

Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão

Microbial biofilms in the food industry: a review

RIALA6/1289

Maíra Maciel Mattos de OLIVEIRA^{1*}, Danilo Florisvaldo BRUGNERA¹, Roberta Hilsdorf PICCOLI¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil, Tel.: 35 3829 1392. E-mail: mmacielmattos@yahoo.com.br

Recebido: 07.09.2009 – Aceito para publicação: 28.06.2010

RESUMO

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas envoltas por uma matriz de polímeros extracelulares e aderidas a superfícies. Na indústria de alimentos, os microrganismos podem se aderir a resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, caso o processo de higienização seja aplicado incorretamente. Células sésseis, presentes no biofilme, além de reduzir a eficiência e vida útil de equipamentos, em função do fenômeno denominado corrosão microbiologicamente induzida, são mais resistentes ao processo de desinfecção. As células podem se desprender e contaminar os alimentos que passam pelo local, que causam prejuízos econômicos e risco de ocorrência de toxinfecções alimentares. A compreensão do conceito de biofilmes microbianos e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, bem como de seu processo de formação, são fundamentais para efetuar o desenvolvimento de estratégias de controle efetivas e entendimento do risco que estes representam para as indústrias de alimentos. Na presente revisão bibliográfica, estão descritos os principais aspectos de biofilmes microbianos de importância na indústria de alimentos: i) definição, estrutura e composição; ii) etapas envolvidas na formação; iii) mecanismos de resistência a antimicrobianos; iv) riscos; v) microrganismos envolvidos; vi) importância da higienização como ferramenta de controle.

Palavras-chave. aderência bacteriana, contaminação de alimentos, higiene.

ABSTRACT

Bacterial biofilms are defined as microbial communities surrounded by an extracellular matrix of polymers and adhered to surfaces. In food industry, the microorganisms can adhere to organic and inorganic waste occurring on the equipment and utensils surfaces, if the cleaning and sanitization procedures are done incorrectly. The presence of sessile cells in the biofilm reduces the efficiency and durability of equipments through the phenomenon called microbiologically induced corrosion. Additionally, they show much greater resistance to the sanitization process; the cells can be loosen and contaminate foods that pass through the place, causing economic losses and risk of occurrence of foodborne diseases. Understanding the concept, the structure and composition inherent aspects, and also the producing process of microbial biofilms, are fundamental for establishing effective control strategies and being assured on the risks that they represent to the food industry. This article reviews the crucial aspects concerned with microbial biofilms in the food industry i) definition, structure and composition; ii) steps involved in the formation; iii) mechanisms of resistance to antimicrobials; iv) risks; v) involved microorganisms; and vi) importance of hygienization as a control strategy.

Key words. microbial adhesion, food contamination, hygienization.

INTRODUÇÃO

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana sésil, caracterizada pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos em ambientes com condições adversas¹.

A presença de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos em superfícies, sobre as quais comunidades bacterianas podem se desenvolver. Biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios². Microrganismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxinfecções alimentares³.

Para fornecer ao consumidor um produto seguro, além de controlar a presença de microrganismos em alimentos, é essencial verificar e monitorar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios utilizados no processamento. Assim, é necessário um programa efetivo de limpeza e sanitização para inativar microrganismos e prevenir o acúmulo de células microbianas ou biofilmes nas superfícies⁴.

O objetivo desta revisão bibliográfica é descrever os principais aspectos, de importância na indústria de alimentos, relacionados a biofilmes microbianos: i) definição, estrutura e composição; ii) etapas envolvidas na formação; iii) mecanismos de resistência a antimicrobianos; iv) riscos; v) microrganismos envolvidos; e vi) importância da higienização como ferramenta de controle.

Biofilmes microbianos: conceito, estrutura e composição

Biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana espacial e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas nas matrizes de substâncias poliméricas extracelulares e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas⁵.

Em ambientes naturais, 95% a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento⁵. Desta forma, a forma de vida bacteriana livre ou planctônica pode ser observada, simplesmente, como um mecanismo de translocação entre superfícies⁶.

Biofilmes microbianos podem existir como agregados mais ou menos confluentes, em camadas únicas ou arquiteturas tridimensionais. Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem o fluxo de líquido e gases, a dispersão de nutrientes e o descarte de componentes⁷.

No que diz respeito à composição, observa-se que água é a fração mais significativa, podendo chegar a 97% da matriz do biofilme. Os microrganismos, por sua vez, representam somente pequena parte, frequentemente 2 a 5% da matriz do biofilme, embora excretem substâncias poliméricas que predominam na matéria orgânica da massa seca do biofilme. A matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Ainda que haja a predominância de polissacarídeos em sua composição, esta também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos⁸.

Etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos

A formação de biofilmes inicia-se com a adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície, formando o filme condicionante. Em instalações de indústrias alimentícias, resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, oriundos de produtos derivados do leite ou de carnes, são elementos importantes para formar a camada condicionante⁶. Esses resíduos, aderidos aos equipamentos e utensílios, em razão de falhas no procedimento de higienização, são fontes potenciais de contaminação.

A fixação de células livres provenientes do meio líquido nas superfícies sólidas ocorre em seguida, poucos minutos após o transporte e adsorção de substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas no meio aquoso.

Microrganismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir em alguma superfície. Embora esse processo

necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciá-lo já são descritos: pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura⁹.

Propriedades da superfície da célula, como presença de flagelo, fímbrias, pili, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula, influenciam na aderência à superfície¹⁰, que ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível¹¹.

A adesão reversível se dá pela interação inicial fraca da bactéria com o substrato. Isso envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas. Durante a adesão reversível, bactérias ainda exibem movimentos Brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de forças mínimas⁶.

A adesão irreversível resulta do ancoramento de apêndices (pili, flagelo, proteínas adesina) e/ou da produção de substâncias poliméricas extracelulares, fazendo com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam¹². A união entre apêndices da bactéria e o substrato envolve interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas. Essa união geralmente ocorre com poucas horas de contato. Vários estudos indicam que a adesão irreversível das células pode começar após 20 minutos de contato variando no máximo até 4 horas a 4-20°C^{13,14}. A remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes ou calor¹⁵. No entanto, de acordo com Oliveira et al¹⁶, há uma elevada probabilidade de que as células aderidas irreversivelmente permaneçam mesmo após a higienização, sendo essa uma das principais razões para a formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos.

Após multiplicação das bactérias presentes na estrutura do biofilme, formando microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares¹⁷, pode ocorrer, dentro de dias ou meses, a adesão de outros microrganismos presentes no meio aquoso circundante, denominados colonizadores secundários¹².

A formação do biofilme maduro ocorre de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias¹⁸. A maturidade acontece, principalmente, por meio do aumento da densidade populacional e, também,

pela pronunciada produção e deposição de polímeros extracelulares, aumentando a espessura do biofilme¹⁹.

Com o aumento da população microbiana, o ambiente torna-se anaeróbio no interior do biofilme, provocando aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis, que enfraquecem a estrutura, causando o desprendimento de células únicas ou de fragmentos¹⁰, situação que pode ocorrer após 9 a 12 dias dos eventos iniciais²⁰. No momento em que o biofilme atinge massa denominada crítica, o equilíbrio dinâmico é alcançado e a camada microbiana mais externa de sua estrutura inicia a produção de células bacterianas planctônicas²¹. O desprendimento também pode ser reflexo do fluxo do meio aquoso que passa pelo local.

Todavia, ainda que o biofilme não tenha atingido uma massa denominada crítica ou se desenvolvido completamente, microrganismos viáveis aderidos à superfície irão apresentar a habilidade de se desprender mesmo que o número de células presentes seja baixo ou variado dentro de determinada área. Esse fenômeno é denominado potencial de biotransferência e pode ser definido como a habilidade que o microrganismo presente na superfície do equipamento, antes ou após o procedimento de higienização, possui de contaminar produtos alimentícios durante o processamento²².

A contaminação de alimentos por células microbianas sésseis já foi demonstrada em diversos estudos. Recentemente, Salustiano et al²³ avaliaram a recontaminação pós-pasteurização do leite por *Bacillus cereus* utilizando ribotipagem automática. Sete ribogrupos foram identificados e um mesmo ribogrupos foi isolado de quatro superfícies e de amostras de leite, indicando que as superfícies são reservatórios desta espécie. Ravishankar et al²⁴, estudando a ocorrência de contaminação cruzada, demonstraram que *Salmonella enterica* serovar Newport, presente em carne de frango, foi capaz de contaminar a faca de aço inoxidável e a tabua de corte de polietileno, sendo, em seguida, transferida para folhas de alface. A taxa de transferência da bactéria foi maior quando nenhum tratamento de higienização foi aplicado aos utensílios.

Tanto o desprendimento de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme, como o desenvolvimento primário e a maturação, são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica, controlados por moléculas sinalizadoras, processo este denominado *quorum*

sensing. Bactérias Gram-negativas tipicamente produzem N-acil-homoserinas lactonas (AHLs) e Gram-positivas oligopeptídeos. A concentração externa destas moléculas autoindutoras aumenta em função de elevações na densidade populacional bacteriana. Bactérias são capazes de detectar a acumulação de limiares mínimos de estimulação desses autoindutores, alterando sua expressão gênica e, por conseguinte, seu comportamento. Pela utilização desse sistema de sinalização bactérias sincronizam comportamentos particulares em escala populacional, agindo como organismos multicelulares²⁵.

Hammer e Bassler²⁶ observaram que o sistema *quorum sensing* controla a síntese de exopolissacarídeos em *Vibrio cholerae*. Já Labbate et al²⁷ relatam que o *quorum sensing* controla a agregação de células na formação do biofilme por *Serratia liquefaciens*.

Mecanismos de resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos

Mecanismos de resistência proporcionam as células sésseis condições favoráveis de sobrevivência, o que as torna menos suscetíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos microrganismos sob a forma planctônica²⁸.

Vários fatores têm sido sugeridos para explicar a resistência de biofilmes a agente antimicrobianos: bactérias em biofilmes, particularmente aquelas presentes nas camadas mais internas, apresentam reduzidas taxas metabólicas e de crescimento; a matriz de polímeros extracelulares age como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme; adicionalmente, a matriz de substâncias poliméricas extracelulares pode reduzir fisicamente a penetração do agente antimicrobiano; e células em biofilme são fisiologicamente distintas de células planctônicas e expressam fatores de proteção específicos, tais como bombas de efluxo e regulons²⁹.

Além de limitar a difusão de sanitizantes, a matriz de exopolissacarídeos pode reagir e causar a inativação dos mesmos³⁰, pois sabe-se que alguns sanitizantes químicos podem ter sua ação reduzida ou mesmo eliminada na presença de compostos orgânicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Um exemplo é o hipoclorito de sódio (NaClO), muito utilizado em indústrias de alimentos, especialmente em laticínios.

A aplicação incorreta de detergentes e sanitizantes pode também ser responsável pela aquisição da resistência. Segundo Gilbert et al²⁹, isso está relacionado à utilização de doses subletais de agentes biocidas aplicadas em células em biofilmes.

A densidade bacteriana no interior do biofilme é outro fator que parece estar envolvido no aumento da resistência. Além disso, biofilmes formados por diferentes espécies, como os que são encontrados nas indústrias de alimentos, representam um maior risco, uma vez que estas podem proteger umas às outras durante a aplicação de agentes químicos. Esse fato é causado pela diferente resistência de uma respectiva espécie microbiana contra os agentes utilizados³⁰.

Impactos causados pela presença de biofilmes microbianos na indústria de alimentos

Uma vez instalados, biofilmes microbianos agem como camadas isolantes e ocasionam o processo denominado corrosão microbiologicamente induzida³¹, prejudicando a transferência de calor entre superfícies e reduzindo a vida útil dos equipamentos. Em consequência, há perdas de energia e despesas acrescidas de manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos.

No que se refere aos aspectos microbiológicos, sabe-se que, caso não haja implantação de sistemas de qualidade nas indústrias alimentícias e aplicação efetiva de agentes de limpeza e sanitizantes, microrganismos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e acúmulo de resíduos e microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes. A adesão a superfícies pode ser realizada por microrganismos deteriorantes ou patogênicos, resultando em sérios problemas de saúde pública ou de ordem econômica.

Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes

Biofilmes podem ser formados por quase todos os tipos de microrganismos sob condições favoráveis. Entretanto, nas indústrias de alimentos são as bactérias que mais frequentemente produzem biofilmes, ainda que umas apresentem maior aptidão que outras.

Dentre as bactérias deteriorantes, destacam-se: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterococcus faecium*^{32,33}. Como exemplos de bactérias patogênicas, encontram-se: *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *S. aureus* e *B. cereus*^{32,34,35}.

A investigação da composição microbiana de biofilmes, presentes em indústrias de alimentos, tem sido realizada em diversos estudos. Esses estudos revelam que os biofilmes formados são constituídos por várias espécies de microrganismos, as quais podem variar dependendo, principalmente, dos fatores intrínsecos e extrínsecos do ambiente em que se encontram. Marouani-Gadri et al³⁶, avaliando as superfícies de uma indústria de processamento de carnes, encontraram bactérias pertencentes a diversos gêneros, como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Timke et al³⁷ pesquisaram os microrganismos presentes no biofilme formado em uma planta de processamento de cervejas engarrafadas e encontraram bactérias pertencentes aos gêneros *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Luteimonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Xanthomonas* e *Citrobacter*, dentre outros.

Contudo, além da determinação das espécies existentes, o número de microrganismos presentes na superfície também é um parâmetro importante, capaz de determinar se há a formação de biofilme maduro ou somente adesão bacteriana. Segundo Andrade et al³³, para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 UFC/cm², enquanto Ronner e Wong³⁸ e Wirtanen et al³⁹ consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 e 10^3 UFC/cm², respectivamente. Entretanto, é necessário salientar que, mesmo que o número de células microbianas aderidas à superfície esteja abaixo do necessário para se considerar a formação de um biofilme maduro, já existe o risco de contaminação microbiológica do alimento a partir de microrganismos sésseis presentes na superfície.

Importância da higienização no controle de biofilmes microbianos na indústria de alimentos

Nas indústrias de alimentos, a higienização é dividida em duas etapas muito bem definidas: limpeza e

sanitização. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais⁴⁰. Após a limpeza, o número de microrganismos sobreviventes ainda é elevado, o que faz da sanitização procedimento obrigatório.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da portaria nº 15, de 23 de Agosto de 1988, define sanitizantes ou desinfetantes como formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas que apresentam efeito letal sobre microrganismos não esporulados. Os sanitizantes mais utilizados em superfícies de equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados⁴¹. A escolha do agente sanitizante depende, principalmente, do tipo de microrganismo a ser destruído, assim como da natureza do equipamento a ser sanitizado.

Os sanitizantes utilizados nas indústrias dentro das condições indicadas pelos fabricantes são aprovados em testes como os de suspensão e diluição de uso, pesquisas que utilizam bactérias planctônicas⁴. Em contrapartida, existem algumas recomendações a sanitização de superfícies industriais que levam em consideração o número de células microbianas aderidas dentro de uma determinada área. Essas exigências são mais válidas do que testes em suspensão por se referirem as células microbianas no estado sésseis. Para a *American Public Health Association* (APHA)⁴², agentes sanitizantes devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de microrganismos deteriorantes em níveis aceitáveis, como, por exemplo, 2 UFC/cm² de microrganismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização. Segundo Andrade et al⁴³, muitas vezes a recomendação americana é considerada rígida para as condições brasileiras e, por isso, alguns pesquisadores e algumas instituições admitem contagens de até 50 UFC/cm² de superfície.

Inúmeras pesquisas, baseadas na redução do número de microrganismos aderidos a superfície após tratamento com sanitizantes químicos, têm sido realizadas. Rossoni e Gayllarde⁴⁴ observaram redução do número de células de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, aderidas sobre superfície de aço inoxidável,

após tratamento com hipoclorito de sódio. Cabeça et al⁴⁵ verificaram redução do número de células de *L. monocytogenes*, aderidas sobre superfície de aço inoxidável, após tratamento com diferentes sanitizantes (iodo, biguanida, compostos quaternários de amônio, ácido peracético e hipoclorito de sódio).

Neste contexto, alternativas não convencionais de sanitização ou até mesmo novas ferramentas de controle de biofilmes também vêm sendo estudadas, tais como: ruptura da matrix de substâncias poliméricas extracelulares pela ação de enzimas⁴⁶, adsorção de um biossurfactante aniônico a superfícies para auxiliar a sanitização por agentes químicos⁴⁷, aplicação de irradiação gama⁴⁸, óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*⁴⁹ e nisina⁵⁰.

De maneira geral, para que as recomendações de qualidade microbiológica sejam alcançadas, a adoção de efetivos programas de limpeza e sanitização, bem como a utilização de matéria-prima de qualidade e a adoção de práticas higiênico-sanitárias por parte dos colaboradores, são fundamentais. Para tanto, a aplicação de ferramentas de controle de qualidade é imprescindível. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), que são pré-requisitos do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), abordam, dentre outros, os princípios básicos de higiene industrial, como: higiene de instalações, de equipamentos e de utensílios utilizados no preparo de alimentos. As BPF e os PPHO são os requisitos mínimos para a obtenção de alimentos seguros e devem ser utilizadas por todas as indústrias alimentícias que desejam produzir alimentos com esta característica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de biofilmes microbianos é de grande importância para a indústria de alimentos, uma vez que estes podem causar prejuízos econômicos ou problemas de saúde pública. Dessa forma, a compreensão do conceito de biofilmes microbianos e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, bem como de seu processo de formação, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle efetivas e entendimento do risco que estes representam as indústrias de alimentos. No que diz respeito a essas estratégias de controle, a utilização de um processo de higienização eficiente, que abranja

corretamente as etapas de limpeza e sanitização, é fundamental. Para isso, a adoção de ferramentas de controle de qualidade é imprescindível.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos da primeira autora, que possibilitou a realização do mestrado. A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318-22.
2. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001; 64 (3): 367-72.
3. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007; 68 (3): 605-12.
4. Peng JS, Tsai WC, Chou CC. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int J Food Microbiol*. 2002; 77 (1/2): 11-8.
5. Nikolaev YA, Plakunov VK. Biofilm - "city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologija*. 2007; 76 (2): 149-63.
6. Watnick P, Kolter R. Minireview: biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182 (10): 2675-9.
7. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56: 187-209.
8. Sutherland IW. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001; 9 (5): 222-7.
9. Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*. 2008; 19 (2): 178-85.

10. Trachoo N. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J Sci and Technol*. 2003; 25 (6): 807-15.
11. Mittelman MW. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J Dairy Sci*. 1998; 81(10): 2760-4.
12. Christensen BE, Characklis WG. Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis WG, Marshall KC, editores. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1990. p. 93-130.
13. Hood SK, Zottola EA. Biofilms in food processing. *Food Control*. 1995; 6 (1): 9-18.
14. Smoot LM, Pierson MD. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *J Food Prot*. 1998; 61 (10): 1293-8.
15. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol*. 2000; 17 (4): 439-47.
16. Oliveira MMM de, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz J Microbiol*. 2010; 41 (1): 97-106.
17. Malone JA, Caldwell DE. Evaluation of surface colonization kinetics in continuous culture. *Microb Ecol*. 1983; 9 (4): 299-305.
18. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*. 2000; 146 (10): 2395-407.
19. Cheng G, Zhang Z, Chen S, Bryers JD, Jiang S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials*. 2007; 28 (29): 4192-9.
20. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 2002; 184 (4): 1140-54.
21. Prosser BL, Taylor D, Dix BA, Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987; 31 (10): 1502-6.
22. Verran J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? *Food Bioprod Process*. 2002; 80 (4): 292-8.
23. Salustiano VC, Andrade NJ, Soares NFF, Lima JC, Bernardes PC, Luiz LMP, Fernandes PE. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control*. 2009; 20 (4): 439-42.
24. Ravishankar S, Zhu L, Jaroni D. Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. *Food Microbiol*. 2010; 27 (6): 791-4.
25. Waters CM, Bassler BL. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 319-46.
26. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2003; 50 (1): 101-4.
27. Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*. 2004; 186 (3): 692-8.
28. Morck DW, Olson ME, Ceri H. Microbial Biofilms: preservation, control and removal. In: Block, SS, editor. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lippincott: Williams & Wilkins; 2001. p. 675-681.
29. Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol*. 2002; 92 Suppl: 98S-110S.
30. Vidal DR, Ragot C, Thibault F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Ann Pharm Fr*. 1997; 55 (2): 49-54.
31. Mansfeld F. The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochim Acta*. 2007; 52 (27): 7670-80.
32. Leriche V, Carpentier B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *J Food Prot*. 1995; 58 (11): 1186-91.
33. Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot*. 1998; 61: 833-8.
34. Smith JL, Fratâmico PM. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. *J Food Prot*. 1995; 58 (6): 696-708.
35. Surman SB, Morton LHG, Keevil CW. Biofilms: an overview. *PHLS Microbiol Digest*. 1996; 13 (1): 33-8.
36. Marouani-Gadri N, Augier G, Carpentier B. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*. 2009; 133 (1/2): 62-7.
37. Timke M, Wang-Lieu NQ, Altendorf K, Lipski A. Community structure and diversity of biofilms from a beer bottling plant as revealed using 16S rRNA gene clone libraries. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71 (10): 6446-52.
38. Ronner AB, Wong ACL. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless-steel and buna-N rubber. *J Food Prot*. 1993; 56: 750- 8.
39. Wirtanen G, Husmark U, Mattila-Sandholm T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J Food Prot*. 1996; 59: 727-33.
40. Andrade NJ, Pinto CL de O, Rosado MS. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: Andrade NJ, editores. *Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela; 2008. p. 181-226.
41. Brasil. Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 05 set. 1988.
42. American Public Health Association (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Hanover: EPS Group Inc.; 1992.
43. Andrade NJ, Silva, RMM da, Brabes, KCS. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciênc Agrotec*. 2003; 27 (3): 590-6.

44. Rossoni EMM, Gaylard CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol*. 2000; 61 (1): 81-5.
45. Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. *Alimentos e Nutrição*. 2006; 17 (2): 121-5.
46. Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA, van Loosdrecht MC, Stewart PS. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study. *Microbiology*. 2005; 151(12): 3817-32.
47. Meylheuc T, Renault M, Bellon-Fontaine MN. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2006; 109 (1/2): 71-8.
48. Byun MW, Kim JH, Kim DH, Kim HJ, Jo C. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. *Food Microbiol*. 2007; 24 (5): 544-8.
49. Oliveira MMM de, Brugnera DF, Cardoso M das G, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. 2010; 21 (4): 549-53.
50. Cabo ML, Herrera JJ, Crespo MD, Pastoriza L. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. *Food Control*. 2009; 20 (5): 521-5.