cereus* na adesão bacteriana e na resistência a sanitizantes químicos**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.

SALIMENA, A.P.S. **Caracterização fenotípica e molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina**. Lavras, MG, 2016. 79 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

SANTOS, A. L. et al. Effect of Cleaning Treatment on Adhesion of *Streptococcus agalactiae* to Milking Machine Surfaces. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 7, p. 1868–1872, 2013.

SILVA, C. A. S. et al. Evaluation of ultraviolet radiation to control microorganisms adhering to lowdensity polyethylene films. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 175- 178, 2003.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 154, n. 5, p. 329- 335, 2003.

TABOADA-SERRANO, P.; VITHAYAVEROJ, V.; YACOUMI, S.; TSOURIS, C.; **Environ. Sci. Technol**, v. 39, 6352 p, 2005.

TEIXEIRA, P. et al. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, p. 247, 2005.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v. 25, p. 807- 815, 2003.

TÜRKYILMAZ, S.; ESKIIZMIRLILER, S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from various animal clinical samples. **Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 30, n. 2, p. 201-206, 2006.

UBBINK, J.; SCHÄR-ZAMMARETTI, P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Colloid and Interface Science**, v. 12, n. 4–5, p. 263–270, 2007

VALCARCE, M. B. et al. 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 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. Hydrophobicity and Hydrophilicity of Biosurfactants. **Colloid and Interface Science**, v.2, 503 - 512, 1997.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de *Quorum Sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotóxicas isoladas de leite**. 2006. 176f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 176 p., 2006.

ZSCHÖCK, M. et al. Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, n. 108, p. 243- 249, 2005.

