

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**BIOFILMES – UM PROBLEMA EMERGENTE NA INDÚSTRIA
ALIMENTAR**

(Revisão Bibliográfica)

Andreia Renata Alves Lopes

Orientador:

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador:

Engº Isidro Batista Taborda da Silva

Porto 2014



Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**BIOFILMES – UM PROBLEMA EMERGENTE NA INDÚSTRIA
ALIMENTAR
(Revisão Bibliográfica)**

Andreia Renata Alves Lopes

Orientador:

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador:

Engº Isidro Batista Taborda da Silva

Porto 2014

Resumo

O desenvolvimento socioeconómico recente foi acompanhado por uma notória alteração no modo de vida das populações, nomeadamente no que respeita aos hábitos alimentares. Estas mudanças foram acompanhadas pelo alargamento e diversificação da produção e pela introdução de novas técnicas de produção, preparação e distribuição de alimentos. A preocupação da indústria alimentar com a prevenção e/ou eliminação de biofilmes nas superfícies de contacto alimentar emerge num quadro de alteração dos métodos produtivos e, simultaneamente, uma maior preocupação com a segurança alimentar.

Ao longo do presente relatório, é feita uma revisão sobre as etapas e mecanismos reguladores da formação de biofilmes, bem como os fatores envolvidos na sua fixação e posterior desenvolvimento. Seguidamente abordam-se as consequências e aplicabilidade destas estruturas organizadas e ainda o seu envolvimento, de uma forma geral, nas diversas indústrias alimentares. Por último, descreve-se sumariamente as novas tecnologias de deteção e controlo de biofilmes e também de que forma a sua eliminação pode ser efetuada. Neste ponto, além das metodologias tradicionais de limpeza e desinfeção, serão também abordadas estratégias em estudo para a remoção eficaz de biofilmes.

A leitura de um grande número de documentos possibilitou o aprofundamento e a integração de conhecimentos sobre esta importante temática, permitindo enriquecer um conjunto diversificado de atividades empreendidas durante o estágio que decorreu na Silliker Portugal S.A., nomeadamente o acompanhamento de auditorias de higiene e segurança alimentar, bem como a execução de um balanço anual, referente aos quatro trimestres em que se realizaram as visitas. Foi-me ainda permitido fazer uma apresentação, que teve como objetivo informar e alertar para os fatores de risco reincidentes ao longo das auditorias realizadas. Entre outras atividades, tive também a possibilidade de contactar com a formação, educação e sensibilização de operadores alimentares ao nível da higiene e segurança no trabalho.

Agradecimentos

Em primeiríssimo lugar, quero agradecer aos meus pais, pela paciência, pela insistência e pelo cuidado que tiveram comigo ao longo destes anos. Nunca desistiram e incentivaram-me sempre a continuar. Ao meu irmão, outro alicerce fundamental, mil obrigadas!!(Espero que chegue a Macau este meu agradecimento). Também para a minha querida Matilde, um beijinho gigante e um agradecimento especial.

Agradeço ao Professor Paulo Martins da Costa, pelas magníficas palavras que me dirigia e que tinham um efeito tranquilizante sobre mim. Além disso, um muito obrigada pela orientação ao longo deste projeto, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o meu percurso académico e pela disponibilidade e apoio concedidos.

Agradeço ao Engenheiro Isidro Silva pela receção, partilha de conhecimentos e paciência ao longo do estágio, assim como a alguns maravilhosos membros da equipa da Silliker.

Agradeço à Professora Lucinda Bessa, pela disponibilidade e amabilidade que demonstrou para comigo.

Agradeço às minhas queridas amigas, que tal como os meus pais foram um grande apoio. Muito obrigada pela paciência!

Por último, gostaria de dedicar este trabalho ao meu avô José, que vive ansioso pelo final deste meu percurso, para que finalmente me possa chamar “Doutora”. Obrigada Vovô!

Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|
| AHL | Lactona N-acil-homoserina |
| AL-2 | Diéster de boro |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CaCO ₃ | Carbonato de cálcio |
| CIP | Clean in place |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| eADN | Ácido desoxirribonucleico extracelular |
| <i>e.g.</i> | <i>exempli gratia</i> |
| EPS | Substância polimérica extracelular |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> |
| HACCP | Análise de Perigos de Pontos Críticos de Controlo |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogénio |
| IC | Imobilização celular |
| <i>i.e.</i> | <i>id est</i> |
| NaClO | Hipoclorito de sódio |
| NBR | Borracha de nitrilo |
| OE | Óleos essenciais |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PTFE | Politetrafluoretileno |
| QAC | Compostos de amónio quaternário |
| QS | <i>quorum sensing</i> |
| RTE | Ready to eat |
| SLIPS | Slippery Liquid Infused Porous Surfaces |
| UV | Ultravioleta |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Índice | |
| Resumo | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Abreviaturas | v |
| Índice | vi |
| Introdução | 1 |
| 1. Definição de Biofilme | 1 |
| 2. Biofilme e etapas de desenvolvimento | 3 |
| 2.1 Fixação inicial..... | 3 |
| 2.2 Ligação Irreversível | 4 |
| 2.4 Maturação | 4 |
| 2.5 Dispersão | 5 |
| 3. Formação de um Biofilme | 5 |
| 3.1 Fatores importantes na formação de um biofilme | 5 |
| 3.1.1 Propriedades da superfície celular | 6 |
| 3.1.2 Estruturas especializadas na fixação | 6 |
| 3.1.2.1 Apêndices Extracelulares | 6 |
| 3.1.3 Flagelos | 7 |
| 3.1.4 Substância Polimérica Extracelular (EPS)..... | 7 |
| 3.1.5 Comunicação célula-célula | 8 |
| 4. Estrutura de um Biofilme | 9 |
| 5. Consequências e aplicações dos biofilmes | 10 |
| 6. Tipos de materiais utilizados em superfícies de contacto com alimentos e a sua influência na formação de biofilmes | 11 |
| 7. Biofilmes: problema na indústria alimentar | 13 |
| 7.1 Indústria de processamento de carne..... | 15 |
| 7.2 Indústria de produtos da pesca e moluscos bivalves | 16 |
| 7.3 Avicultura | 16 |
| 7.4 Indústria de Laticínios..... | 17 |
| 7.5 Indústria alimentar de pronto-a-comer (RTE) | 19 |
| 8. Estratégias de controlo de biofilmes | 19 |
| 9. Remoção e erradicação | 22 |
| 9.1 Limpeza..... | 22 |
| 9.1.1 Limpeza enzimática | 23 |
| 9.1.2 <i>Clean in Place</i> (CIP) | 24 |
| 9.2 Desinfetantes | 24 |

Introdução

As doenças transmitidas por alimentos contaminados constituem desde sempre uma ameaça para a saúde humana. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) são consideradas um problema de saúde pública emergente em todo o mundo.

É sabido que muitos dos agentes responsáveis pelas toxinfecções alimentares têm a capacidade de colonizar, por longos períodos, as superfícies dos equipamentos empregues na armazenagem ou no processamento dos alimentos. Estes biofilmes são difíceis de eliminar e, como tal, constituem um risco importante que é necessário estudar a fim de se poderem identificar estratégias mais eficazes para o seu controlo.

Os biofilmes constituem um ponto crítico nas mais variadas indústrias alimentares (Srey *et al.* 2013). A partir do momento em que se encontram presentes em equipamentos de processamento alimentar, bem como em superfícies de contato com alimentos, agem como uma fonte persistente de contaminação e podem ser introduzidos nas matrizes alimentares, mesmo em momentos já posteriores às etapas de descontaminação, e.g. aquecimento, cura, fumagem e irradiação. Nesta circunstância, os biofilmes são uma séria ameaça à qualidade microbiológica e à segurança dos produtos alimentares, podendo estar na origem de doenças veiculadas por alimentos e, adicionalmente, de grandes perdas económicas (Van Houdt & Michiels 2010). Além disso, os biofilmes são extremamente resistentes aos desinfetantes, devido às suas características intrínsecas particulares, permitindo-lhes ter um impacto cada vez mais negativo no setor alimentar (Srey *et al.* 2013).

Nas últimas décadas, a investigação vem dando maior importância ao estudo e conhecimento destes aglomerados microbianos, na tentativa de identificar uma solução para a sua erradicação (Srey *et al.* 2013). Mais de 60 anos após o primeiro relato sobre biofilmes (Zobell 1943), eles permanecem uma preocupação em diversas áreas, especificamente na indústria de alimentos, no ambiente e em áreas biomédicas (Simões *et al.* 2010, Fouladkhah *et al.* 2013). Neste contexto, pretende-se no presente trabalho descrever todos os aspetos envolvidos na formação, desenvolvimento e disseminação dos biofilmes, bem como na prevenção e eliminação dos mesmos.

1. Definição de Biofilme

Na natureza, as bactérias encontram-se em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, formando biofilmes, i.e. ecossistemas estruturados e altamente dinâmicos que atuam de maneira coordenada. Estes complexos ecossistemas microbianos podem ser formados por populações de uma única espécie ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados numa grande variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas (metais, plásticos, rochas, implantes

médicos, tubagens de distribuição de água, etc.) e em quase todos os tipos de ambientes (Tan *et al.* 2014). Na verdade, a combinação de humidade, nutrientes e a existência de uma superfície, torna provável a formação de um biofilme. Desta forma, muitos autores definem biofilmes como aglomerados ou associações de microrganismos (e.g. bactérias, fungos, leveduras, algas, protozoários) aderidos a uma superfície e envolvidos em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS). As bactérias são os microrganismos predominantemente encontrados nos biofilmes (Poulsen 1999), sendo as mais comuns *Pseudomonas* spp., *Listeria*spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., entre outras. Estes microrganismos são capazes de formar um biofilme em ambientes de processamento alimentar, representando desta forma, uma ameaça potencial para a saúde pública através de surtos de origem alimentar (Tan *et al.* 2014).

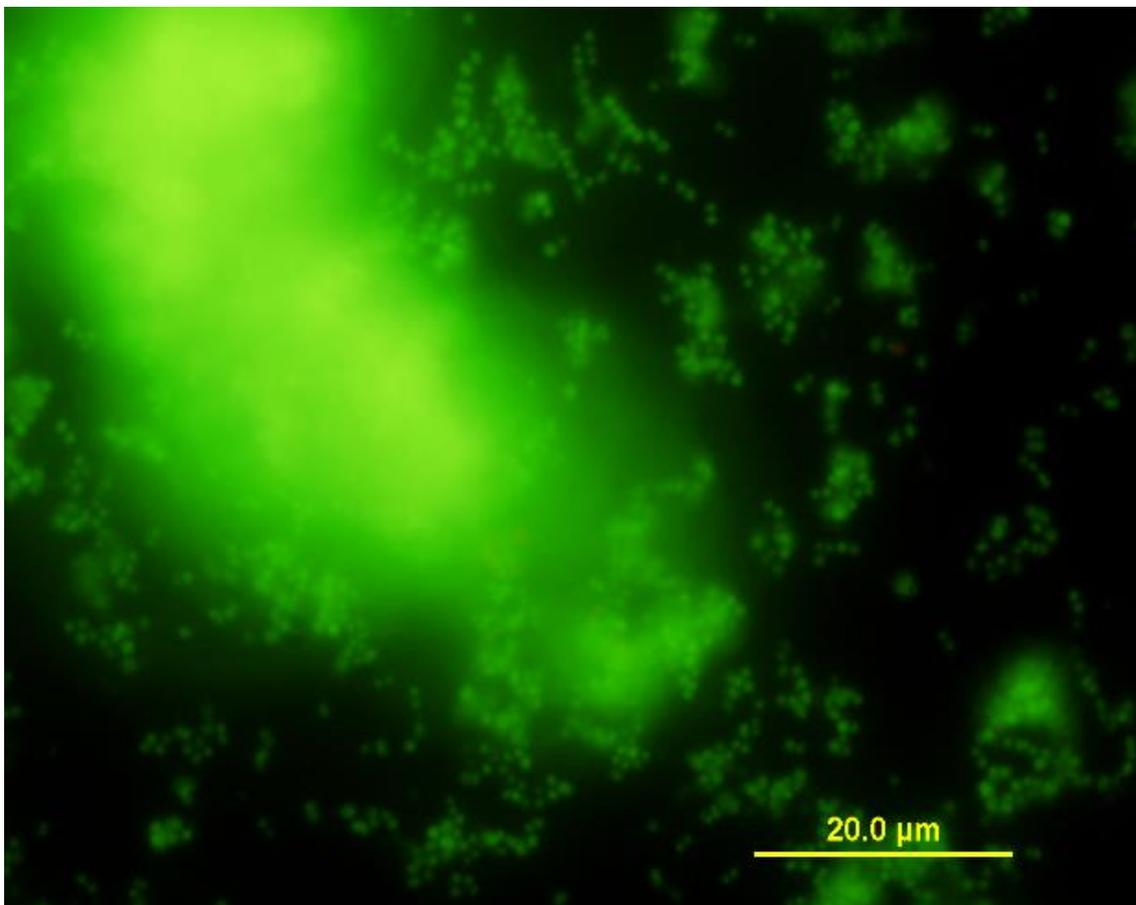


Figura 1 e 2: Imagem de biofilme por *S. aureus* formado in vitro, corado com o *Kit Live/Dead* (a coloração verde indica a viabilidade das bactérias). São imagens obtidas por microscopia de fluorescência. (imagem gentilmente cedida pela Professora Lucinda Bessa)

2. Biofilme e etapas de desenvolvimento

Há inúmeros mecanismos através dos quais as espécies microbianas são capazes de entrar em contacto com uma superfície, fixar-se firmemente a ela, promover interações célula-célula e crescer como uma estrutura complexa (Simões *et al.* 2010). Qualquer tipo de microrganismo pode formar um biofilme e ter um papel fundamental em várias infeções. Em ambientes inóspitos e em condições adversas, como estratégia de sobrevivência, para qualquer bactéria é fundamental ter capacidade para formar um biofilme, (Srey *et al.* 2013), uma vez que é bastante mais resistente aos agentes antimicrobianos, às alterações do meio envolvente ou à carência de nutrientes, quando comparado com as células na forma planctónica (Tan *et al.* 2014, Srey *et al.* 2013, Gram *et al.* 2007, Joseph *et al.* 2000). Esta maior resistência deriva da formação de uma barreira, essencialmente constituída pela matriz EPS, que previne ou diminui o contacto com os agentes antimicrobianos (Srey *et al.* 2013). A formação de um biofilme compreende uma sequência de passos graduais e dinâmicos, que consistem na (i) fixação inicial, (ii) fixação irreversível, (iii) rápido desenvolvimento da arquitetura de um biofilme, (iv) maturação e (v) dispersão (Tan *et al.* 2014, Srey *et al.* 2013).

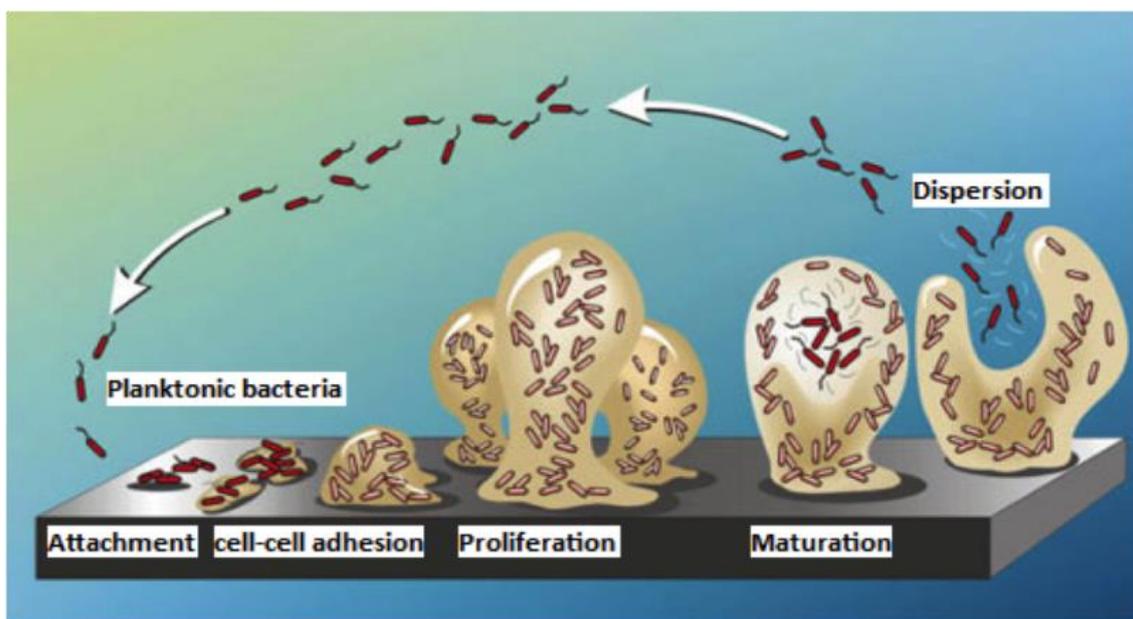


Figura 3: Etapas sequenciais envolvidas na formação de um biofilme (Adaptado de *Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman*).

2.1 Fixação inicial

A fixação inicial pode ser passiva ou ativa, dependendo da motilidade da célula microbiana. A fixação passiva é impulsionada pela gravidade, difusão e pela dinâmica de fluidos. Na adesão ativa, a superfície da célula facilita a fixação inicial (Chmielewski & Frank 2003). Nesta fase, a adesão é reversível, uma vez que não

ocorreu ainda uma série de alterações morfológicas, necessárias à formação do biofilme e muitas células podem separar-se da superfície e regressar à fase planctónica. As propriedades da superfície têm igualmente um papel fundamental na adesão bacteriana. Geralmente, qualquer superfície é vulnerável à formação de biofilmes (Srey *et al.* 2013), embora esteja em curso uma intensa investigação para o desenvolvimento de materiais refratários à formação dos mesmos.

2.2 Ligação Irreversível

A passagem de fixação reversível para irreversível é uma alteração que ocorre a partir de uma interação fraca das bactérias com a superfície para uma ligação permanente, na qual os apêndices extracelulares e/ou a EPS tem uma função fundamental (Chmielewski & Frank 2003). Após a fixação irreversível apenas fortes forças de cisalhamento (*shear stress*) ou a quebra química das forças de fixação por enzimas, detergentes, desinfetantes e/ou calor podem ser capazes de remover/destacar o biofilme (Srey *et al.* 2013). Vários estudos indicam que a ligação irreversível pode ter duração de 20 minutos a 4 horas, a temperaturas entre 4 e 20 °C (Chmielewski & Frank 2003).

2.3 Rápido desenvolvimento da arquitetura de um biofilme (Formação de micro-colónias)

A formação de micro-colónias resulta da acumulação e crescimento simultâneos de microrganismos e está associada à produção de EPS que ajuda a fortalecer a ligação entre a bactéria e a superfície e estabiliza a colónia perante qualquer stresse ambiental (Winkelstroter *et al.* 2013). Estudos sobre espécies bacterianas em sistemas naturais mostraram que a formação de micro-colónias resultava do recrutamento de células planctónicas do meio envolvente, através da comunicação (*signaling*) célula-célula (*quorum sensing*) (Winkelstroter *et al.* 2013). A associação das bactérias em micro-colónias traz muitas vantagens, uma vez que proporcionam a troca de substrato entre espécies e/ou a remoção do produto final das bactérias (Srey *et al.* 2013).

2.4 Maturação

A maturação é a etapa em que se consolida a estrutura organizada (Winkelstroter *et al.* 2013) que pode ser plana, ter forma de cogumelo ou seguir o modelo mosaico heterogéneo, dependendo da fonte de nutrientes que está a ser utilizada. O tempo necessário para atingir a maturação estrutural é muito variável (de um dia a várias semanas), dependendo do ou dos microrganismos envolvidos e das condições ambientais (Srey *et al.* 2013).

2.5 Dispersão

A dispersão é a última etapa do ciclo de formação de um biofilme, e permite que as células possam voltar à sua forma planctônica (Winkelstroter *et al.* 2013). Alterações externas, como aumento da força de cisalhamento de fluidos (*shear stress*), assim como processos internos que ocorrem no biofilme, tais como a degradação enzimática endógena, a libertação de EPS ou de proteínas de ligação à superfície, são todas causas possíveis para que esta última etapa se concretize. A dispersão parece ser um processo ativo que permite a colonização de novos locais. Além disso, o esgotamento da fonte de nutrientes também é considerada como uma razão para que o desprendimento ocorra, permitindo às bactérias “procurarem” um meio ambiente com maior disponibilidade de nutrientes (Srey *et al.* 2013).

3. Formação de um Biofilme

3.1 Fatores importantes na formação de um biofilme

A capacidade de formar biofilmes varia muito, não apenas entre espécies, mas também entre diferentes estirpes pertencentes à mesma espécie. Exemplo disso foi um estudo realizado com diferentes estirpes de *Listeria monocytogenes*, que permitiu constatar serem produtoras de biofilme bem distintas, tendo sido algumas estirpes classificadas como altas produtoras, outras como produtoras moderadas e algumas até como muito fracas na produção de biofilmes (Chmielewski & Frank, 2006). As propriedades da superfície celular, em particular a presença de apêndices extracelulares, as interações envolvidas na comunicação célula-célula e a produção de EPS são importantes fatores para a formação e desenvolvimento de um biofilme (Simões *et al.* 2010). No entanto, também outros fatores podem influenciar a capacidade de formação de um biofilme, em virtude da ligação de microrganismos às superfícies e o seu subsequente desenvolvimento, incluir processos muito complexos afetados por diversas variáveis (Quadro 1). (Simões *et al.* 2010, Van Houdt & Michiels 2010, Srey *et al.* 2013, Chaturongkasumrit *et al.* 2011). Em geral, a fixação ocorre mais prontamente em superfícies mais rugosas e hidrofóbicas (Simões *et al.* 2009). Assim sendo, a formação destes aglomerados varia entre estirpes e espécies, sendo igualmente influenciada por outros fatores, o que faz com uma bactéria seja uma forte produtora de biofilme num determinado ambiente, tornando-se fraca num outro (Srey *et al.* 2013).

| Superfície de adesão | Fluído | Célula |
|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| Textura ou rugosidade | Velocidade do fluxo | Moléculas sinalizadoras |
| Hidrofobicidade | pH | Apêndices extracelulares |
| Química da superfície | Temperatura | Substância polimérica extracelular |
| Carga | Catiões | Hidrofobicidade da superfície da célula |
| Película de condicionamento | Disponibilidade de nutrientes | |
| | Presença de produtos antimicrobianos | |

Quadro 1: Variáveis que influenciam a ligação de células e a formação e desenvolvimento de biofilmes (Adaptado de Simões et al. 2010).

3.1.1 Propriedades da superfície celular

A fixação bacteriana a superfícies ou a outras células pode ser vista como um processo físico-químico determinado por forças Van der Waals (Berk 2013) e forças hidrofóbicas, que predominam durante a ligação reversível e também interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, forças hidrofóbicas e ligações covalentes iônicas, que ocorrem sobretudo durante a ligação irreversível (Berk 2013, Chmielewski & Frank 2003). Segundo Simões e colaboradores (2010), a hidrofobicidade da superfície celular é importante no que toca à sua fixação. As propriedades físico-químicas da superfície, podem exercer uma forte influência na adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos), do que às hidrofílicas (metais e vidro). Estudos mostram que a adesão microbiana se torna maior com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como da superfície de adesão (Rodrigues *et al.* 2009).

3.1.2 Estruturas especializadas na fixação

Muitas células produzem apêndices filamentosos extracelulares, que desempenham um papel importante no processo de ligação. Na verdade, o seu raio de interação com a superfície é muito menor que o da própria célula. São conhecidas algumas estruturas, tais como: pili, fímbrias, *prothecae* e talos (*stalks*) (Simões *et al.* 2010).

3.1.2.1 Apêndices Extracelulares

Pili e fímbrias são estruturas comumente encontradas em muitas bactérias Gram-negativo. São excelentes apêndices filamentosos, geralmente retos e não estão envolvidos na locomoção (Simões *et al.* 2010). As pili, estruturalmente semelhantes às fímbrias (Van Houdt & Michiels 2010), são compostas por pilina e tem uma forma helicoidal (Trabulsi *et al.* 1999). Estas estruturas (pili) estão envolvidas na transferência de genes através do fenômeno de conjugação, que é um processo de transferência de

DNA, de um plasmídeo ou transposição entre bactérias, envolvendo o contacto direto entre elas. Este processo de conjugação pode estimular o desenvolvimento de biofilmes, porque o pilus que efetua a conjugação pode atuar como um fator de adesão da superfície celular, permitindo o contacto célula-célula ou célula-superfície (Van Houdt & Michiels 2010). Alguns autores afirmam que as pili e estruturas associadas assumem um papel importante na adesão e colonização de superfícies, provavelmente pela superação da barreira de repulsão eletrostática inicial que existe entre a célula e o substrato. No entanto, podem não estar envolvidas no processo de ligação, mesmo quando estão presentes (Simões *et al.* 2010).

Prosthecae e Talos (*stalks*) formam um outro grupo de estruturas de fixação. Estas ocorrem em diversos tipos de microrganismos e podem localizar-se em um ou vários locais à superfície da célula. São filiformes ou extensões rombas, da parede ou membrana celular e são responsáveis pela adesão firme de microrganismos a locais específicos de outros microrganismos ou a superfícies de partículas (Simões *et al.* 2010).

3.1.3 Flagelos

Os flagelos, quando existentes, são responsáveis pela motilidade bacteriana (Simões *et al.* 2010, Chmielewski & Frank 2003). Tratam-se de apêndices longos - que executam movimentos em chicote - constituídos por subunidades da proteína flagelina, que se estendem para fora a partir do citoplasma ou a partir da parede celular (Trabulsi *et al.* 1999). A principal função do flagelo na formação de um biofilme assenta na interação inicial da célula com o substrato. A motilidade mediada por flagelos pode ser necessária para atingir a superfície a colonizar, permitindo também à célula ultrapassar as forças de repulsão electrostática que a afastam da superfície (Van Houdt & Michiels 2010, Simões *et al.* 2010). É possível que o flagelo consiga estabelecer, ele próprio, uma ligação com a superfície de aderência (Van Houdt & Michiels 2010, Simões *et al.* 2010).

3.1.4 Substância Polimérica Extracelular (EPS)

No processo de construção de um biofilme, as células bacterianas formam agregados de micro-colónias, que produzem uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a qual passa a envolver essas mesmas micro-colónias (Tan *et al.* 2014). A EPS consiste em polissacarídeos, proteínas, lípidos e DNA extracelular (eDNA) (Simões *et al.* 2010, Tan *et al.* 2014), embora seja reconhecido que metabolitos bacterianos não-poliméricos são também componentes influentes da matriz extracelular e importantes para o desenvolvimento do biofilme (Das *et al.* 2013).

De acordo com alguns autores citados por Simões e colaboradores (2010), as proteínas e os polissacarídeos representam 75-89% da composição da EPS do biofilme, o que indica que são eles os principais componentes.

Os mecanismos de libertação de DNA extracelular bacteriano, são mediados pelo *quorum-sensing* (QS) dependente e QS independente. Mecanismos independentes de QS são responsáveis pela libertação de níveis basais de eDNA, enquanto mecanismos de QS dependentes controlam a produção de pró-fagos, fenazinas e proteínas envolvidas na lise celular e posterior libertação de quantidades elevadas de eDNA.

O eDNA liga-se a outros biopolímeros, tais como polissacáridos, proteínas e metabolitos como fenazinas, proporcionando deste modo a integridade estrutural da matriz EPS. O eDNA promove interações ácido-base entre células bacterianas e entre bactérias e superfícies, desempenhando portanto, um papel essencial na estabilização estrutural de biofilmes e proteção das células bacterianas de fatores físicos e químicos.

Assim, com o conhecimento atual, torna-se claro que a segmentação e destruição do eDNA da matriz EPS bacteriana, constitui uma estratégia promissora para o tratamento de infeções bacterianas em contexto médico e controlo da formação de biofilmes em superfícies, num contexto de segurança alimentar. Demonstrou-se que a adição da DNase I (responsável pela hidrólise não específica de ligações fosfodiéster do DNA) não só inibe a formação de biofilmes, mas também destrói biofilmes maduros (Das *et al.* 2013). Em contraste, a adição de DNA pode ser aplicado na “construção” de biofilmes para efeitos benéficos, tais como na recuperação de poluentes ambientais e produção de eletricidade ou de combustíveis através de sistemas bioeletroquímicos ou biorreatores.

Assim sendo, a matriz EPS, tem um papel importante não só na formação do biofilme, mas também no aumento da sua resistência aos agentes antimicrobianos (Van Houdt & Michiels 2010, Tan *et al.* 2014).

3.1.5 Comunicação célula-célula

A “força motriz” no desenvolvimento de uma comunidade bacteriana é a auto-organização e a cooperação entre células, ao invés da clássica e competitiva seleção natural entre microrganismos individuais. Este conceito torna-se particularmente evidente quando se percebe o funcionamento de comunidades bacterianas organizadas em biofilmes. A sinalização célula-célula demonstrou desempenhar um

papel importante na fixação de células e na dispersão de biofilmes. A adaptação bem-sucedida de bactérias a condições ambientais em constante mudança está dependente da sua capacidade em se adaptar e responder ao ambiente externo, moldando muitas vezes a sua expressão genética (Simões *et al.* 2010, Tan *et al.* 2014, Garg *et al.* 2014, Van Houdt & Michiels 2010). Esta comunicação química, chamada de *quorum sensing* (QS) é definida como a regulação da expressão genética em resposta a variações na densidade populacional bacteriana (Miller & Bassle 2001), ou seja, em função da densidade celular, as bactérias produzem e libertam moléculas sinalizadoras, denominadas de auto-indutores (AI), que se difundem a fim de mediar a expressão genética (Miller & Bassle 2001). A detecção de um limiar mínimo de concentração estimulador de células auto-indutores, induz uma alteração da expressão de genes (Miller & Bassler 2001), que lhes permite agir em uníssono como enormes organismos multicelulares. Através deste mecanismo, bactérias Gram-positivo e Gram-negativo regulam variados processos fisiológicos, ajustando a expressão genética em conjunto com a sua dimensão populacional. Iniciam-se, então, atividades complexas como, o controle do metabolismo secundário, bioluminescência, secreção de proteínas, a mobilidade, produção de fatores de virulência, a transferência de plasmídeo e o desenvolvimento do biofilme em diversas bactérias (Garg *et al.* 2014, Simões *et al.* 2010). Parece claro que a capacidade de comunicação dentro, e entre espécies, é fundamental para a sobrevivência de bactérias e para a interação em habitats naturais (Miller & Bassle 2001).

Oligopéptidos e lactonas N-acil-homoserina (AHL) são as principais moléculas AI envolvidas na comunicação intra-espécies em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, respetivamente, ao passo que moléculas diéster de boro (AI-2) estão envolvidas na comunicação inter-espécie entre os microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo (Simões *et al.* 2010, Van Houdt & Michiels 2010, Garg *et al.* 2014).

Presumivelmente, este processo confere às bactérias algumas das qualidades de organismos superiores. A evolução dos sistemas *quorum sensing* poderia, portanto, ter sido um dos primeiros passos no desenvolvimento de multicelularidade (Miller & Bassle 2001).

4. Estrutura de um Biofilme

O conceito de biofilme tem emergido gradualmente de estudos científicos ao longo do tempo. Se no passado os biofilmes eram entendidos como estruturas compactas, essa conceção alterou consideravelmente. Estudos recentes mostram que os biofilmes têm uma estrutura porosa e são atravessados por canais, através dos quais a água, os

nutrientes e o oxigênio são distribuídos, bem como os resíduos celulares são encaminhados para a superfície do biofilme. O transporte parece ocorrer por difusão passiva ou com a ajuda de água (Poulsen 1999). No entanto, a limitação da taxa de difusão e do consumo de oxigênio provocam uma diminuição do crescimento de células localizadas mais profundamente no biofilme, condicionando a forma com os microrganismos aeróbios e anaeróbios se distribuem na mesma estrutura multicelular. Os primeiros situam-se nas zonas mais superficiais do biofilme e os segundos nas mais profundas, junto ao substrato sobre o qual o biofilme se desenvolve (Poulsen 1999). Esta estratificação deve-se à dificuldade de difusão do oxigênio através do biofilme, conjugado com o facto do oxigênio disponível ser logo consumido pelos microrganismos que compõem as camadas mais superficiais. Consequentemente, as células desenvolvem um estado *quase-dormente* (Houdt *et al.* 2010) e exemplo disso, é a existência de uma pequena subpopulação de células no interior do biofilme que se torna altamente tolerante à ação dos antimicrobianos, que são as chamadas células *persistir*, uma espécie de estado de latência ou dormência (Van Houdt & Michiels 2010).

A arquitetura de um biofilme depende do tipo e número de espécies bacterianas envolvidas e da taxa de fluxo do ambiente onde se encontra aderido. Em biofilmes polimicrobianos a estrutura é muitas vezes irregular, consequência do diferente crescimento e padrões de adesão dos microrganismos (Poulsen 1999).

5. Consequências e aplicações dos biofilmes

A capacidade para aderir a superfícies e envolver-se em qualquer uma das etapas que leva à formação de um biofilme, é um fator omnipresente entre as bactérias. A formação desta estrutura multicelular complexa, tem implicações substanciais em áreas que vão desde processos industriais, como sistemas de refrigeração de água (Poulsen 1999), exploração de petróleo, produção de papel e processamento de alimentos, assim como áreas relacionadas com a saúde, nomeadamente na medicina e na medicina dentária (Van Houdt & Michiels 2010).

São vários os aspetos negativos relacionados com a presença de biofilmes, que incluem a redução da taxa de transferência térmica, perda de sensibilidade de sensores, bloqueio de tubagens e reservatórios de água, perdas de energia e a corrosão de vários tipos de material (Poulsen 1999, Kregiel 2014, Tan *et al.* 2014). Além destes aspetos, eles são também uma fonte potencial de contaminação dos alimentos, podendo conduzir à deterioração ou à transmissão de microrganismos patogénicos veiculados pelos géneros alimentícios (Kregiel 2014, Tan *et al.* 2014). A

indústria de processamento alimentar é uma área que fornece uma grande variedade de condições que favorecem a formação de biofilmes, como por exemplo, a presença de humidade, nutrientes e a inoculação de microrganismos a partir de matérias-primas (Kregiel 2014).

Por outro lado, a adesão celular a superfícies pode ser aproveitada de forma conveniente e económica (Kregiel 2014). No tratamento de águas residuais, os biofilmes adquirem um papel importante, pela forma como geram uma base diversificada de reatores aeróbios e anaeróbios. Além disso, contribuem para uma degradação mais eficiente de substratos orgânicos e para uma maior produção de biogás (metano) (Langer *et al.* 2013).

A tecnologia de imobilização celular (IC) foi desenvolvida extensivamente ao longo das duas últimas décadas (Kregiel 2014). As técnicas clássicas da IC podem ser classificadas em naturais e artificiais, sendo as naturais, que incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana a suportes sintéticos ou naturais (Covizziet *al.* 2007). Esta tecnologia tem sido aplicada na produção de enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, álcool, aromas e em processos de bioconversão, bem como na biorremediação e no biotratamento de efluentes (Kregiel 2014). Assim sendo, a presença de biofilmes não tem apenas efeitos negativos (Langer *et al.* 2013), podendo também ser explorados de forma benéfica para o Homem.

6. Tipos de materiais utilizados em superfícies de contacto com alimentos e a sua influência na formação de biofilmes

As propriedades da superfície de fixação são importantes fatores que afetam e determinam a formação de biofilmes em conjunto com as células bacterianas (Van Houdt & Michiels 2010). A escolha do material é, portanto, de grande importância na conceção de superfícies de contacto e processamento de alimentos. Propriedades como a rugosidade da superfície, facilidade de limpeza e desinfeção, capacidade de humedecimento (determinado pelo hidrofobia) e a vulnerabilidade ao desgaste, influenciam a capacidade das células em aderir a uma superfície específica e, assim, determinar o estado e potencial de higienização do material (Van Houdt & Michiels 2010). Além disso, os materiais em contacto direto com alimentos têm de cumprir determinadas especificações, estando sujeitos a procedimentos oficiais de aprovação antes de serem usados (Van Houdt & Michiels 2010). Existe uma grande diversidade de materiais que são usados na indústria alimentar, entre eles o aço inoxidável, vidro, borracha, polietileno, politetrafluoretileno (PTFE é vulgarmente conhecido pelo nome comercial teflon), borracha de nitrilo (NBR é geralmente útil entre -40°C e 105°C,

podendo suportar 120°C intermitentemente) e madeira nos países menos desenvolvidos (Van Houdt & Michiels 2010, Srey *et al.* 2013).

Vários estudos foram efetuados, na tentativa de perceber qual a influência de um material na formação de biofilmes, visto não ser possível prever o seu desenvolvimento, uma vez que esta condição depende de outros fatores nomeadamente fatores ambientais e da (s) própria (s) bactéria (as) (Van Houdt & Michiels 2010). Os resultados demonstraram que a madeira estimula a formação dos mesmos, devido à sua porosidade e capacidade de absorção, podendo prender material orgânico e bactérias. Uma grande maioria dos autores afirma que o vidro é a superfície de contacto preferível, devido à sua superfície lisa e propriedades de resistência à corrosão, enquanto o aço inoxidável, apesar de mais resistente a danos causados por impacto, é vulnerável à corrosão (Srey *et al.* 2013). Após inúmeras pesquisas, alguns autores sugeriram que as células aderentes dependiam da energia livre acumulada na interface da superfície e nesse sentido, revelaram que a rugosidade da superfície não tinha correlação com a adesão, enquanto muitos outros afirmaram o oposto (Srey *et al.* 2013). A razão para explicar estes resultados contraditórios, poderá estar relacionada com a avaliação subjetiva relativamente ao grau de rugosidade da superfície estudada, e.g. superfícies polidas ou não polidas (Srey *et al.* 2013).

Aços inoxidáveis, em particular os austeníticos 304 e 316, constituem provavelmente o material de superfícies de contato com alimentos mais comumente usado, devido à sua estabilidade química e mecânica/física, à resistência a temperaturas adversas durante o processamento de alimentos, à sua facilidade de limpeza e elevada resistência à corrosão.

Durante o processamento de alimentos, a fixação bacteriana nas superfícies inertes é adicionalmente afetada pelos constituintes da própria matriz dos alimentos. Um estudo realizado por Van Houdt & Michiels 2010 demonstrou que o leite desnatado e as proteínas do leite, como a caseína e lactalbumina, reduzem significativamente a fixação de *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fragi*, *Salmonella enterica* Typhimurium, esporos e células vegetativas de *Bacillus thermophilus* e *Listeria monocytogenes* ao aço inoxidável e borracha de nitrilo.

Sugeriu-se também que para além do próprio material, outros fatores nomeadamente associados ao *design* do equipamento, como as juntas, os cantos e o tipo de soldadura constituem fatores importantes que afetam a formação de biofilmes (Srey *et al.* 2013). O material vedante usado no equipamento tecnológico fornece locais favoráveis para a

formação de biofilmes. Da mesma forma, as válvulas, também oferecem pontos adequados para o crescimento microbiano. Devido à posição que ocupa no equipamento, o material vedante está muito exposto ao atrito. Por conseguinte, é importante que a sua renovação ocorra regularmente, nomeadamente quando o seu tempo de vida útil é excedido, mantendo presente que o tempo de vida útil é, em parte, determinado pela temperatura do processo. Tal como acontece com o material vedante e as válvulas, as extremidades inoperantes em sistemas de condutas, também fornecem lugares favoráveis para o crescimento microbiano (Poulsen 1999).

As superfícies de contato com alimentos são comumente tratadas com agentes desinfetantes e produtos de limpeza que contêm peróxidos, cloraminas, hipocloritos, entre outros. Em particular, este último pode ser muito agressivo para o aço inoxidável e a libertação de cloro pode causar corrosão, caracterizada pelo colapso local da camada protetora "passiva" de óxido da superfície e pela formação de depressões profundas localizadas nessas áreas de superfície livre, facilitando assim a adesão bacteriana e a formação de biofilmes (Van Houdt & Michiels 2010).

7. Biofilmes: problema na indústria alimentar

A primeira publicação sobre biofilmes bacterianos de origem alimentar descreveu as propriedades adesivas de *Salmonella* spp. a superfícies de contacto com alimentos (Winkelstroter *et al.* 2013).

Atualmente, as estratégias de controlo microbiano têm-se mostrado pouco eficazes em proporcionar uma erradicação completa de microrganismos perigosos sem afetar a qualidade do produto (Srey *et al.* 2013). Os mecanismos moleculares pelos quais as bactérias são capazes de formar biofilmes em unidades de processamento de alimentos são um tema de interesse crescente nos últimos anos e parecem ser mais complexos do que inicialmente se pressupunha (Giaouris *et al.* 2013).

Vários são os documentos que descrevem a capacidade de agentes patogénicos de origem alimentar para se fixarem a diferentes superfícies de contato com alimentos e formar biofilmes robustos, incluindo *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *E. Coli* O157:H7, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*. Além de agentes patogénicos, importantes géneros bacterianos têm sido implicados na deterioração de produtos frescos, produtos de charcutaria e pronto-a-comer, nomeadamente *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens*, *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. (Giaouris *et al.* 2013).

A forma como os géneros alimentícios são processados, sustenta e seleciona as bactérias responsáveis pela formação de biofilmes nas superfícies de contato, devido à grande complexidade do equipamento usado (que por vezes é difícil de ser adequadamente limpo), à produção em massa de produtos, aos longos ciclos de produção e às vastas áreas de superfície disponíveis para o desenvolvimento de biofilmes (Giaouris *et al.* 2013).

O corte, a lavagem, o enxaguamento, a desidratação e embalagem são procedimentos frequentes na indústria alimentar e considerados fontes problemáticas de contaminação cruzada (Srey *et al.* 2013). Segundo Carrasco e colaboradores (2012), a contaminação cruzada é "um termo geral que se refere à transferência, direta ou indireta, de bactérias ou vírus de um produto contaminado para um produto não contaminado", ocorrendo quando as células se separaram da estrutura do biofilme e os alimentos passam sobre superfícies contaminadas ou através de aerossóis provenientes de equipamentos contaminados. Qualquer etapa entre a unidade de processamento alimentar e o consumidor final pode levar à contaminação dos produtos (Giaouris *et al.* 2013). As vias comuns de contaminação cruzada resumem-se a práticas de higiene deficientes, equipamentos contaminados, contaminação através dos manipuladores de alimentos e ao processamento ou armazenamento inadequados (Carrasco *et al.* 2012). Diversos são os fatores que podem afetar a ocorrência de contaminação cruzada, nomeadamente a composição dos alimentos (humidade, teor em gordura), a textura (homogeneidade, rugosidade) as propriedades físico-químicas das superfícies (hidrofobicidade, a carga elétrica, superfície abiótica), a força de corte, a velocidade de corte (cortes/minuto), os microrganismos (fase de crescimento, a tensão, o tamanho, a capacidade de se adaptar a diferentes tensões, capacidade e resistência de aderência em diferentes superfícies) e finalmente, as condições ambientais (temperatura, humidade relativa do ar) (Giaouris *et al.* 2013). É assim importante controlar e, se possível, corrigir todos os processamentos que possam contribuir para a contaminação cruzada, sendo a limpeza e desinfeção periódicas das superfícies, uma prática essencial para este desiderato (Srey *et al.* 2013).

Os produtos têm geralmente como última fase de processamentoo embalagem, que é considerado um dos pontos críticos de controlo. Este último passo deve ser controlado com atenção e regularidade, a fim de evitar a recontaminação (Srey *et al.* 2013), que segundo Carrasco e colaboradores (2012), ocorre muito frequentemente em alimentos depois de serem submetidos a um processo de inativação.

As correias transportadoras e ralos no pavimento são cada vez mais locais de eleição para a fixação dos microrganismos. Através da microscopia eletrónica de varredura,

foram detetadas células bacterianas em locais que lhes conferiam proteção relativamente aos desinfetantes, o que poderá explicar a ineficácia das soluções desinfetantes (Srey *et al.* 2013).

Assim sendo, a capacidade das bactérias para se fixarem em superfícies abióticas e formar biofilmes é um motivo de preocupação para muitas indústrias de alimentos, incluindo indústrias de processamento de carne, pescado, laticínios, aves e alimentos pronto-a-comer. Em tais ambientes, superfícies inadequadamente limpas, promovem o aparecimento de sujidade que juntamente com a presença de água contribuem para o desenvolvimento de biofilmes bacterianos (Giaouris *et al.* 2013).

7.1 Indústria de processamento de carne

A fixação de potenciais bactérias patogénicas e deteriorantes em superfícies de contato com alimentos e a posterior formação de biofilmes representam sérios desafios para a indústria de carne, uma vez que podem levar à contaminação cruzada dos produtos, resultando na transmissão de doenças (Giaouris *et al.* 2013).

Na indústria de carne, os biofilmes formados por bactérias patogénicas e deteriorantes podem criar uma fonte persistente de contaminação do produto, levando a sérios problemas sanitários e também a perdas económicas devido à deterioração dos alimentos. Em unidades de processamento, as bactérias encontram as condições adequadas que permitem a sua fixação a superfícies de contacto com alimentos (e.g. correias transportadoras, mesas e facas), formando posteriormente biofilmes. Uma vez formados, os procedimentos de limpeza e desinfeção rotineiramente aplicados poderão não ser totalmente eficazes na sua eliminação (Giaouris *et al.* 2013).

Segundo Gutiérrez e colaboradores (2012), os principais patógenos a serem controlados na indústria cárnica incluem, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* e, finalmente, *Bacillus cereus*. Assim, vários estudos têm sido realizados, no sentido de avaliar a transferência de bactérias patogénicas entre os diferentes equipamentos de processamento ou utensílios (Giaouris *et al.* 2013).

Os equipamentos de processamento têm sido reconhecidos como importantes veículos de contaminação cruzada em toda a cadeia de carnes (Giaouris *et al.* 2013). Dito isto, a melhor estratégia para garantir a segurança destes produtos, passa pela higiene adequada e pela aplicação de tecnologia de intervenção antimicrobiana a começar na linha de abate, processamento, armazenamento, etapas de distribuição até ao consumidor (Gutiérrez *et al.* 2012). No entanto, deve-se também frisar que na

indústria de produtos à base de carne (e.g. salsichas e enchidos tradicionais), a formação de biofilmes por algumas espécies bacterianas (e.g. estafilococos e lactobacilos) pode ser desejável, devido à sua função nos processos fermentativos associados à cura das carnes e, igualmente importante, como um meio de proteção contra o estabelecimento de biofilmes formados por bactérias indesejáveis (Giaouris *et al.* 2013).

7.2 Indústria de produtos da pesca e moluscos bivalves

Os moluscos bivalves e os crustáceos são responsáveis por uma quantidade significativa de doenças de origem alimentar e representam uma grande preocupação do ponto de vista da saúde pública (Carrasco *et al.* 2012).

Na indústria de processamento de produtos da pesca, os equipamentos e a qualidade da água são considerados as principais preocupações, assim como o facto de algumas das bactérias que podem ser encontradas em produtos da pesca, nomeadamente *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* serem responsáveis pela formação de biofilmes. Além deste género, muitos outros incluindo *Escherichia*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Srey *et al.* 2013, Gutiérrez *et al.* 2012), foram detetados em biofilmes de unidades de processamento.

Também a qualidade microbiológica da água pode ser afetada pela formação de biofilmes. Por motivos económicos, a indústria de processamento de produtos da pesca usa a água do mar em vez de água doce. No entanto, mesmo após o seu tratamento, através da combinação entre a adição de cloro e o sistema de radiação Ultravioleta (UV), verificou-se que permanecia contaminada com *Vibrio* spp., devido à formação de biofilmes no sistema de distribuição da água (do mar) já descontaminada. De igual modo, tem sido demonstrado que existe uma perda da qualidade da água depois de submetida a processos de tratamento - normalmente causada por células que se desprendem do biofilme presente no sistema de distribuição - devido à ineficácia de cloro residual em erradicar os biofilmes (Srey *et al.* 2013).

7.3 Avicultura

A associação entre aves e o género *Salmonella* é desde há muito reconhecida. A introdução destes microrganismos nos efetivos avícolas ocorre por via vertical (transmissão aos descendentes), através dos alimentos compostos usados na sua alimentação, em virtude das matérias-primas vegetais poderem estar contaminadas e também através de diversas fontes ambientais (e.g. água, insetos e contacto com aves silvestres). Atendendo à elevada cadência de abate, à mecanização dos processos e à

impossibilidade de efetuar procedimentos de higienização entre carcaças, há um intenso problema de contaminação cruzada direta (entre carcaças consecutivas) e indireta, mediada pelos equipamentos de abate (Carrasco *et al.* 2012). A importância das operações de abate (sangria, escaldão, depena, evisceração e lavagem final) na transferência de *Salmonella* spp. e de outros microrganismos perigosos é conhecida desde a década de 60 do século anterior, tendo sido demonstrado que a partir de uma única ave infetada introduzida na cadeia de abate se poderia transmitir, sistematicamente, o mesmo agente às 40 carcaças consecutivas e, de uma forma esporádica, a mais de uma centena de carcaças que se seguiam na linha de abate (Buncic & Sofos 2012).

Muitos estudos têm sido realizados sobre a formação de biofilmes na indústria de processamento de aves. Após várias investigações, identificou-se que a poeira, as superfícies, as fezes, a ração e o transporte de aves vivas entre as unidades de produção e processamento final da carne são importantes fatores de risco na contaminação por *Salmonella enterica* (Srey *et al.* 2013). No entanto, além desta espécie microbiana, é também frequentemente encontrado em aves e nas respectivas unidades avícolas, outros microrganismos perigosos para a saúde animal e humana. Nos anos mais recentes têm emergido os problemas causados por *Campylobacter* spp. devido à excelente adaptação desta bactéria às aves e respectivas carnes, sendo o seu controlo predominantemente efetuado pela combinação de uma refrigeração rápida com um tratamento térmico competente durante a confeção (Srey *et al.* 2013).

7.4 Indústria de Laticínios

O leite é um produto extremamente perecível e verdadeiramente vulnerável à contaminação por vários microrganismos (Srey *et al.* 2013). As principais fontes de contaminação estão frequentemente associadas à limpeza e desinfeção inadequadas dos equipamentos (Srey *et al.* 2013, Simões *et al.* 2010).

A formação de biofilmes em equipamentos usados na indústria de laticínios pode levar a graves problemas de higiene que, por sua vez se traduzem em riscos para o consumidor, em perdas por deterioração dos alimentos e em danos para os equipamentos devido à corrosão (Simões *et al.* 2010). Os biofilmes lácteos são constituídos por uma abundante matriz EPS e são ricos em resíduos do leite, principalmente proteínas e fosfato de cálcio (Simões *et al.* 2010). Durante a ordenha, os microrganismos patogénicos podem ser introduzidos nos equipamentos através da contaminação fecal, úberes infetados e também através da água utilizada nas operações de higienização do úbere e dos equipamentos (Gutiérrez *et al.* 2012,

Simões *et al.* 2010). Estes microrganismos contaminantes, uma vez introduzidos no leite, podem formar biofilmes que são difíceis de eliminar e atuar como um substrato para outros microrganismos menos propensos à formação de biofilmes, aumentando a probabilidade de sobrevivência de patógenos e uma maior disseminação dos mesmos durante o processamento do leite. A contaminação de produtos lácteos pode também ocorrer após a pasteurização, ao nível das máquinas de enchimento, sobretudo na proximidade de juntas de ligação entre tubos e entre tubos e equipamentos (Simões *et al.* 2010).

O tempo disponível para a formação de biofilmes dependerá da frequência de limpeza e desinfecção. Superfícies de contato com o produto, como as máquinas de ordenha, devem ser higienizadas várias vezes ao dia, ao passo que outro tipo de superfícies, como as paredes das salas de ordenha são apenas limpas uma vez por dia. Portanto, há mais tempo para a formação de biofilmes neste tipo de superfícies favorecendo a “instalação” plena de uma população microbiana estruturada, bem mais difícil de remover pelas práticas de higienização convencionais. O controlo efetivo de biofilmes indesejáveis pode ser alcançado através da compreensão do tipo e da natureza do resíduo presente no material contaminante (e.g. hidratos de carbono, gorduras, proteínas e sais minerais) e dos microrganismos a serem removidos das superfícies (Simões *et al.* 2010). O design do equipamento e a escolha dos materiais são importantes na prevenção da formação de biofilme. Segundo Simões e colaboradores (2010), o material mais versátil para os equipamentos é o aço inoxidável, em virtude do seu custo, possibilidade de adaptação (corte, moldagem, soldadura) e possibilidade de higienização com recurso a vários processos mecânicos, muito limitados em outros materiais como, por exemplo, os plásticos.

Em unidades de processamento de leite, as bactérias mais frequentemente encontradas associadas a superfícies de contato com os alimentos pertencem aos géneros *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Srey *et al.* 2013, Gutiérrez *et al.* 2012, Simões *et al.* 2010). *Pseudomonas* spp. é um dos géneros mais importantes em virtude de causar a deterioração de produtos lácteos mesmo durante a refrigeração, atuando através de duas vias diferentes: em primeiro lugar, estas bactérias produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas, que atuam nas proteínas e sinergicamente nos glóbulos de gordura contribuindo para o aparecimento de sabores estranhos e para o empobrecimento do valor nutricional do leite. Muitas destas enzimas sobrevivem à pasteurização e até mesmo às temperaturas praticadas durante a ultrapasteurização do leite (UHT), podendo originar a redução da qualidade sensorial e do prazo de

validade dos produtos lácteos líquidos processados. Em segundo lugar, *Pseudomonas* spp. podem atuar após o processo de pasteurização, causando deterioração do leite pasteurizado durante o armazenamento em ambiente refrigerado.

Convém no entanto notar que, para além das *Pseudomonas* spp., também outros microrganismos poderiam ser abordados por constituírem verdadeiros desafios de segurança alimentar na indústria de laticínios (Simões *et al.* 2010). A formação de biofilmes em unidades de processamento de leite depende de muitos fatores. Os produtos lácteos são muito suscetíveis à contaminação por biofilmes, sendo portanto um desafio a eliminação dos microrganismos deste tipo de produtos (Srey *et al.* 2013).

7.5 Indústria alimentar de pronto-a-comer (RTE)

Devido ao estilo de vida atual, os alimentos pronto-a-comer (RTE) tornaram-se muito populares. No entanto, são considerados alimentos de risco, uma vez que são consumidos diretamente, sem passar por qualquer processo de descontaminação (Srey *et al.* 2013).

Exemplos de alimentos RTE, incluem as ervas frescas e especiarias. O cravo, orégãos e pimenta preta, entre outras especiarias, podem ser expostos a grande carga microbiana durante a colheita e processamento e são vendidos sem qualquer tratamento para reduzir a contaminação (Carrasco *et al.* 2012). O queijo, um outro exemplo, foi considerado por alguns especialistas um dos produtos alimentares mais seguros, no entanto, determinados surtos envolvendo *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. relembram que o queijo está incluído na gama de produtos alimentares RTE, não sofrendo qualquer tratamento antes do consumo. O leite cru contaminado, bem como a contaminação cruzada com agentes patogénicos, podem ser introduzidos no processamento de produtos lácteos e representam um risco para a saúde humana, se o leite não pasteurizado for utilizado na produção de queijo (Carrasco *et al.* 2012).

Este tipo de alimentos são potencialmente suscetíveis à contaminação cruzada durante o processamento e manipulação. Após a sua preparação, os produtos podem ser recontaminados durante o transporte, a pesagem e a embalagem. Além disso, o tempo e as condições de armazenamento são fatores importantes que afetam a qualidade e segurança destes alimentos (Srey *et al.* 2013).

8. Estratégias de controlo de biofilmes

Compreender as características que estão na base do desenvolvimento de um biofilme é essencial para prevenir a sua formação e, como tal, reduzir os riscos de saúde

relacionados com os agentes patogénicos que se introduzem nos alimentos a partir de biofilmes (Nguyen *et al.* 2014).

Idealmente, a opção de prevenir a formação de biofilmes será mais lógica do que a sua eliminação. No entanto, não há atualmente nenhuma técnica conhecida capaz de prevenir ou controlar com sucesso a formação de biofilmes indesejáveis (Simões *et al.* 2010). Consequentemente, muitos estudos focam-se essencialmente no desenvolvimento de contramedidas (Srey *et al.* 2013). A primeira e mais importante medida a tomar para evitar a formação de biofilmes é a limpeza e desinfeção regulares, de modo que não seja permitido às células fixarem-se nas superfícies (Srey *et al.* 2013, Simões *et al.* 2010, Chaturongkasumrit *et al.* 2011). Igualmente importante é a seleção de condições durante o processamento dos alimentos que inviabilizem um ótimo crescimento dos microrganismos, nomeadamente condicionando a temperatura e o pH. Raramente, esta solução é suficiente, devendo por isso ser utilizada em combinação com outros métodos de prevenção (Poulsen 1999).

Com o objetivo de encontrar uma estratégia preventiva, Rogers e colaboradores (1994) tentou identificar materiais que não promovessem a formação de biofilmes. Este estudo classificou diferentes materiais de acordo com a sua propensão para o crescimento dos biofilmes, concluindo-se que praticamente nenhum material impedia a formação destes aglomerados de microrganismos. No entanto, a engenharia dos materiais centrou-se no desenvolvimento de superfícies anti-incrustantes e antimicrobianas, selecionando materiais de baixa aderência (Tan *et al.* 2014):

- Materiais hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), que formam superfícies hidratadas e inibem a adesão de proteínas; são cada vez mais uma escolha standard;
- Materiais muito hidrofóbicos baseados numa hierarquia de microestruturas e nanoestruturas que repelam a água e, deste modo, providenciam grande resistência contra a bio-incrustação (*biofouling*). O desenvolvimento destes materiais foi inspirado pelo estudo das estratégias adaptativas de numerosas plantas, pêlos de animais e em asas de borboletas;
- A tecnologia *Slippery Liquid Infused Porous Surfaces* (SLIPS) combina a presença de um líquido lubrificante sobre uma superfície porosa e reduz cerca de trinta e cinco vezes a formação de biofilmes por agentes patogénicos quando comparado com o PEG. Como as bactérias não conseguem ter acesso à superfície sólida, que se encontra abaixo do líquido, não há possibilidade de haver fixação na superfície, sendo facilmente removidas.

A incorporação de produtos antimicrobianos em materiais de superfícies de contacto provou ser uma opção igualmente viável (Simões *et al.* 2009). Após uma pesquisa de Zeraik & Nitschke (2010), foi demonstrado que a incorporação de surfatante tornava as superfícies mais hidrofílicas. Os dados ilustram uma diminuição na hidrofobicidade das superfícies tratadas e conseqüentemente na fixação bacteriana (Srey *et al.* 2013).

O revestimento de superfícies com prata ou com micropartículas de carbonato de cálcio (CaCO₃) revestidas com cloreto benzalcónio foi também sendo sugerida como uma estratégia de prevenção contra a fixação microbiana (Srey *et al.* 2013). No entanto, a aplicação de tais sistemas é restrita a alguns materiais e os seus custos e durabilidade de aplicação necessitam ser cuidadosamente ponderados (Van Houdt & Michiels 2010).

Um programa de controlo eficiente depende, evidentemente, de sistemas adequados de deteção de biofilmes (Van Houdt & Michiels 2010). Vários métodos são comumente utilizados nomeadamente, a convencional contagem de microrganismos totais, diferentes técnicas de microscopia e espectroscopia de impedância e medições e determinação de ATP (Van Houdt & Michiels 2010):

- A técnica Ibis, é um novo método para deteção de bactérias, baseado na composição de nucleótidos, específica de cada espécie. O tempo de deteção, é relativamente curto (menos de seis horas) e é aplicável em biofilmes (Tan *et al.* 2014);
- Para fornecer informação bioquímica acerca dos biofilmes, as técnicas de espectroscopia vibracional complementares, como a espectroscopia de Raman e a espectroscopia de infravermelhos, podem ser usadas. Estes dados bioquímicos, conduzem à identificação rápida e precisa de biofilmes em menos de uma hora (Tan *et al.* 2014);
- Os gradientes químicos em torno de um biofilme, podem ser analisados por microscopia eletroquímica de varredura, que é um sistema que permite obter uma visualização local da atividade eletroquímica da superfície através de micro-eléttodos que detetam a concentração e o estado redox de pequenos metabolitos produzidos por biofilmes. Esta técnica pode ser usada para monitorizar a presença de atividade metabólica específica de um biofilme, no cenário industrial (Tan *et al.* 2014);
- Pereira e colaboradores (2008), também desenvolveram um sensor de superfície capaz de detetar biofilmes em estados precoces de desenvolvimento. Este sensor permite detetar também a presença de produtos de limpeza em superfícies, identificar

se está biológica e quimicamente limpa e ainda permite medir a taxa de limpeza de uma superfície de contacto com alimentos (Simões *et al.* 2010).

Um design de equipamento “racional”, que minimize o fluxo laminar de um produto e facilite a limpeza, como a limpeza *in situ* (CIP), pode resultar na redução de aderência bacteriana sobre o equipamento de processamento. Conforme descrito no ponto 6, a escolha do material é igualmente essencial no controlo e formação de biofilmes (Poulsen 1999, Van Houdt & Michiels 2010).

9. Remoção e erradicação

9.1 Limpeza

Na indústria alimentar, o objetivo principal de um processo de limpeza é a remoção de resíduos resultantes do processamento de produtos alimentares. Indiretamente, a remoção destes resíduos constitui também um ponto crucial na eliminação e controlo de biofilmes (Srey *et al.* 2013, Van Houdt & Michiels 2010, Poulsen 1999).

Métodos adequados para a emulsão e remoção dos resíduos depositados sobre as superfícies de contacto são importantes para a indústria de processamento de alimentos, em virtude da sua persistência (película condicionante) facilitar a reinserção de bactérias na superfície e a formação de um novo biofilme, mesmo que as bactérias do biofilme anterior estejam mortas (Chaturongkasumrit *et al.* 2011). Se a limpeza é insuficiente o material orgânico vai permanecer, o que, conseqüentemente tornará a desinfecção pouco eficaz, pela impossibilidade do agente desinfetante não poder passar através da camada de exopolímero da matriz do biofilme (Srey *et al.* 2013, Van Houdt & Michiels 2010, Poulsen 1999). Portanto, a limpeza é o primeiro importante passo para uma higienização eficaz (Simões *et al.* 2010).

É evidente que a utilização de altas temperaturas durante a limpeza pode reduzir a força física necessária, que é exercida quer pela turbulência da água (sistema CIP), quer pela ação de fricção com dispositivos abrasivos (Srey *et al.* 2013, Simões *et al.* 2010). Na verdade, na realização de uma limpeza adequada devem considerar-se quatro fatores principais de igual importância, a ação química, a ação mecânica, a temperatura e o tempo de contacto (Lelieveld *et al.* 2005). A eficiência combinada destes quatro elementos determina o resultado final (Simões *et al.* 2010).

A ação mecânica é altamente eficaz na eliminação de biofilmes e pode ser efetuada manualmente, através da ação de esfregar ou escovar, ou mecanicamente, através do fluxo turbulento nos sistemas *Clean in Place* (CIP) (Simões *et al.* 2010, Lelieveld *et al.* 2005).

A ação química é representada pelos detergentes, cujas propriedades consistem na redução da tensão superficial da água, suspender ou emulsionar a gordura e a sujidade e ainda podem provocar a desnaturação de proteínas (Simões *et al.* 2010, Srey *et al.* 2013). Os seus principais componentes são compostos ácidos, alcalinos, tensoativos e agentes quelantes (Noronha n.d.). Em muitos casos, pode ser benéfica a utilização de dois ou mais produtos de limpeza em superfícies, em virtude do seu espectro ser mais completo e, também, em virtude de efeitos sinérgicos potenciais. Adicionalmente, a rotação de compostos é essencial para impedir a emergência de microrganismos “adaptados” (i.e. não abrangidos pelo espectro do produto) e, também, para dificultar que os microrganismos possam vir a desenvolver estratégias adaptativas a produtos continuamente usados. É sabido que a indução de stresse em microrganismos por meio de um método de limpeza pouco eficaz pode, em alguns casos, potenciar o desenvolvimento de um biofilme (Poulsen 1999).

Os operadores exercem igualmente um papel fulcral para o êxito das operações, devendo por isso serem “educados” em Boas Práticas de Fabrico (Poulsen 1999, Chaturongkasumrit *et al.* 2011). Na indústria alimentar seria aconselhável a utilização de *guidelines* como a Análise de Perigos de Pontos Críticos de Controlo (HACCP) ou a Garantia de Qualidade e Controlo (“Quality Assurance and Control”) a fim de localizar e evitar possíveis áreas de formação de biofilmes (Poulsen 1999).

9.1.1 Limpeza enzimática

Os métodos biológicos, nomeadamente o uso de enzimas, são cada vez mais considerados como medidas ecológicas de defesa contra os biofilmes. Estes elementos biológicos são biodegradáveis e de baixa toxicidade, tornando-se atrativos agentes de controlo em diferentes indústrias (Huang *et al.* 2014).

As enzimas podem ser usadas na degradação de biofilmes, no entanto, devido à heterogeneidade dos polissacarídeos extracelulares, é necessária uma mistura de atividade enzimática para que a ação ocorra de forma eficiente (Poulsen 1999). Assim, em virtude das proteínas e dos polissacarídeos constituírem grande parte da EPS dos biofilmes, para uma remoção eficaz é necessário formular os produtos para limpeza enzimática recorrendo a diversas proteases (e.g. pepsina, proteases de serinae tripsina) e glicosidasas (e.g. amilase). Também o uso de nucleases é importante, considerando o facto do DNA extracelular ser um componente importante da matriz de biofilmes. Na presença de DNase forma-se menos biomassa, resultante da diminuição do número e tamanho de micro-colónias no interior do biofilme, sendo mais facilmente erradicados. De facto a degradação do DNA extracelular por DNAases

resultou no aumento da suscetibilidade do biofilme a fatores ambientais, razão pela qual esta estratégia tem vindo a ganhar cada vez mais importância (Blackledge *et al.* 2013).

A influência do tratamento enzimático na remoção de biofilmes deve ser reavaliada sempre que se trate de uma indústria particular (Huang *et al.* 2014). Contudo a utilização de enzimas na remoção do biofilme bacteriano é ainda limitada, em parte porque não competem com os baixos preços dos produtos químicos. Além disso, a baixa acessibilidade comercial a diferentes tipos de enzimas também contribui para o uso limitado destas (Poulsen 1999).

9.1.2 Clean in Place (CIP)

Hoje em dia, o conceito *Clean in Place* (CIP) ou limpeza *in situ*, é usado mundialmente como um "padrão" de limpeza em numerosas unidades de processamento e, como tal, qualquer fracasso do CIP pode ser bastante dispendioso e potencialmente catastrófico para a saúde pública, quando há sobrevivência de microrganismos patogénicos indesejáveis (Davey *et al.* 2013).

Este processo aplica-se a situações em que a higienização dos equipamentos de processamento de alimentos é realizada sem a necessidade ou na impossibilidade da sua desmontagem e, portanto, sem possibilidade de recorrer a uma intervenção manual (abrasiva) relevante. O princípio CIP combina os benefícios da ação química dos detergentes com a ação mecânica exercida pela velocidade e turbulência de fluxo (Srey *et al.* 2013). A ação mecânica de um fluxo turbulento, *per se*, está longe de provar a sua eficácia e torna-se cada vez mais claro que a ação química é indispensável para a remoção de bactérias aderidas a superfícies (Faille *et al.* 2013).

Muitos são os fatores que podem influenciar o sucesso deste processo, incluindo a natureza da camada extracelular do biofilme, a composição química dos agentes de limpeza, assim como a sua concentração, o tempo de limpeza, a temperatura, a velocidade do fluxo, a hidrodinâmica e as características da superfície (Faille *et al.* 2013, Srey *et al.* 2013). Embora o sistema CIP não tivesse sido projetado para eliminar a formação de biofilmes, assume uma grande importância como método de higienização (Poulsen 1999).

9.2 Desinfetantes

Os agentes antimicrobianos são utilizados no processo de desinfecção, a fim de eliminar os microrganismos. O objetivo da desinfecção é o de reduzir a população de microrganismos viáveis, restantes após a limpeza, e evitar o crescimento microbiano

sobre as superfícies antes do reinício de um novo processo de produção (Srey *et al.* 2013, Simões *et al.* 2010). No entanto, a eficácia dos agentes antimicrobianos é limitada pela presença de material orgânico, incluindo gorduras, hidratos de carbono e proteínas. Portanto, agentes de limpeza como detergentes e enzimas são frequentemente combinados com desinfetantes para, sinergicamente, aumentar a eficiência da desinfecção. Relativamente à temperatura, o seu aumento afeta de forma negativa a eficácia de desinfetantes (Fouladkhah *et al.* 2013).

O desinfetante ideal deve ser eficaz, seguro, fácil de usar (Martín- Espada *et al.* 2014, Simões *et al.* 2010) e facilmente removido das superfícies pela água sem deixar resíduos tóxicos que possam afetar a segurança e as características organolépticas dos produtos finais (Simões *et al.* 2010).

A literatura demonstra que não existe uma estratégia com absoluta eficiência no controlo de biofilmes através do uso de produtos antimicrobianos convencionais (Simões *et al.* 2010). É importante notar que a maioria dos processos de desinfecção implementados baseia-se em resultados de testes com células planctónicas e que tais ensaios não imitam o comportamento de células organizadas em biofilmes, podendo ser altamente ineficazes quando aplicados no controlo dos mesmos (Simões *et al.* 2010, Fouladkhah *et al.* 2013). A elevada resistência aos desinfetantes está associada a mecanismos de grande complexidade. Tais mecanismos envolvem não só a limitação de difusão do agente desinfetante através da matriz do biofilme, mas também a expressão de fenótipos menos suscetíveis (Martín- Espada *et al.* 2014, Simões *et al.* 2010).

Existe uma vasta gama de compostos químicos adequados para a desinfecção na indústria alimentar, que podem ser divididos nos seguintes grupos (Gracey & Collins 1999, Bernardo 1995):

- Compostos Halogenados
 - Cloro e composto clorados
 - Iodo e Iodóforos
- Agentes Oxidantes
 - Peróxido de Hidrogénio
 - Ácido Peracético
- Tensioativos
 - Compostos de Amónio Quaternário (QAC)
 - Anfotéricos
- Aldeídos

- Álcoois (não são utilizados em larga escala na indústria alimentar) (Lelieveld *et al.* 2005)

Os compostos de cloro constituem a classe de desinfetantes mais amplamente usada na indústria alimentar (Lelieveld *et al.* 2005, Van Houdt & Michiels 2010). Para além de serem relativamente baratos, possuem um amplo espectro de ação. Exemplo disso é o hipoclorito de sódio (NaClO), que tem sido usado na desinfeção de superfícies e demonstrou ser um eficiente desinfetante na inativação de biofilmes. Contudo, a sua eficácia poderá estar comprometida em pH alcalino. (Srey, *et al.* 2013) (consultar o quadro 2 no Anexo 1).

O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) é um desinfetante de uso crescente na indústria alimentar, devido à sua elevada capacidade oxidante, com base na produção de radicais livres que afetam a matriz do biofilme. Além disso, este agente aparentemente pode ser usado em elevada concentração sem afetar negativamente a qualidade do produto (Srey *et al.* 2013). O H₂O₂ foi usado contra estirpes de *Vibrio* spp. em água do mar e verificou-se que era bastante eficaz na inibição de biofilmes formados pelas mesmas, apesar de mostrar ser mais ativo contra bactérias Gram-positivo (Lelieveld *et al.* 2005), facto que pode ser explicado pela presença de diferentes iões minerais na água do mar, que são essenciais para potenciar a reação do H₂O₂ contra os microrganismos (Srey *et al.* 2013).

O ácido peracético é um agente antimicrobiano ideal, devido ao seu elevado potencial de oxidação (Srey *et al.* 2013, Martín- Espada *et al.* 2014). É altamente eficaz contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, fungos e vírus e por isso tem sido usado, como desinfetante na indústria alimentar (Martín- Espada *et al.* 2014), assim como no tratamento de água (Srey *et al.* 2013).

Os compostos de amónio quaternário (QAC) estão entre os desinfetantes mais usados e têm sido exaustivamente investigados (Fouladkhah *et al.* 2013). Estes agentes combinam propriedades antimicrobianas com propriedades tensioativas e a sua ação é limitada a bactérias Gram-positivo e fungos. As suas funções passam por, diminuir a tensão superficial, inativar enzimas e desnaturar proteínas celulares. O seu mecanismo de ação consiste em alterar a permeabilidade celular, da qual resulta perda de metabolitos, degradação de enzimas e ácidos nucleicos e lise celular por enzimas autolíticas (Lelieveld *et al.* 2005) (consultar o quadro 2 no Anexo 1).

A aplicação de ozono como uma alternativa na desinfeção tem ganho interesse na indústria alimentar. Esta molécula com fortes propriedades oxidantes tem demonstrado ser eficaz contra um espectro de microrganismos bastante mais amplo

que o cloro e outros desinfetantes (Van Houdt & Michiels 2010). O ozono inativa os microrganismos pela interrupção ou quebra da parede celular, que por sua vez leva à perda do conteúdo celular. Perante este mecanismo de ação, os microrganismos não podem desenvolver resistência contra o agente desinfetante (Srey *et al.* 2013).

Após várias pesquisas, foi conclusivo que “o desinfetante mais eficaz contra células planctónicas não é necessariamente o mais ativo contra biofilmes” e além disso “o desinfetante de maior eficácia contra biofilmes mono-espécie não é necessariamente o mais ativo em relação a biofilmes multi-espécie em ambientes de processamento de alimentos” (Van Houdt & Michiels 2010). Os biofilmes são cerca de 100-1000 mais resistentes que as células planctónicas, pelo facto de possuírem um grau de resistência natural e/ ou adquirida através de troca genética, processo que lhes vai permitir sobreviver e crescer. O aumento da resistência dos biofilmes aos tratamentos convencionais aumentou a necessidade de desenvolver novas estratégias de controlo (Simões *et al.* 2010), e nesse sentido recentes estratégias foram exploradas, incluindo o uso de enzimas (assunto abordado no ponto 9.1.1), fagos (Simões *et al.* 2010, Srey *et al.* 2013, Giaouris *et al.* 2013), ultrassons (Srey *et al.* 2013, Giaouris *et al.* 2013) e óleos essenciais em bruto (Giaouris *et al.* 2013).

A técnica de ultrassons é bem conhecida e usada em vários processos industriais de alimentos nomeadamente no congelamento, corte, secagem, branqueamento e esterilização e tem sido referida também como um método de remoção eficiente de biofilmes (Srey *et al.* 2013). No entanto, em indústrias alimentares, as bactérias não são eliminadas unicamente através das atuais tecnologias de ultrassons. Assim sendo, a combinação desta técnica com outras técnicas de tratamento, como a associação com antibióticos, ozono (Srey *et al.* 2013) e preparações enzimáticas proteolíticas ou glicolíticas (Giaouris *et al.* 2013) podem melhorar a sua eficácia.

Os bacteriófagos infetam as bactérias e podem proporcionar uma abordagem natural, altamente específica, não-tóxica e viável para controlar vários microrganismos envolvidos na formação de biofilmes. Pensa-se que quando os fagos entram em contacto com o biofilme, várias interações ocorrem, dependendo da suscetibilidade das células do biofilmes e da disponibilidade de recetores. Esta tecnologia está ainda em desenvolvimento, havendo relativamente pouca informação sobre a sua ação em biofilmes. Além disso, a infeção de células em biofilmes por fagos, é extremamente condicionada pela sua composição química e por outros fatores, como a temperatura, fase de desenvolvimento e a concentração de fagos (Simões *et al.* 2010).

A descoberta de que muitas bactérias utilizam *quorum sensing* (QS) para formar biofilmes torna-o um mecanismo alvo no desenvolvimento de novas estratégias de controlo. É concebível que a inibição do QS representa uma estratégia natural antimicrobiana com impacto significativo na formação de biofilmes. Inequivocamente, uma profunda compreensão do fenómeno QS em bactérias frequentes em unidades de processamento de alimentos pode ser usado para controlar a formação de biofilmes através da identificação de produtos que afetem o QS (Simões *et al.* 2010, Giaouris *et al.* 2013).

Vários artigos descreveram a ação antimicrobiana de óleos essenciais em bruto (OE) e/ ou dos seus componentes ativos contra biofilmes. Os OE são compostos voláteis ativos, produzidos como metabolitos secundários por muitas ervas e especiarias, desempenhando um papel importante na defesa das próprias plantas. No entanto, a sua aplicação prática na desinfeção de superfícies industriais contaminadas, pode ser prejudicada pelo odor forte e característico, e também pela dificuldade da sua eliminação de forma eficiente a partir de superfícies, principalmente devido à sua natureza hidrofóbica (Giaouris *et al.* 2013).

Apesar dos biofilmes serem ubíquos na natureza, a compreensão de como estão organizados, como funcionam e como podem ser controlados, é atualmente limitada. Esta falta de compreensão pode ser atribuída à complexidade da dinâmica de formação de um biofilme e de interações entre espécies, em conjunto com uma histórica falta de tecnologia que permita elucidar tais “complexidades” (Tan *et al.* 2014). É necessário, continuar a investigar o impacto que os antimicrobianos têm nos biofilmes e como estes conseguem resistir a situações danosas que lhes são provocadas, assim como de que forma os microrganismos desenvolvem resistências e subsequentemente sobrevivem a procedimentos de controlo outrora eficazes. A descoberta de novas estratégias de controlo, de acordo com as especificações necessárias para serem utilizadas na indústria alimentar e com base em soluções biológicas de elevada atividade antimicrobiana e especificidade parecem abrir caminho para a superação da questão da resistência dos biofilmes (Simões *et al.* 2010).

Embora esteja em curso uma intensa investigação para o desenvolvimento de estratégias que visam impedir a formação de biofilmes, a complexidade que a formação, o desenvolvimento e a presença destes aglomerados de microrganismos estruturalmente organizados impõe, faz com que haja ainda um longo caminho a percorrer.

Bibliografia

Bernardo FMA (1995) "Métodos para a redução das contaminações das carcaças". Ovos e Aves. 19-27

Berk Z (2013) "Cleaning, Disinfection, Sanitation" **Food Process Engineering and Technology** 2ª Ed, 637-650

Blackledge MS, Worthington RJ, Melander C (2013) "Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms" **Current Opinion in Pharmacology** 13, 699-706

Buncic S, Sofos J (2012) "Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter" **Food Research International** 45, 641-655

Carrasco E, Morales-Rueda A, García-Gimeno RM (2012) "Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review" **Food Research International** 2ª Ed, 545-556

Chaturongkasumrit Y, Takahashi H, Keeratipibul S, Kuda T, Kimura B (2011) "The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency" **Food Control** 22, 1893-1899

Chmielewski RAN, Frank JF (2003) "Biofilm formation and control on food processing facilities" **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 2, 22-32

Chmielewski RAN, Frank JF (2006) "A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna – N rubber" **LWT - Food Science and Technology** 39(1), 11-19

Covizzi LG, Giese EC, Gomes E, Dekker RFH, Silva R (2007) "Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications" **Ciências Exatas e Tecnológicas** 28 (2), 143-160

Das T, Sehar S, Manefield M (2013) "The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development" **Environmental Microbiology Reports** 5(6), 778-786

Davey KR, Chandrakash S, O'Neill BK (2013) "A new risk analysis of Clean-In-Place milk processing" **Food Control** 29, 248-253

Faillie C, Bénézec T, Blel W, Ronse A, Ronse G, Clarisse M, Slomianny C (2013) "Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures" **Food Microbiol** 33, 149-157

Fouladkhah A, Geornaras I, Sofos JN (2013) "Biofilm formation of O157 and non- O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella typhimurium* and new port and their inactivation by sanitizers" **Jornal of Food Science** 78, No 6, 880-886

Garg N, Manchanda G, Kumar A (2014) "Bacterial quorum sensing: circuits and applications" **Antonie Van Leeuwenhoek** 105(2), 289-305

Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Mørretrø T, Habimana O, Desvaux M, Renier S, Nychas GJ (2013) "Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods" **Meat Science**

Gracey JF, Collins DS (1999) "Meat hygiene Practice" **Meat Hygiene** 10ª Ed, 223-241

Gram L, Bagge-Ravn D, Ng YY, Gymoese P, Vogel BF (2007) "Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*" **Food Control**, 10ª Ed 1165-1171

Gutiérrez D, Delgado S, Vázquez-Sánchez D, Martínez B, Cabo ML, Rodríguez A, Herrera JJ, García P (2012) "Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated Bacterial Communities on Food Industry Surfaces" **Applied and Environmental Microbiology** 78, No 24, 8547-8554

- Huang H, Ren H, Ding L, Geng J, Xu K, Zhang Y (2014) "Aging biofilm from a full-scale moving bed biofilm reactor: Characterization and enzymatic treatment study" **Bioresource Technology** 154, 122-130
- Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I(2001) "Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers" **International Journal of Food Microbiology** 3^a Ed, 367-372
- Kregiel D (2014) "Advances in Biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A review" **Food Control** 40, 32-40
- Langer S, Schropp D, Bengelsdorf FR, Othman M, Kazda M (2013) "Dynamics of biofilm formation during anaerobic digestion of organic waste" **Anaerobe** 1-8
- Lelieveld, H., Mostert, M. & Holah, J. (2005) "Pathogen resistance to sanitisers" **Handbook of hygiene control in the food industry** Woodhead Publishing Limited, 69-88
- Martín-Espada MC, D'ors A, Bartolomé MC, Pereira M, Sánchez-Fortún S (2014) "Peracetic acid disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on polystyrene surfaces and comparison between methods to measure it" **LWT - Food Science and Technology** 56, 58-61
- Miller MB, Bassler BL (2001) "Quorum Sensing in Bacteria" **Annual Review of Microbiology** 55, 165-199
- Nguyen HDN, Yang YS, Yuk HG (2014) "Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level" **LWT - Food Science and Technology** 55, 383-388
- Poulsen LV (1999) "Microbial Biofilm in Food Processing" **LWT - Food Science and Technology** 32, 321-326
- Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodehgeri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Nascimento VP (2009) "Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse" **Acta Scientiae Veterinariae** 37(3), 225-230
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW (1994) "Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems" **Applied and Environmental Microbiology** 60, 1842-1851
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2010) "A review of current and emergent biofilm control strategies" **LWT - Food Science and Technology** 43, 573-583
- Srey S, Jahid IK, Ha SD (2013) "Biofilm formation in food industries: A food safety concern" **Food Control** 31, 572-585
- Tan SYE, Chew SC, Tan SYY, Givskov M, Yang L (2014) "Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms" **Current Opinion in Biotechnology** 26, 1-6
- Trabulsi L, Alterthum F, Gompertz O, Candeia JA (1999) **Microbiologia**, 3^a Ed, Atheneu
- Van Houdt R, Michiels CW(2010) "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface" **Journal of Applied Microbiology** 109, 1117-1131
- Winkelströter LK, Teixeira FB, Silva EP, Alves VF, De Martinis EC (2013) "Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology" **Microbial Ecology**

Anexo 1

Quadro 2: Principais propriedades de alguns dos desinfetantes mais utilizados no setor alimentar (Adaptado de http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual_higienizacao_aesbuc.pdf).

| Propriedades | Compostos de Cloro | Composto de Iodo | Amónios Quaternários |
|-----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Ação contra bactérias Gram + | Bom | Bom | Bom |
| Ação contra bactérias Gram - | Bom | Bom | Mau |
| Ação contra esporos | Bom | Mau | Regular |
| Ação corrosiva | Sim | Ligeiramente | Não |
| Afetados pela dureza da água | Não | Ligeiramente | Alguns tipos |
| Irritantes para a pele | Sim | Sim para algumas pessoas | Não |
| Afetados por matéria orgânica | Muito | Um pouco | Pouco |
| Incompatível com | Fenóis, aminas, metais brandos | Amido, prata | Surfactantes aniónicos, sabão, madeira, celulose |
| Estabilidade de solução | Dissipa-se rapidamente | Dissipa-se lentamente | Estável |
| Estabilidade da solução a quente (66°) | Instável | Muito instável (usar a menos de 45°) | Estável |
| Deixam resíduos ativos | Não | Sim | Sim |
| Eficácia a pH neutro | Sim | Não | Sim |
| Custo | Baixo | Baixo | Elevado |