

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**FATORES DE RISCO QUE CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

ALINE PEREIRA DOS SANTOS

Belo Horizonte

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**FATORES DE RISCO QUE CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

Trabalho de conclusão apresentado ao curso
de pós-graduação em microbiologia da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito à obtenção do título de especialista

Aluna: Aline Pereira dos Santos

Orientador: Ricardo Souza Dias

Belo Horizonte

2018

Em especial,

Dedico este trabalho

À minha mãe Maristela,

Minha maior incentivadora, sempre presente com suas orações....

Deus permitiu que você estivesse aqui ao meu lado presenciando esta conquista

E aos verdadeiros amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por ter me ajudado em toda minha jornada acadêmica.

Aos professores que ensinaram e orientaram ao longo do curso.

Ao Ricardo Souza Dias, por todo o apoio, compreensão e carinho, sem os quais não teria concluído este projeto.

E a Deus, por ter colocado todas estas pessoas no meu caminho.

Muito obrigado!

“ A teimosia transforma as grandes barreiras em pequenos obstáculos e constrói os grandes vencedores. ”

Albertino Fernandes

RESUMO

Na indústria de laticínios os micro-organismos presentes na superfície de equipamentos e utensílios devido a resíduos que não foram removidos no processo de higienização podem formar comunidades microbianas chamadas biofilmes. Estes diminuem a vida útil do equipamento e comprometem a matéria prima, pois apresentam uma maior resistência aos processos de higienização, sendo necessário elaborar estratégias para neutralizá-los. A limpeza e a sanitização evitam a contaminação e aumentam a vida de prateleira do produto oferecido à população, evitando dessa forma, não só prejuízos financeiros para indústria e consumidores, como também problemas relacionados à saúde pública. Esse trabalho tem como objetivo caracterizar os fatores de risco que contribuem para formação do biofilme, caracterizar os micro-organismos envolvidos no processo de adesão, avaliar os agentes de limpeza e de sanitização que podem ser utilizados, as superfícies e algumas consequências que podem ocorrer com a má higienização e apresentar estratégias capazes de controlar ou eliminar focos de contaminação da linha de produção.

Palavras-chave: Biofilme, indústria de laticínios, segurança alimentar, higienização.

ABSTRACT

In the dairy industry microorganisms present on the surface of equipment and utensils due to residues that have not been removed in the sanitization process can form microbial communities called biofilms. These shorten the useful life of the equipment and compromise the raw material, since they present a greater resistance to the processes of hygiene, and it is necessary to devise strategies to neutralize them. Cleaning and sanitization prevent contamination and increase the shelf life of the product offered to the population, thereby avoiding not only financial losses for industry and consumers, but also problems related to public health. This work aims to characterize the risk factors that contribute to biofilm formation, to characterize the microorganisms involved in the adhesion process, to evaluate the cleaning and sanitizing agents that can be used, the surfaces and some consequences that can occur with the poor sanitation and present strategies able to control or eliminate foci of contamination of the production line.

Keyword: Biofilm, dairy industry, food safety, hygiene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de desenvolvimento do biofilme	15
Figura 2: A molécula sinalizadora AHL se difunde através da membrana bacteriana até células vizinhas se ligando a uma proteína receptora (ou proteína reguladora).....	17
Figura 3: Obstrução do trocador de aquecimento devido ao processo de leite com <i>pseudomonas</i> e armazenada durante 5 dias a 6,5°C.....	18
Figura 4: Equipamento de ordenha mecânica.....	19
Figura 5: Equipamento de ordenha manual.....	19
Figura 6: Limpeza e sanitização em indústria de laticínios.....	25
Figura 7: Higienização da superfície.....	25

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	10
2 - OBJETIVOS	11
2.1 Geral.....	11
2.2 Específico.....	11
3 - METODOLOGIA	12
4 - REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4.1 Indústria de Laticínios	13
4.2 Conceitos e Constituição de Biofilmes.....	13
4.3 Papel do ``quorum sensing`` no desenvolvimento do biofilme.....	15
5 - Avaliar falhas na produção, armazenamento e transporte.....	17
5.1 Identificar a formação de biofilme na planta industrial.....	18
6 - Os micro-organismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes, microbiota deteriorante e micro-organismos patogênicos.....	20
A. <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	20
B. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus sciuri</i>	20
C. <i>Streptococcus thermophilus</i>	21
D. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
E. <i>Listeria monocytogenes</i>	21
7- Micro-organismos indicadores de contaminação.....	22
8 - Pontos críticos para o desenvolvimento de biofilmes em indústria de laticínios.....	23
9 - Processos de higienização utilizados em indústria de laticínios.....	24
9.1 Métodos de higienização tradicionais utilizados pela indústria de laticínios.....	25
9.2 A dificuldade no controle de biofilme, resulta na busca de novas estratégias na indústria de laticínios.....	26
10 - Estratégias capazes de controlar, minimizar e eliminar focos de contaminação da linha de produção.....	28
11 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
12 - REFERÊNCIAS.....	31

INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades de micro-organismos que colonizam superfícies sólidas industriais em decorrência de falhas nos processos de sanitização e higienização. Trata-se de uma estratégia de colonização onde bactérias ou fungos se organizam em multicamadas sobre uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS) secretada pelas células. Este estilo de vida multicelular proporciona aos micro-organismos uma maior resistência aos processos físicos e químicos de desinfecção tornando difícil a sua remoção de tais superfícies. As indústrias de laticínios são muito susceptíveis à ocorrência de biofilme em superfícies diversas por processarem matéria-prima rica em nutrientes, equipamentos operando em contato com material fecal de animais infectados e pela não utilização da água potável levando ao comprometimento da linha de produção em consequente perdas econômicas. Não menos importante, a formação de biofilme pode comprometer a segurança e a qualidade dos alimentos pela presença de enteropatógenos e micro-organismos deteriorantes.

Células sésseis são mais resistentes aos biocidas quando comparado às células planctônicas (no geral cerca de 100 vezes) e isto diminui a eficiência dos procedimentos de higienização nas áreas de processamento de alimentos. Alguns exemplos de micro-organismos na forma de biofilme (sésseis) encontrados na indústria de laticínios são: *Pseudomonas aeruginosas*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* e *Micrococcus* spp, podendo ser considerados micro-organismos deteriorantes. Como exemplos de alguns patógenos podem-se citar: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecium*. As medidas tomadas pelas indústrias na higienização das superfícies e equipamentos visam novas alternativas para o controle de biofilmes microbianos envolvendo a utilização combinada de processos químicos como o uso de biocidas, dispersantes e floculantes de processos mecânicos e térmicos a fim de garantir a eficiência desejada.

Considerando que biofilmes representam focos de contaminação que podem comprometer não apenas a qualidade dos alimentos como também a segurança dos consumidores pela veiculação de enteropatógenos, considerando ainda as elevadas perdas econômicas do setor alimentício em especial de laticínios objetivamos

identificar os fatores de risco que contribuem para sua formação e que podem contribuir de forma efetiva para o desenvolvimento de medidas capazes de controlar, minimizar ou mesmo eliminar focos de contaminação da linha de produção.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Caracterizar os fatores de risco que contribuem para a formação de biofilme em indústrias de laticínios.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar falhas na produção, armazenamento e transporte;
- Caracterizar os micro-organismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes, microbiota deteriorante e micro-organismos patogênicos comumente encontrados;
- Apresentar e avaliar os processos de sanitização mais utilizados em indústrias de laticínios para a sua remoção;
- Apresentar estratégias capazes de controlar, minimizar ou mesmo eliminar focos de contaminação da linha de produção.

3 METODOLOGIA

Na elaboração do presente estudo a abordagem metodológica utilizada foi uma revisão bibliográfica com base nas normas recomendadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Foi realizada uma busca online de literatura científica nos bancos de dados *Scientific Electronic Library Online* (Scielo), na *Nacional Center for Biotechnology Information* (PubMed – NCBI) e no Google Acadêmico nos idiomas inglês, português e francês publicados entre os anos 2000 e 2017 para os seguintes descritores, nos referidos idiomas, “biofilme”, “indústria de laticínios”, “segurança alimentar”, “higienização” combinados ou não.

Seguindo os critérios estabelecidos, chegou-se então a seleção de 61 artigos que abordaram a temática. Todos os artigos encontrados foram pré-selecionados e em seguida, fez-se uma leitura exploratória com o objetivo de verificar se atendiam aos critérios de inclusão estabelecidos. Os artigos foram lidos na íntegra de forma a serem utilizados como referencial e marco teórico para a discussão e ampliação dos conceitos sobre o tema abordado no estudo.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Indústria de Laticínios

A indústria de laticínios é de grande importância para a economia do país e do nosso estado. A qualidade dos produtos lácteos é de fundamental importância para o sucesso da indústria (MAINARDES et al., 2010). A empresa deve assegurar que seus produtos estejam sendo distribuídos sem problemas de qualidade e com segurança (SANTOS et al., 2013). Este setor da indústria brasileira de laticínios é importante devido à produção de produtos com alto valor nutricional e a geração de emprego e renda nos meios rural e urbano (LIMA et al., 2017).

Segundo Lima et al. (2017) de acordo com os dados do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE, 2015), existem no Brasil, em 2013, seis mil trezentos e oitenta e uma indústrias de laticínios, as quais foram responsáveis pelo estabelecimento de mais de cem mil empregos formais. O setor de produtos lácteos brasileiro também é marcado pela concentração de um grande número de empresas de micro e pequeno porte, com algumas empresas de grande porte (FERREIRA et al., 2008).

A contaminação por micro-organismos tem levado ao aumento da incidência de doenças transmitidas por alimentos. Oferecendo como exemplo, *Pseudomonas* um gênero de bactéria que pode ser encontrada em indústria de laticínios. Ela pode se aderir a uma superfície de contato e levar a formação de biofilmes. Estes representam uma preocupação à indústria de laticínios, razão pela qual a segurança alimentar torna cada vez mais essencial na vida industrial (RIBEIRO et al., 2016).

4.2 Conceitos e Constituição de Biofilmes

De acordo com Balsamo et al. (2012) biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana envolta por uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), que tem como função unir as células firmemente à superfície. Essa matriz é composta de carboidratos e proteínas, não somente de DNA extracelular, detritos e de células mortas. Os micro-organismos correspondem a cerca de 10% da massa seca, enquanto a matriz corresponde a mais de 90%, podem ser formados por multicamadas de células bacterianas ou fúngicas (PEIXOTO et al., 2015). Segundo os

autores, o conceito de biofilme microbiano e o entendimento sobre sua estrutura, composição e processo de formação são fundamentais para a criação de estratégias de controle e entender os riscos que eles podem representar para a indústria.

A formação de biofilmes ocorre em virtude da adesão de micro-organismos em uma superfície de contato, a qual se fixa, constituem uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS) e logo em seguida iniciam seu desenvolvimento. Diversos fatores contribuem para o processo de adesão em uma determinada superfície, consideraremos alguns que se destacam: a genética, a virulência e a resistência dos micro-organismos, nutrição, a área e o material da superfície (KASNOWSKI et al.,2010). Depende não apenas destes fatores, mas também das forças atrativas eletrostáticas, força de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações químicas. As propriedades físicas e químicas da superfície dos equipamentos como rugosidade, hidrofobicidade e carga elétrica também estão envolvidas neste processo. Algumas características do ambiente como temperatura, tempo de exposição, concentração bacteriana e eletrólitos, valor de pH podem facilitar a adesão bacteriana (BERNARDES et al., 2012).

A figura 1 abaixo representa o desenvolvimento de um biofilme como um processo de cinco etapas (STOODLEY et al., 2002). Na primeira ocorre a ligação inicial das células bacterianas à superfície, esse processo é ainda reversível, ocorre a adesão dos micro-organismos na superfície por força de Van der Waals e atração eletrostática (KASNOWSKI et al.,2010). Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de substância polimérica extracelular (EPS) produzida pela bactéria, resultando em anexo irreversível mais firmemente aderido. A adesão produzida por EPS engloba estruturas presentes na bactéria como os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias e características da superfície (TREMBLAY et al., 2014).

Etapa três, desenvolvimento e proliferação celular. A densidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem. Micro colônias permitem a aderência de outras espécies de micro-organismos diretamente aos primários formando uma colonização secundária (STOODLEY et al.,2002). Etapa quatro os biofilmes têm sua arquitetura amadurecida apresentando alta atividade metabólica e estágio fisiológico avançado. É alcançado o equilíbrio dinâmico depois de atingir uma alta concentração celular. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade

controlam a fase de maturação e células localizadas em diferentes regiões do biofilme apresentam diferentes padrões de expressão genética (IST, 2008).

Na etapa cinco ocorre a dispersão de células em estado planctônico, que podem rapidamente dispersar e colonizar novas superfícies e formar novos focos de contaminação. Ao migrarem para outros locais estas células podem não encontrar de nutrientes ou oxigênio, dificuldade na sua difusão e diminuição do pH dando origem a um processo de morte celular junto à superfície. O processo de dispersão pode ser iniciado por diferentes fatores como distúrbios mecânicos, degradação enzimática da matriz de substância polimérica extracelular (EPS), indução de motilidade e afrouxamento da EPS (TREMBLAY et al., 2014).

A resistência a biocidas de micro-organismos presentes na forma de biofilme (sésseis) é muito maior quando comparada às células microbianas planctônicas, isto é, devido à diferença de comportamento e expressão genética entre as células. Menos de 10% dos microrganismos presentes em um sistema são constituídos por células planctônicas, estando mais de 90% na forma de biofilme. Muitos biocidas utilizados hoje em dia são mais eficazes contra bactéria planctônica, por isso, a necessidade de alterar as práticas de descontaminação incluindo biocidas capazes de eliminar biofilmes (BARDOUNIOTIS et al., 2001).

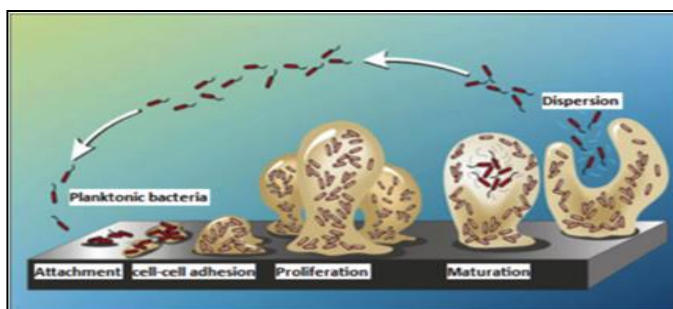


FIGURA 1. Etapas de desenvolvimento do biofilme.

Fonte: Stoodley et al, (2002)

4.3 Papel do "quorum sensing" no desenvolvimento do biofilme

"Quorum sensing" (QS) é um fenômeno que possibilita a comunicação entre células bacterianas, moléculas de sinalização extracelulares conhecidas como auto indutores são usadas como interação permitindo que as células atuem de uma forma cooperativa (BOYLE et al., 2015). Patógenos Gram negativos têm a capacidade de

produzir lactonas de N-ácil-homoserina (AHLs) como moléculas de sinal para detecção de "quorum sensing" (QS). Este mecanismo de comunicação permite a coordenação da expressão gênica, regulação da virulência e secreção de substâncias biossurfactantes que facilita a locomoção coletiva das células sobre a superfície (OLIVERO-VERBEL et al., 2014).

As bactérias Gram positivas e Gram negativas possuem meios de comunicação diferenciados, as Gram positivas utilizam oligopeptídeos para se comunicar e as Gram negativas usam como auto indutores as AHLs (SOLA et al., 2012). Os processos fisiológicos controlados por AHL ocorrem de acordo com a concentração celular, fase de crescimento e pode induzir a expressão de genes (OLIVERO-VERBEL et al., 2014). Já em bactérias Gram positivas, seu mecanismo é mediado por pequenos peptídeos sintetizados pela própria célula e encaminhados para o meio externo (SOLA et al., 2012).

A figura 2 abaixo demonstra a detecção de "quorum sensing" (QS) de bactérias individuais Gram negativas, neste esquema observa-se que a sinalização é dependente da concentração celular, a regulação é controlada pelo acúmulo de moléculas sinalizador AHL produzidas pelas células e excretadas para o meio externo pelo processo de difusão (LASARRE E FEDERLE et al., 2013). Estas moléculas acumulam no ambiente externo em quantidades proporcionais ao crescimento celular e são detectadas por meio de receptores presentes na superfície ou no interior das bactérias quando estão em alta concentração. A partir desta fase iniciam ações conjuntas como ativação de genes envolvidos na virulência e regulação do crescimento de colônias (PINTON et al., 2010).

Devido a comunicação celular de diversas espécies de micro-organismos, podemos observar que o mecanismo QS tem papel importante na biociência microbiana de alimentos, tanto na deterioração quanto na multiplicação de patógenos (LASARRE E FEDERLE et al., 2013). Diversos gêneros bacterianos são produtores de moléculas de sinalização AHLs em alimentos como leite. As bactérias psicrófilas e proteolíticas encontradas no leite cru e pasteurizadas são capazes de produzi-las, confirmando assim a participação de QS no processo de deterioração inclusive de seus derivados (SOLA et al., 2012).

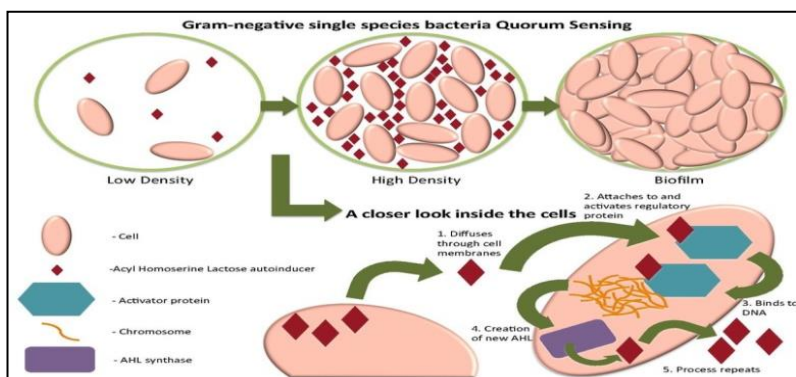


FIGURA 2. A molécula sinalizadora AHL se difunde através da membrana bacteriana até células vizinhas se ligando a uma proteína receptora (ou proteína reguladora). **Fonte:** Wikipédia (2016).

5.0 Avaliação das falhas na produção, armazenamento e transporte do leite

Produzir leite de qualidade é o objetivo de todos os fabricantes no Brasil. Leite para ser considerado de qualidade e seguro para quem consome tem que possuir as seguintes características: não ser um veículo de doenças ou bactérias patogênicas, ser livre de resíduos químicos e preservar as características de cor, gosto e cheiro, dentre outros fatores (EMBRAPA, 2011). Na fazenda cuidados como resfriamento do leite e o seu transporte a granel visam à diminuição da multiplicação de bactérias mesófilas que provocam a acidificação do produto (MIGUEL et al., 2014). Desde o momento em que o leite é ordenhado são necessários tomar devidos cuidados, pois não há como melhorar a sua qualidade depois que ele sai da propriedade rural. Por isso, toda atenção e vigilância tem que ser direcionada para o produtor, pois ele é o responsável pelo início do processo de qualidade (EMBRAPA, 2011).

Micro-organismos psicrófilos são aqueles capazes de se multiplicar em baixas temperaturas produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis que provocam alterações indesejáveis no leite e seus derivados. A contaminação pode ser devido a água de má qualidade, a deficiência na higienização, além do tempo e a temperatura em que o leite é armazenado na propriedade rural e no estabelecimento (MORSCHBACHER et al., 2017). Segundo Silva et. al, (2010) tais alterações são devidas a uma elevada contagem de micro-organismos psicrófilos devido a sua

atividade metabólica resultando em alterações bioquímicas que limitam a vida de prateleira destes produtos.

Para Nero et. al, (2009) os principais indicadores de contaminação para verificar a qualidade do leite e o seu perfil microbiológico são os aeróbios mesófilos, coliformes e psicrotófilos. Eles avaliam a qualidade desse produto principalmente pela forma de obtenção como armazenamento e transporte.

5.1 Identificação da Formação de Biofilme na Planta Industrial

A figura 3 abaixo demonstra a formação de incrustações nas superfícies dos trocadores de calor durante o processamento de leite. Isso pode causar vários problemas para indústria de laticínio como comprometimento do desempenho térmico do equipamento, na sobrecarga de bombas, necessidade de desligamento periódico para limpeza e até substituição de peças. Estas incrustações proporcionam um meio propício para adesão microbiana favorecendo a sua formação que dificulta o processo de higienização, compromete a eficiência do equipamento e a qualidade microbiológica do leite e seus derivados (MIGUEL et al.,2014).

Diversos fatores colaboram para a formação de incrustações nestas superfícies como presença de rugosidades nos trocadores de aquecimento, condições de processamento, *design* do equipamento e tensão interfacial. As superfícies de aço inox apresentam alta tensão interfacial o que facilita a adesão, as características físicas-químicas das superfícies facilitam o acúmulo de nutrientes. Devido à resistência de biofilmes aos processos de higienização é necessário realizar um planejamento para aplicação destas técnicas de higiene, levando em consideração a individualidade de cada planta industrial (MACHADO et al.,2017).

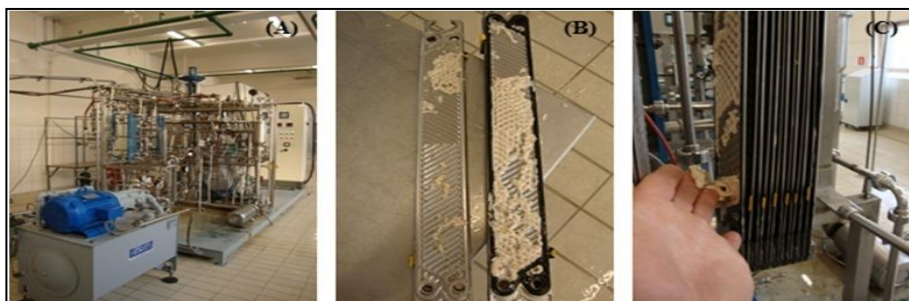


FIGURA 3. Obstrução do trocador de aquecimento devido ao processamento de leite com *Pseudomonas* e armazenada durante 5 dias a 6,5 ° C. (A) UHT Process Pilot Plant (ILVO, Bélgica), (B) permutador de calor, (C) detalhe do permutador de calor com coagulação de leite. **Fonte:** Machado et al. (2017).

Os utensílios e equipamentos da ordenha devem ser limpos corretamente, pois o leite ordenhado mecanicamente deixa resíduos nas tubulações por onde ele passa. Após sofrer algum tipo de deterioração não há como melhorar a qualidade do leite que chega à plataforma das indústrias (MENEZES et al.,2014).

Existem dois tipos de ordenha como mostra a figura 4 e 5 abaixo: manual e mecânica. Na ordenha manual é retirado pelas mãos do fazendeiro sobre o balde, ocorre em propriedades cujo número de vacas é pequeno e a produção de leite é menor. Já a ordenha mecânica o leite é retirado através de um equipamento que simula a mamada do bezerro (EMBRAPA, 2011). Em relação a sua qualidade, em princípio não há diferença entre o produto ordenhado manualmente ou mecanicamente pois a ordenha mecânica não indica necessariamente um leite mais seguro, já que suas tubulações caso não sejam higienizadas corretamente podem representar importantes fontes de contaminação (NERO et al., 2009).

Segundo Gonzaga et al., (2012) o efeito da mastite (inflamação da glândula mamária animal) é causado por micro-organismos que utilizam o canal da teta como porta de entrada em seu hospedeiro. Ocasiona um aumento da contagem de células somáticas (CCS), que está relacionado ao aumento de proteases. O aumento da atividade enzimática acelera o desenvolvimento de defeitos no leite como a rancidez e o sabor amargo (ANTUNES, 2014). Medidas simples como lavagem, secagem das tetas com papel toalha antes da ordenha, desinfecção com iodo glicerinado podem ser forma de prevenção. Alimentação adequada para vaca após a ordenha, evita que os animais venham deitar-se logo em seguida, o que poderia levar à contaminação por micro-organismos do solo pois os canais das tetas ainda se encontram abertos (GONZAGA et al., 2012).



FIGURA 4.Fonte:www.portalagropecuario.com.br
(Ordenha Mecânica)



FIGURA 5.Fonte:www.revistaagropecuaria.com.br
(Ordenha Manual)

6.0 Micro-organismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes, microbiota deteriorante e micro-organismos patogênicos.

O primeiro passo para a formação do biofilme é a adesão bacteriana às superfícies. Vários fatores afetam o processo de adesão, dentre eles, encontram-se os genotípicos, os termodinâmicos e os ambientais. Genes codificam a capacidade de micro-organismos em produzir substância polimérica extracelular (EPS) ou a presença de flagelo e fímbria que auxiliam na adesão, hidrofobicidade e carga elétrica também tem um papel importante na adesão bacteriana. O pH, temperatura, tempo e fluxo das soluções também participam (FIGUEIREDO et al., 2009). Além disso, algumas superfícies contendo fendas, válvulas e juntas tornam a higienização mais difícil, os resíduos que se acumulam nestes locais estimulam a colonização por bactérias especialmente na forma de biofilme (CLETO et al., 2012).

As bactérias patogênicas e deteriorantes podem fazer parte da composição microbiana dos biofilmes formados em superfícies industriais, esses micro-organismos podem atingir a indústria de laticínio através de várias fontes, tais como água e alimentos podendo persistir nos equipamentos por longos períodos (GUTIÉRREZ et al., 2016), dentre elas destacam-se:

A-Pseudomonas fluorescens e Pseudomonas putida

São espécies bacterianas mais comuns em plantas de processamento de laticínios, esses micro-organismos são encontrados em leite refrigerado e tem a capacidade de desenvolver sob-refrigeração e causar deterioração (CLETO et al., 2012).

B-Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus sciuri

Estas espécies podem estar presentes em uma ordenha mecânica e a contaminação do leite pode ocorrer quando entra em contato com a superfície de equipamentos ou utensílios de ordenha (ARAÚJO et al., 2010). No caso da *Pseudomonas aeruginosa* considerada um micro-organismo deteriorante pode levar a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos, tornando o produto

impróprio para o consumo (GUERREIRO et al., 2005). Já o *Staphylococcus sciuri* é classificado como um micro-organismo patogênico perigoso tanto para saúde do animal como para a qualidade do leite. Pode ser produtor de enterotoxinas e resistentes a antimicrobianos (LANGONI et al., 2015).

C- *Streptococcus thermophilus*

Segundo Gândara e Oliveira (2000) *Streptococcus thermophilus* selvagem é produtor de biofilme em superfície de aço inoxidável. Ele pode ser encontrado na superfície das placas do trocador de calor, ao aderir eles podem ser fator determinante do tempo de operação desses trocadores podendo levar a interrupção do processo de pasteurização para realização da limpeza. Este micro-organismo pode causar deterioração do leite pasteurizado e comprometer seu tempo de prateleira.

D- *Staphylococcus aureus*

O micro-organismo é capaz de produzir um grupo de toxinas proteicas que causam surtos de intoxicação alimentar em humanos. Essas toxinas são o produto da multiplicação bacteriana nos alimentos mantidos em temperaturas inadequadas (VRANJAC, 2013).

Os sintomas da intoxicação alimentar são diarreia e vômito no caso de indivíduos debilitados pode ocorrer sintomas mais graves. (LAMAITA et al., 2005). O micro-organismo pode formar biofilme em aço inoxidável levando a corrosão de equipamentos e redução da capacidade da troca de calor entre superfícies. Uma vez formado, o biofilme age como ponto de constante contaminação, liberando células de micro-organismos comprometendo assim a qualidade da matéria-prima (BOARI et al., 2009).

E- *Listeria monocytogenes*

Trata-se de um patógeno capaz de causar uma doença infecciosa sistêmica grave chamada listeriose, apresentando importante risco à saúde pública (CRUZ et al., 2008). A doença se manifesta de forma mais grave em indivíduos com sistema imunológico enfraquecido (ESPITIA et al., 2013). Esta bactéria tem a capacidade de

se adaptar a condições ambientais adversas e formar biofilmes tornando-se uma séria ameaça para a indústria de laticínios (COUGHLAN et al., 2016). Durante a produção de alimentos a *L.monocytogenes* pode se adaptar ao estresse ambiental e isso favorece sua persistência em biofilme, uma vez que as células aderidas podem ser resistentes aos processos de higienização e tornam-se mais difíceis de serem detectadas e eliminadas (RATTI et al., 2010).

Alguns dos principais fatores que favorecem o desenvolvimento do biofilme são as características físico-químicas do material sobre o qual está aderida, a expressão de fatores de virulência por parte dos micro-organismos, a produção de substância polimérica extracelular (EPS), e a síntese de adesinas (DEWES e PILETTI, 2016).

7.0 Micro-organismos indicadores de contaminação

Na indústria de laticínio o controle do processamento do leite pasteurizado e o controle da matéria-prima são processos que visam manter a qualidade nutricional do produto, livres de patógenos e microbiota deteriorante. Para a realização deste controle são pesquisados micro-organismos indicadores de condições higiênico-sanitárias podendo estar associado à presença de enteropatógenos (ATAÍDE et al., 2008). É realizada a avaliação da população de micro-organismos mesófilos, os termófilos, psicrotrófilos e os indicadores de contaminação fecal, que envolvem os coliformes (REZENDE et al., 2000). O coliforme termo – tolerante, representado pela *Escherichia coli*, é um indicador de contaminação fecal do produto, indicando o risco da presença de patógenos presentes nas fezes (PICOLI et al., 2006). Os micro-organismos mesófilos visam verificar a contaminação geral de um alimento que influencia seu tempo útil de conservação (TEBALDI et al., 2008).

Um micro-organismo indicador deve apresentar as seguintes características: ser de fácil e rápida detecção na amostra; ser identificado na presença de patógenos e não identificado na ausência dos mesmos, com exceção de números mínimos; ser facilmente diferenciado de outros membros da microbiota presente; possuir qualidades e taxas de crescimento equivalentes às dos patógenos. O principal objetivo da utilização de bactérias como indicador da falta de eficácia na higienização é revelar defeito no tratamento ou na manipulação, que levam consigo um perigo potencial (SOUSA, 2006).

Os coliformes foram utilizados como organismos indicadores, primeiro na avaliação da água para a contaminação fecal e em seguida na identificação de condições insalubres em produtos lácteos pasteurizados. Em muitos casos, a prevenção de contaminação pós-processamento (PPC) com coliformes e outros micro-organismos pode ser rastreada até a presença de biofilmes no processamento de equipamentos (MARTIN, et al 2016).

Devido a impossibilidade de se pesquisar todos os micro-organismos que podem estar presentes no produto e devido ao alto custo e à necessidade de técnicas sofisticadas, que envolvem tempo excessivo estes micro-organismos foram utilizados para esse fim são ditos indicadores (REZENDE et al., 2000). A *E. coli* tem sido utilizada como indicador fecal devido ao baixo custo e a facilidade de execução da pesquisa em alimentos (CAMPOS et al.,2006).

8.0 Pontos críticos para o desenvolvimento de biofilmes em indústrias de laticínios

Dentre os pontos críticos que contribuem para o desenvolvimento de biofilmes em indústria de laticínios destacam-se a pasteurização, uma vez que não há nenhum tratamento posterior que elimine os perigos microbiológicos incorporados. A ineficiência do tempo e da temperatura utilizadas na pasteurização é verificada pela pesquisa de duas enzimas: fosfatase alcalina e peroxidase. A fosfatase alcalina é sensível à pasteurização, e sua presença no produto final indica que o processo de pasteurização não foi eficiente. Já a peroxidase é uma enzima destruída em temperaturas superiores à da pasteurização, logo, é utilizada para verificar se ocorreu o superaquecimento durante o tratamento térmico (TAMANINI et al., 2007).

Uma das tarefas mais desafiadoras em qualquer linha de processamento da indústria de laticínios é a manutenção de condições sanitárias que é comprometida com a alta disponibilidade de nutrientes e oxigênio que favorece o crescimento microbiano. (CLETO et al.,2012).

A ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como os equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão podem ser devido a concentração inadequada das soluções de limpeza e desinfecção usadas, não respeitando a temperatura e o tempo de contato das soluções desinfetantes com as superfícies. À umidade em combinação com os resíduos de outros produtos

(açúcares, gorduras), pode causar a aderência à superfície (incrustação), especialmente se o processo de limpeza não for realizado no momento certo, favorecendo a incrustação em superfícies de equipamento e das instalações (SCHERRER E MARCON, 2016).

A higiene pessoal dos manipuladores também é um fator importante, pois, considerando que o manipulador mal informado e mal treinado poderá contribuir para a ocorrência de contaminação do alimento por micro-organismos (FARIAS et al., 2012).

O desenvolvimento de equipamentos mais complexos favorece a adesão e multiplicação de micro-organismos, contribuindo, assim, para o aumento da formação de biofilme. Superfícies de aço inoxidável podem se tornar importantes fontes de contaminação microbiana durante as etapas de processamento caso a higienização não seja realizada de uma forma adequada. Na indústria de laticínios, diversos equipamentos são compostos por aço inoxidável, como tanques de expansão, tanques para fabricação de queijo, batedeiras de manteiga, iorguteira, homogeneizadores e pasteurizadores de leite (OLIVEIRA et al., 2013).

9.0 Processos de higienização utilizados em indústria de laticínio

A higienização pode ser dividida em duas etapas, limpeza e desinfecção. A limpeza consiste na remoção de sujeiras e partículas acumuladas nas superfícies. Essa remoção se dá através de ações químicas e mecânicas, onde são utilizados detergentes específicos, água de boa qualidade, alcalinos e escovas de diversos tamanhos e formatos, assim como esponjas e raspados como demonstra na figura 6 abaixo (EMBRAPA, 2011).

Apesar da limpeza ser capaz de remover alguns dos micro-organismos presentes nas superfícies, observa-se que a maioria ainda prevalece aderida, principalmente quando os biofilmes bacterianos maduros estão presentes. A etapa inicial de limpeza é fundamental para o sucesso do processo de higienização, pois os desinfetantes tornam-se ineficazes caso o processo de higienização não seja realizado corretamente. Eles não irão penetrar na matriz do biofilme, com isso, as células sésseis viáveis não serão destruídas (OLIVEIRA et al., 2013).

Outro equipamento muito usado é a mangueira de água, que deve possuir comprimento suficiente para alcançar todas as áreas como demonstra na figura 7 abaixo. É importante que a mangueira não possua muita pressão, pois os resíduos podem ser espalhados em partes do equipamento já limpo (WEINBERGER, 2015).

A segunda etapa é a desinfecção, onde através de produtos químicos, ocorre a significativa redução de micro-organismos. O objetivo desta desinfecção é eliminar as bactérias que sobrevivem durante o processo de limpeza e se desenvolvem durante o processamento dos alimentos. Após a desinfecção, não é realizado o enxágue, apenas a drenagem (retirar o excesso de solução que pode ter ficado na tubulação). A desinfecção é especialmente requerida em superfícies úmidas, as quais oferecem condições favoráveis ao crescimento de micro-organismos (ICTA, 2013).



FIGURA 6. Fonte: www.bing.com/imagens
Limpeza e sanitização em indústria de laticínios.



FIGURA 7. Fonte: www.bing.com/imagens
Higienização da superfície.

9.1 Métodos de higienização tradicionais utilizados pela indústria de laticínios

As bactérias que residem em matrizes de biofilme são entre 100 e 1000 vezes mais resistentes aos processos de limpeza do que as células planctônicas e a maioria dos desinfetantes químicos que são utilizados em alimentos e indústrias são baseadas em estudos bactericidas realizados em células planctônicas (COUGHLAN et al., 2016). As bactérias utilizam várias estratégias para evitar a ação dos desinfetantes. A ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um aumento da resistência bacteriana. Essa resistência pode ser adquirida por obtenção de novas informações genéticas, mudança na hidrofobicidade da superfície celular e em

componentes da membrana externa das bactérias envolvidas na aderência, tais como pili e polissacarídeos e outras alterações fenotípicas (ANVISA, 2007).

Os biocidas atuam sobre os micro-organismos de diferentes modos. Alguns modificam a permeabilidade da parede celular, alterando processos vitais que permitem a sua reprodução. Outros reagem irreversivelmente com enzimas dos micro-organismos interferindo em todo o seu metabolismo, até provocar a sua morte (PERES et al., 2008).

A substância tradicionalmente mais utilizada pela indústria de laticínios no controle de micro-organismos é o cloro, tanto na forma de gás solubilizado (Cl_2) como na forma líquida de hipoclorito de sódio. Uma de suas vantagens é que não deixar sabor nos produtos se usado em concentração adequada. Mas o cloro apresenta a desvantagem de gerar subprodutos que podem diminuir sua eficiência e ser tóxicos. Além disso, o cloro é um composto oxidante e tende a provocar a incidência de processos corrosivos (PERES et al., 2008).

O peróxido de hidrogênio também apresenta uma reconhecida eficiência como bactericida. Como vantagem, apresenta menor custo em relação aos biocidas clorados, a sua aplicação é mais simples e mais segura quando comparado ao cloro. Por ser um forte oxidante, também causa corrosão de materiais (PERES et al., 2008).

Outro desinfetante utilizado é o composto de iodo, precisa de pouco tempo de contato com as superfícies e eliminam uma grande variedade de micro-organismos. Pode ser usado em combinação com agentes de limpeza ácidos. Podem ser corrosivos, sendo necessário um enxaguamento abundante com água limpa (ICTA, 2011).

Compostos de amônio quaternário apresentam uma boa capacidade de higienização e tem baixa atividade corrosiva. Não são tóxicos. Não devem ser usados em conjunto com detergentes e com agentes higienizantes aniônicos. A sua atividade contra bactéria Gram negativa é menor quando comparado à ação cloro (ICTA, 2011).

9.2 A dificuldade no controle de biofilme, resulta na busca de novas estratégias na indústria de laticínio.

A escolha da estratégia correta no controle de biofilmes microbianos em indústria de laticínios requer o conhecimento das seguintes características: sua estrutura, locais de formação, causas e consequências do seu desenvolvimento, além da

avaliação da eficácia de detergentes e sanitizantes químicos como alternativa convencional de controle (OLIVEIRA et al.,2013). Falhas no controle e o surgimento de bactérias resistentes aos processos de limpeza convencionais em fábricas de laticínios demonstra claramente que novas estratégias de controle são necessárias para manter a qualidade e segurança dos produtos lácteos (GOPAL et al., 2015).

Os óleos essenciais estão sendo pesquisados para serem utilizados no controle de biofilmes microbianos, eles possuem atividade antimicrobiana que despertam grande interesse, pois podem ser utilizados como princípios ativos de sanitizantes. Estes são metabólitos secundários de vegetais que atuam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática (OLIVEIRA et al.,2013). Estudos em ambientes industriais têm sido feitos para aperfeiçoar a concentração, o tempo de contato e a temperatura desta solução, para se obter uma maior eficiência da ação antimicrobiana. Fatores importantes como o odor residual e o custo devem sempre ser levados em consideração. Os testes realizados nas indústrias de laticínios são fundamentais para validar o processo e comprovar a real eficiência de sanitizantes a base de óleos essenciais ou seus constituintes (BERALDO et al.,2013).

Os biossurfactantes são compostos com propriedades tensoativas, produzidos por micro-organismos. A sua utilização em superfícies pode reduzir consideravelmente a contaminação microbiana de materiais e inibir ou diminuir a formação de biofilmes. As principais vantagens em relação aos detergentes sintéticos residem em sua baixa toxicidade e natureza altamente biodegradável. Por enquanto, os biossurfactantes ainda não são acessíveis do ponto de vista econômico em comparação aos compostos sintetizados quimicamente que estão disponíveis no mercado (ARAUJO et al., 2013).

A utilização de fagos como agentes antimicrobianos pode ser muito vantajosa pela sua alta especificidade, precisão e potência em comparação ao uso de biocidas, possuindo a capacidade de infectar bactérias de forma seletiva. Eles são capazes de destruir a matriz de polissacarídeo dos biofilmes, infectar células e causar uma desestruturação extensa (ALBUQUERQUE et al., 2014). Estratégias de controle para biofilmes têm sido avaliadas e usadas, porém essas medidas são caras e difíceis de serem mantidas (ALMEIDA; CASTRO, 2010).

10 Estratégias capazes de controlar, minimizar e eliminar focos de contaminação da linha de produção

Em 2005 surgiu o programa de autocontrole chamado gestão de segurança de alimento ISO 22.000, esta norma tem o objetivo de determinar requisitos para padronizar a segurança na produção de alimentos. Ela atua em toda a cadeia produtiva, desde os produtos alimentares para consumo humano, operadores de transporte e estocagem e distribuidores varejistas (PERES et al., 2017).

A ISO 22.000 tem como objetivo instruir os produtores de alimentos em como construir um sistema de segurança do alimento. Outro programa é análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) que se fundamenta na identificação dos perigos potenciais à saúde do consumidor, bem como focar nas medidas de controle das condições que geram perigo. Baseia-se em dados científicos; considerando ingredientes; processos e usos esperados dos produtos; detecta problemas que são imediatamente corrigidos; e é um plano que engloba passo a passo desde a matéria-prima até a mesa do consumidor (NETO, 2014).

O sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) evita duas ocorrências importantes na cadeia produtiva: primeiro evita que produtos finais sejam desperdiçados apenas para inspeção da qualidade, já que o controle de qualidade é realizado em todo processo; segundo, como o sistema não necessita que o produto esteja pronto para inspecionar sua qualidade, ele evita que seja produzido lote de produto com qualidade comprometida (PERES et al., 2017).

O sucesso do sistema APPCC na prevenção de doenças de origem alimentar depende da correta aplicação desses princípios, combinados que incluem as boas práticas de fabricação (BPF), os procedimentos operacionais padronizados (POP), que vão um pouco além do simples controle de higiene e são definidos como procedimentos escritos de forma objetiva, que estabelece instruções para realização de operações de rotina na produção, armazenamento e transporte de alimentos (TOBIAS et al., 2014).

Outros procedimentos para controle de biofilmes são o desenvolvimento de detergentes cáusticos e aditivos cáusticos, que contêm tensoativos, agentes emulsionantes, compostos quelantes e agentes complexos. Tradicionalmente utilizam-se os solventes baseados em cloro, uma grande variedade de desinfetantes

incluindo compostos de amônio quaternário, ácidos aniônicos, iodóforos e compostos a base de cloro, estão atualmente em uso ou sendo avaliado para o uso em sistema *Cleaning-In-Place* (CIP) limpeza automática sem a necessidade de qualquer desmontagem (MARCHAND et al., 2012).

Uma limpeza eficaz deve dividir ou dissolver a matriz de substância polimérica extracelular (EPS) associada ao biofilme para que os agentes desinfetantes possam ter acesso às células viáveis. As superfícies de contato com alimento devem ser limpas e desinfetadas diariamente, no entanto, muitas superfícies ambientais como o tanque de armazenamento e os exteriores, paredes e tetos da bomba são limpas com pouca frequência. Esta limpeza infrequente oferece a oportunidade de formação de biofilme, uma limpeza prolongada com produtos alcalinos contendo quelantes se torna eficaz para remoção de micro-organismos. A aplicação do desinfetante é essencial para inativar as células bacterianas que permanecem na superfície após a limpeza (CHMIELEWSKI E FRANK, 2003).

11 Considerações Finais

Estratégias preventivas são essenciais para evitar problemas com biofilmes durante o processamento dos produtos lácteos em indústrias. O conhecimento sobre as etapas de higienização, utilização de produtos de higiene adequados, a forma de armazenamento e o efeito sobre pessoas, equipamentos, superfícies e meio ambiente são aspectos importantes para que se tenha a obtenção de um produto que não cause prejuízos ou danos à saúde do consumidor. Outros pontos importantes a considerar é o treinamento dos funcionários, pois eles são os maiores responsáveis pela elaboração de boas práticas, treinamento e conscientização são fundamentais para o sucesso da fabricação. O foco da indústria deve ser não apenas a rentabilidade da organização, mas também o respeito aos consumidores e a proteção à saúde pública, oferecendo aos mesmos produtos que lhes garantam uma vida saudável.

12 Referências

ALBUQUERQUE, A.C.; ANDRADE, C.; NEVES, B. Biocorrosão – da integridade do biofilme à integridade do material. **Corros. Prot. Mater.** vol.33 nº. 1-2 Lisboa, mar.2014. Disponível em: <www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0870-11642014000100003>. Acesso em 10 de out 2017.

ALMEIDA, R.R.P.L.; CASTRO, C.R. Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** Vol.69 nº. 2 São Paulo 2010. Disponível em: <periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552010000200001&lng=pt&nrm=isso>. Acesso em 10 de out 2017.

ARAÚJO, E.A et al. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Quím. Nova** Vol.33 . nº 9 São Paulo 2010. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000900022>.>

ANTUNES, C.V. Uso de microfiltração para melhoria da qualidade e extensão da vida de prateleira de leite pasteurizado. **Braz. J. Food technol.** v.17, nº 1, Campinas Jan/Mar.2014. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/bjft.2014.011>>.

ANVISA, Mecanismos de resistência bacteriana. **Módulo 3.** 2007. Disponível em < www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm.../mecanismos.htm >.

ARAÚJO, V.L et al. Biossurfactantes: propriedade anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quím.Nova** vol. 36 nº6 São Paulo 2013. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019>.>

ATAÍDE, S.W et al. Avaliação microbiológica e física-química durante o processamento do leite pasteurizado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** V.67 n.1 São Paulo Ab. 2008. Disponível em < <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v67n1a10.pdf>>.

BALSAMO, C.A et al. Remoção de biofilme em canais de endoscópios: avaliação de métodos de desinfecção atualmente utilizados. **Rev.esc.enferm** vol. 46 Nº. spe São Paulo out.2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342012000700014>> Acesso em 10 out 2017.

BARDOUNIOTIS, E. et al. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. **FEMS Microbiology Letters.** 203 (2001) 263-267. Disponível em < file:///c:/users/aline/desktop/artigos%20tcc%202/artigos%20cédulas%20planctonicas%20ingles.pdf >

BERALDO, Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesq. Agropec. Trop.** vol. 43 nº4 Goiânia Oct/dec. 2013. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632013000400006>.>

BERNARDES, C.P *et al.* Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Braz. J. Microbiol** vol. 43 N^o. 4 São Paulo oct./dec. 2012. Disponível em < [http:// dx.doi.org/10.1590/s 1517-83822012000400004](http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822012000400004)> Acesso em 10 out 2017.

BOARI, C.A et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Vol. 29 n^o 4 Campinas dec. 2009. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400029>.

BOYLE, E.K *et al.* Integration of metabolic and quorum sensing signals governing the decision to cooperate in a bacterial social trait. **PLoS Comput Biol** v.11(6); 2015. jun. Disponível em < [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc /articles /pmc4477906](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4477906)> Acesso em 10 out 2017.

CAMPOS, H.R.M et al. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia Coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “ Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n.4,p.1221-1227, jul-ago, 2006. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000400027>.

CLETO, S et al. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS One** v.7 (6); Jun 28. 2012. Disponível em < [https:// www. ncbi. nlm. nih. gov / pmc /articles/pmc3386184/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3386184/)> Acesso em 10 out 2017.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. V.2; n.1, jan.2003, p.22-32.Disponível em: <[http:// onlinelibrary. wiley. com /doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x/pdf)>. Acesso em: 04 jan 2018.

COUGHLAN, M.L *et al.* New Weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (Bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Front Microbiol** .v.7; Oct 18. 2016 . Disponível em < [https:// www. ncbi. nlm. nih. gov /pmc/articles/pmc5067414/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5067414/)>Acesso em 12 out 2017.

CRUZ, D. C et al. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr., Araraquara**. V.19, n^o 2, p. 195-206, abr./jun. 2008. Disponível em < serv-bib.fcfa.unesp.br/ser/index.php/alimentos/article/.../241 >.

DELAVAL BRASIL. Produtos & Soluções. Equipamentos de ordenha. Disponível em: < [https://www.delaval.com.br/-/produtos- -soluções/](https://www.delaval.com.br/-/produtos--solucoes/)>. Acesso em 10 out 2017.

DEWES, C.D; PILETTI, R. Biofilme na indústria de alimentos e os fatores de virulência envolvidos. **Agrotec**. 3^o simpósio de agronomia e tecnologia em alimentos. Disponível em < eventos.seifai.edu.br/eventosfaidados/artigos/agrotec2016/516.docx.

EMBRAPA, 2011.Disponível em < [http : www . cnpqgl . embrapa . br / sistema produção/473142-limpeza-dos-utensilios-e-equipamento-de-ordenha](http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistema-producao/473142-limpeza-dos-utensilios-e-equipamento-de-ordenha)> .

EMBRAPA, 2011. Disponível em < [http://www.cnpqgl.embrapa.br/.../41181-limpeza-e-desinfecão-da-sala-de-ordenha](http://www.cnpqgl.embrapa.br/.../41181-limpeza-e-desinfecao-da-sala-de-ordenha)> .

ESPITIA, P.J.P et al. Packaging properties and controlo of *Listeria monocytogenes* in Bologna by cellulosic films incorporated with pediocin. **Braz. J. Food Technol.** vol 16, nº 3, Campinas July/Sept. 2013. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000028>>.

FARIAS, X. A *et al.* Princípios de higiene pessoal para manipuladores da indústria de laticínios. Engormix. Novembro/2012.

FERREIRA, M.A.M *et al.* Investigação de grupos estratégicos na indústria de laticínios por meio da abordagem multivariada. **RAM – Revista de Administração Mackenzil.** v.9, n.2, (2008), p.152-172. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-69712008000200008&script=sci_abstract&tlmg=pt. Acesso em: 12 de set de 2018.

FIGUEIREDO, M.H et al. Influência da velocidade de circulação de leite na adesão de *Pseudomonas aeruginosa* sobre o aço inoxidável. **Ciênc. Tecnol. Aliment** vol. 29 nº3 Campinas July/Sept. 2009. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300002>>.

GÂNDARA, N.L.A, OLIVEIRA, S.J. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus Thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciênc. Tecnol. Aliment** v.20, nº1 Campinas Apr.2000. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612000000100001>>.

GONZAGA, P.J et al. Qualidade do leite de uma propriedade rural no município de Olivença – **VI Colóquio Internacional** ``Educação e contemporaneidade``. 22 a 23 de setembro de 2012. Disponível em <http://educons.com.br/2012/eixo_19/pdf/24.pdf>

GOPAL, N *et al.* The prevalence and controlo of bacillus and related spore -forming bactéria in the dairy industry. **Front Microbiol** v.6; dec 21. 2015. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4685140/>>. Acesso em 12 out 2017.

GUERREIRO, K.P et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciênc. agrotec** vol. 29, nº 1, Lavras jan./Feb 2005. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000100027> >.

GUTIÉRREZ, D *et al.* Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. **Front. Microbiol** v.7; jun 8. 2016. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4897796/>> Acesso em 12 out 2017.

ICTA, 2011. Disponível em < <http://www.ufrgs.br/icta/instituto/gerencia-administrativa1/.../manual-de-higienizacao/view> >.

ICTA, 2013. Disponível em < <http://www.ufrgs.br/icta/instituto/gerencia-administrativa1/limpeza/manual-de-higienizacao> >.

IST. Grupo de Ciência Biológicas do Instituto superior técnico. Universidade técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes.** 2008. Disponível em < <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354> >.

KASNOWSKI, M.C et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** Nº. 15 – jul de 2010 – Periódicos semestral. Disponível em < <https://www.faeef.revista.inf.br/imagens.arquivos/> .

LAMAITA HC et al. Zootecnia e tecnologia e inspeção de produtos de origem animal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Vol.57, nº 5, Belo Horizonte, out.2005. Disponível < <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000500017>>.

LASARRE, B.; FEDERLE. J.M. Exploiting quórum sensing to confuse bacterial pathogens. **Microbiol Mol Biol Rev.** V.77(1); p.73-111; Mar 2013. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3591984/> > Acesso em 12 out 2017.

LIMA, P.L *et al.* A indústria de laticínios no Brasil - um estudo exploratório. **Rev.UFPR.BR.** v.35, nº 1, (2017). Disponível em: < <https://revistas.ufpr.br/alimentos/articles/view/55942>>. Acesso em: 12 de set.2018.

MACHADO, G. S. *et al.* The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Front. Microbiol** v.8, mar1. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5331058/>>. Acesso em 10 de out.2017.

MAINARDES, E. W. ; *et al.* Percepção dos conceitos de qualidade e gestão pela qualidade total: **Revista Gestão. Org**, Recife, PE, v.8, n.2, p. 279-297, Mai/Ago 2010. Disponível em: <<http://www.spell.org.br/documentos/ver/885/percepcoes-dos-conceitos-de-qualidade-e-gestao>> Acesso em: 12 set de 2018.

MARCHAND, S. et al. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** Chicago, v.11, n.2, p.133-147, mar.2012. Disponível em:<Biofilm formation in milk production and processing environments; Influence on milk quality and safety>. Acesso em 04 jan 2018.

MARTIN, H.N *et al.* The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. **Front Microbiol** v.7; sep 30. 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5043024/>> Acesso em 12 out 2017.

MENEZES, C.F.M *et al.* Microbiota e conservação do leite. **REGET-** v.18, p. 76-89, Santa Maria, mai. 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.5902/2236117013033>>. Acesso em 12 out 2017.

MIGUEL, M.E et al. Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados. **Journal of Candido Tostes Dairy Institute.** Juiz de fora, v.69, n.1, p 53-63, jan/fev, 2014. Disponível em <<https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/306/287> >.

MORSCHBACHER, V et al. Microbiological quality of refrigerated raw milk in the dairy farm and after transport to the processing dairy plant. **Arq. Inst. Biol** vol 84 São Paulo 2017. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000422016>>.

NERO, A.L et al. Microbiological quality of milk determined by production characteristics. **Ciênc. Tecnol. Aliment** vol 29 nº 2. Campinas Apr/june 2009. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200024> >.

NETO, O.A.F. Implantação do APPCC em um laticínio para implantação da ISO 22.000. **Revista on-line IPOG**. Goiânia- 8ª edição nº 009, vol.01/2014 dezembro/2014. Disponível em < www.ipoggo.com.br/.../implantacao-do-appcc-em-um-laticinio-para-implantacao-da-i.

OLIVEIRA, M.M.M et al. Biofilmes em indústrias de laticínios: Aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. **Rev. Inst. Latic.** `` Candido Tostes`` nº390, Jan/Fev, 68:65-73, 2013. Disponível em < <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/10>.

OLIVEIRA – VERBEL, J et al. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from lippia alba. **Braz. J. Microbiol.** vol. 45 nº 3 São Paulo july/sept. 2014. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000300001>.

PERES, S.A.F et al. Tratamento de águas de refrigeração com peróxido de hidrogênio. **Quím. Nova** vol.31 nº 7 São Paulo 2008. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700042>.

PERES, K.C et al. Relação do sistema análise de perigo e pontos críticos de controle com a norma ISO 22.000: estudo de caso. **Revista Espacios**. vol.38 (nº 21) pág.7. 2017. Disponível em < www.revistaespacios.com/a17v38n21/a17v38n21p07.pdf >.

PEIXOTO, R.M.M. *et al.* Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de staphylococcus spp. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v 35, nº.2, fev. 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736x2015000200001>>. Acesso em 13 out 2017.

PICOLI, N.S et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26 (11): 64-69, jan-mar.2006. Disponível em <www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000100011&script=sci-abstract&lng=pt.

PINTON, R et al. Caracterização morfocultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças. **Pesq. Agropec. Bras** vol.45 nº3 Brasília Mar. 2010. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204x2010000300008>>.

Processos de Higienização Indústria – Bing imagens. Disponível em <<https://www.bing.com/images/search?q=processos+de+higieniza%c3%a7%a3o+industria&Form=HDRSC2>>. Acesso em 10 out 2017.

RATTI, P.R et al. Elongated cells of *Listeria monocytogenes* in biofilms in the presence of sucrose and bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* A11. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol .30, nº 4. Campinas oct/dec.2010. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000400027>.

RIBEIRO, X. K *et al* . A importância da segurança alimentar em indústria de laticínios. Academia do curso de nutrição da faculdade de Atenas. **Nucl. Inic. Cien. Rev.** 2016. 9A. Disponível em [:<http://www.atenas.edu.br/.../9%20A%20importancia%20DA%20seguranca%20AL >](http://www.atenas.edu.br/.../9%20A%20importancia%20DA%20seguranca%20AL). Acesso em 12 de set de 2018.

REZENDE, M.C.N *et al*. Ocorrência de microrganismos indicadores em leite UHT (``ultra-high-temperature´´) integral. **Rev. Brás. Ciênc. vet.** V.7, n.1, p58-60, jan/abr. 2000. Disponível em < <http://www.nbcv.uff.br/rbcv/article/download/1162/1058> >.

SANTOS, F.F. *et al*. Análise da gestão da qualidade em um laticínio: um estudo de caso. **Enegep**. XXXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. v.33, Salvador, Bahia, out.2013. Disponível em <http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep2013_TN_STP_178_019_22644.pdf > . Acesso em: 12 de set.2018.

SCHERRER, V. J; MARCON, N.L. Formação de biofilme e segurança dos alimentos em serviços de alimentação. **Rev. Assoc. Bras. Nutri.** São Paulo, ano 7, nº2, p.91-99, jul-dez.2016. Disponível em < [https:// www. rasbran. com.br /rasbran /article /view /102](https://www.rasbran.com.br/rasbran/article/view/102).

SILVA, M.A.P *et al*. A qualidade do leite armazenado em produtos lácteos indústrias silos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** v.69, nº 1, São Paulo 2010. Disponível < http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v69n1_a04.pdf>.

SOUSA, P. C. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: Utilização do grupo Coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS.** v.9, n.1, p.83-88, jan/jun.2006. Disponível em < [http:// www. ufjf.br/ nates/f iles/ 2009/ 12/ seguranca.pdf](http://www.ufjf.br/nates/files/2009/12/seguranca.pdf).

SOLA, C.M et al. Mecanismos de *Quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. **Enc. Bio**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.8, n14, p1419, 2012. Disponível em < [http:// www. conhecer. org.br /enciclop /2012^a /biol%C3%B3gica /mecanismos.pdf](http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biol%C3%B3gica/mecanismos.pdf) >.

STOODLEY, P.*et al*. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu.Rev. Microbiol.** v.56, p.187-209, 2002. Disponível em:<<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>>. Acesso em 10 de out. 2017.

TAMANINI, R et al. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo ``C´´ produzido na região norte do paraná. **Semina: Ciênc. Agrár**, v.28, n.3, p.449-454. Jul/set. 2007. Disponível em < [www.uel.br /proppg /portal/ pages/ arquivos/ pesquisa/ semina/ pdf/ semina-28-3-19-13.pdf](http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina-28-3-19-13.pdf).

TEBALDI, R.M.V et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação,

ação lipolítica e proteolítica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.28 nº3 Campinas July/Sept.2008. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300036>.>

TOBIAS, W; PONSANO.G.H.E; PINTO, F.M. Elaboração e implantação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle no processamento de leite pasteurizado tipo A. **Ciência rural.** v.44, nº 9, p.1608-1614, set, 2014. Disponível em <<https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131150>>. Acesso em 10 nov. 2017.

TREMBLAY, N.D.Y; HATHROUBI, S; JACQUES, M. Les biofilms bactériens: Leur importance em santé animale et em santé publique. **Can. J. Vet. R.** v.78, nº2, p:110-116, 2014 Apr. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3962273/>>. Acesso em 10 nov.2017.

VRANJAC, A. Doenças transmitidas por água e alimentos. **Centro de vigilância epidemiológica.** 2013. Disponível em: < <http://ses.sp.bvs.br/lis/resource/20116>>.

WEINBERGER, 2015.Disponível em < <http://www.weinberger.com.br/blog/higienizacao-da-industria-de-laticinios/>.>

WIKIPEDIA. Quorum sensing of Gram negative cell.pdf. **The free encyclopedia.** Disponível em<https://em.wikipédia.org/wiki/file:Quorum_sensing_of_Gram_Negativo_cell.pdf>. Acesso em: 10 de out 2017.