Artigo de Revisão

BIOFILMES EM INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS: ASPECTOS GERAIS E USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO NOVA ALTERNATIVA DE CONTROLE

Biofilms in the dairy industries: general aspects and the use of essential oils as a new control alternative

*Maíra M. M. de OLIVEIRA[1]**
Danilo F. BRUGNERA[2]
Roberta H. PICCOLI[3]

RESUMO

Biofilmes são comunidades de microrganismos que podem se formar sobre superfícies industriais em decorrências de falhas no procedimento de higienização. Indústrias processadoras de leite e produtos lácteos são muito susceptíveis à formação de biofilmes por processarem matéria-prima rica em nutrientes e, geralmente, com microbiota diversa e abundante. Biofilmes microbianos representam sérios riscos para este setor, uma vez que células sésseis podem se desprender e contaminar os alimentos que passam pelo local, causando problemas de ordem econômica pela deterioração precoce dos produtos ou colocando em risco a saúde pública. Dentre as novas alternativas pesquisadas para o controle de biofilmes microbianos encontra-se a utilização de soluções sanitizantes contendo óleos essenciais ou seus constituintes. Óleos essenciais são metabólitos secundários de vegetais que apresentam ação antimicrobiana primariamente por atuar na bicamada lipídica da membrana citoplasmática. Esta revisão bibliográfica foi desenvolvida com intuito de abordar os principais aspectos inerentes a biofilmes microbianos de importância para as indústrias de laticínios, como: características gerais, locais de formação, causas e consequências do seu desenvolvimento, além da utilização de detergentes e sanitizantes químicos como alternativa convencional de controle. A utilização de óleos essenciais e seus constituintes como novas alternativas de controle foram assuntos tratados em seguida, enfatizando o mecanismo de ação antibacteriana e os estudos já desenvolvidos utilizando soluções contendo estas substâncias para o controle de biofilmes bacterianos.
Palavras-chave: Células microbianas sésseis; Superfícies industriais; Sanitizantes naturais.

ABSTRACT

Biofilms are microbial communities encountered on industrial surfaces that are formed due to failures in the hygienization procedure. Industries that process milk and milk products are very susceptible to biofilm formation because the feedstock used are rich in nutrients and usually presents a diverse and abundant microbiota. Microbial biofilms represents serious risks for this sector, since

1 Pós-doutoranda em Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: mmacielmattos@yahoo.com.br.
2 Doutorando em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail:danilobrugnera@hotmail.com.
3 Professor Associado, DCA/UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail:rhpiccoli@dca.ufla.br.
* Autor para correspondência: Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Biologia, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, Brasil. CEP 37200-000. E-mail: mmacielmattos@yahoo.com.br.

Recebido/ Received: 01/10/2012
Aprovado / Approved: 21/11/2012

sessile cells can contaminate the food that pass through the local, causing problems of economic order, by the early deterioration of the products, or putting public health in risk. Among the new research alternatives for the control of microbial biofilm is the use of sanitizers solutions containing essential oils or their constituents. Essential oils are plant secondary metabolites that exhibit antimicrobial activity by acting primarily in the lipid bilayer of the cytoplasmic membrane. This bibliographic review was developed with the aim of addressing the key aspects involved in microbial biofilms of importance to the dairy industry, such as: general characteristics, formation sites, causes and consequences of their development, and the use of chemical detergents and sanitizers as conventional control alternative. The use of essential oils and their constituents as new alternatives for biofilm control were also discussed, emphasizing the mechanism of antibacterial action and the studies already developed using solutions containing these substances for the control of bacterial biofilms.
Keywords: Microbial sessile cells; Industrial surfaces; Natural sanitizers.

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades de células microbianas que se encontram envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances, EPS*) e associadas a superfícies bióticas ou abióticas (SAUER et al., 2007). Atualmente, mais de 60 anos após o primeiro relato a respeito de biofilmes (ZOBELL, 1943), sabe-se que células sésseis constituem-se no modo de vida microbiana prevalente na natureza (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007), motivo crescente de preocupação em diversas áreas, especialmente médica e de alimentos (SIHORKAR; VYAS, 2001; MARCHAND et al., 2012).

A formação de biofilmes em plantas de processamento de leite e derivados destaca-se como problema significativo para este setor. Quando ocorre contaminação microbiológica de produtos lácteos, biofilmes microbianos presentes nas superfícies de equipamentos e utensílios são um dos principais responsáveis. Este fato é ainda mais alarmante visto que grande número de estudos tem indicado a persistência de patógenos de origem alimentar em superfícies que entram em contato com alimentos durante longos períodos de tempo, o que afeta a segurança dos produtos alimentícios (SIMÕES et al., 2010).

Em instalações de processamento de alimentos, biofilmes são formados em decorrência de falhas nos procedimentos de higienização e sua eliminação é um grande desafio, visto que os mesmos são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células planctônicas (SIMÕES et al., 2006; SIMÕES; VIEIRA, 2009). Além deste fato, a emergência de bactérias resistentes aos processos de sanitização convencionais demonstra claramente que novas estratégias de controle são necessárias (SIMÕES et al., 2010).

Neste contexto, encontram-se os óleos essenciais de plantas condimentares, aromáticas e medicinais, agentes antibacterianos naturais muito potentes (BAKKALI et al., 2008), que têm tido sua atividade antibacteriana sob biofilmes avaliada, visando à possível utilização de soluções contendo estes metabólitos secundários, ou mesmo seus constituintes, para sanitização de superfície de indústrias de alimentos.

Esta revisão bibliográfica foi desenvolvida com intuito de abordar os principais aspectos inerentes a biofilmes microbianos de importância para as indústrias de laticínios, como: características gerais, locais de formação, causas e consequências do seu desenvolvimento, além da utilização de detergentes e sanitizantes químicos como alternativa convencional de controle. A utilização de óleos essenciais e seus constituintes como novas alternativas de controle foram assuntos tratados em seguida, enfatizando o mecanismo de ação antibacteriana e os estudos já desenvolvidos utilizando soluções contendo estas substâncias para o controle de biofilmes bacterianos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Biofilmes bacterianos nas indústrias de leite e produtos lácteos

No Brasil, inúmeros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de investigar a qualidade microbiológica do leite e de produtos lácteos. De maneira geral, os resultados obtidos apontam produtos de qualidade insatisfatória (SANGALETTI et al., 2009; CERESER et al., 2011; HOOGERHEIDE; MATTIODA, 2012). De acordo com Flint et al. (1997) e Bremer et al. (2006), quando os produtos lácteos são contaminados microbiologicamente, evidências sugerem que os biofilmes formados nas superfícies dos equipamentos de processamento são os principais responsáveis.

Nas indústrias de laticínios, os biofilmes, além de conterem bactérias e EPS, contêm, também, significativa quantidade de resíduos de leite, particularmente proteínas e minerais, como o fosfato de cálcio (FLINT et al., 1997; KUMAR; ANAND, 1998; MITTELMAN, 1998; BREMER et al., 2006). Bremer et al. (2006), analisando por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a formação de biofilme na superfície de cupons de aço inoxidável, após 18 horas de contato com leite, verificaram que algumas células bacterianas encontravam-se associadas a detritos e, provavelmente, a proteínas e carboidratos.

A contaminação do leite pode se iniciar na fazenda, durante e/ou após a ordenha. Diversos fatores são responsáveis pela perda da qualidade microbiológica

nesta etapa, com destaque a ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão. Segundo Oliver et al. (2005), microrganismos podem se aderir a equipamentos de processamento de leite que entram em contato direto com contaminantes do ambiente de propriedades leiteiras, como matéria fecal ou úbere de animais infectados e, também, pela água utilizada nas ordenhadeiras mecânicas. Diversos autores mencionam que estes microrganismos podem formar biofilmes, difíceis de erradicar e que podem agir como abrigo e/ou substrato para microrganismos menos propensos à formação, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos mesmos e a posterior disseminação durante o processamento de alimentos (LOMANDER et al., 2004; MØRETRØ; LANGSRUD, 2004; LEHNER et al., 2005; LAPIDOT et al., 2006). Em estudo recente realizado por Santos et al. (2011) verificou-se que um *pool* de cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de animais com mastite foi capaz de aderir sobre a superfície de silicone e borracha, materiais utilizados em equipamentos de ordenha mecânica. Contudo, o tempo em que essas superfícies foram submetidas a regimes de higienização, que simularam um procedimento CIP (*Clean In Place*) aplicado por até 180 dias, influenciou na adesão microbiana, o processo de adesão diminuiu com o aumento do tempo do procedimento de limpeza. O estudo ainda enfatiza a necessidade da troca periódica das partes de borracha e silicone dos equipamentos de ordenha mecânica devido ao dano causado pelo uso consecutivo de agentes de limpeza.

Após a ocorrência de contaminação microbiológica, falhas no armazenamento e transporte do leite para as indústrias, como tempo e temperatura inadequadas, podem favorecer a multiplicação dos microrganismos presentes.

Por meio da matéria-prima, do ambiente, dos manipuladores e de outras fontes, os microrganismos entram na linha de produção (POMPERMAYER; GAYLARD, 2000). Uma vez dentro do ambiente de processamento de alimentos, microrganismos encontram condições favoráveis para a formação de biofilmes, como superfícies para adesão, ampla distribuição de alimentos (GIBSON et al., 1999), processamento de alimentos com produção em massa e operação de equipamentos por longo turno (LINDSAY; HOLY, 1997; BREMER et al., 2006). O processo de automação das indústrias e o desenvolvimento de equipamentos mais complexos propiciam grande número de nichos para adesão e multiplicação de microrganismos, contribuindo, assim, para o aumento da formação de biofilmes (FLINT et al., 1997; BREMER et al., 2006).

Na indústria de laticínios a contaminação do leite e produtos lácteos, após a pasteurização ocorre, principalmente, em função dos equipamentos de envase (WAAK et al., 2002; DOGAN; BOOR, 2003). Biofilmes podem se desenvolver na lateral das juntas dos equipamentos, sendo, também, fonte de contaminação dos alimentos após a pasteurização (AUSTIN; BERGERON, 1995). A contaminação do leite pasteurizado, também, pode ocorrer pela adesão de bactérias nas placas dos pasteurizadores de leite (FLINT et al., 1997). Superfícies do ambiente (pisos e paredes) podem ser fontes indiretas de contaminação, exemplos deste fato são a transferência de microrganismos aos alimentos por vetores, como o ar, pessoas e sistemas de limpeza (HOLAH, 1992; GIBSON et al., 1999).

Caso ocorram falhas no procedimento de higienização, superfícies de aço inoxidável podem se tornar importantes fontes de contaminação microbiana durante o processamento de alimentos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Na indústria de laticínios, diversos equipamentos são compostos por aço inoxidável, como tanques de expansão, tanques para fabricação de queijos, batedeiras de manteiga, iogurteiras, homogeneizadores e pasteurizadores de leite.

A formação de biofilmes em superfícies de indústrias de laticínios pode levar a sérios problemas de saúde pública e a perdas econômicas mediante a deterioração de alimentos e a danificação de equipamentos (BREMER et al., 2006). Microrganismos em biofilme catalisam reações químicas e biológicas que causam a corrosão de metais de tubulações e tanques (VIEIRA et al., 1993; MITTELMAN, 1998), processo este denominado de biocorrosão ou corrosão microbiologicamente influenciada (*Microbially Influenced Corrosion, MIC*) (BEECH; SUNNER, 2004; MANSFELD, 2007). A eficácia de transferência de calor pode ser reduzida se biofilmes se tornarem suficientemente espessos em placas de trocadores de calor e tubulações (MITTELMAN, 1998; VIEIRA et al., 1993). Em consequência, há perdas de energia e despesas acrescidas de limpeza e manutenção por meio da substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos (CHARACKLIS, 1990).

Vários são os gêneros e espécies bacterianas capazes de aderir e formar biofilmes em superfícies que entram em contato com leite ou produtos lácteos. As comunidades microbianas formadas são complexas e, geralmente, compostas por espécies bacterianas patógenas e/ou deteriorantes, tanto Gram-negativas, como Gram-positivas. Sharma; Anand (2002) verificaram a presença de bactérias em biofilmes multiespécie na superfície de diferentes segmentos das linhas de pasteurização de leite de uma planta de processamento comercial. *Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus* e *Staphylococcus* foram os principais gêneros de bactérias Gram-positivas encontradas. Já para Gram-negativos houve predominância de *Shigella, E. coli, Enterobacter aerogenes, Citrobacter, Flovobacterium* e *Proteus*. Segundo Vlková et al. (2008), em propriedades leiteiras e na indústria de laticínios biofilmes podem

consistir de bactérias patogênicas, como *E. coli, L. monocytogenes, Yersinia enterocolitica, S. aureus, Salmonella* spp. e *B. cereus*. Cleto et al. (2012) verificaram a presença de bactérias nas superfícies de um laticínio após o procedimento de sanitização. Foram amostrados locais como as superfícies do pasteurizador e do tanque de expansão, obtendo-se predominância dos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp. e das espécies *Staphylococcus sciuri* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

Higienização nas indústrias de leite e produtos lácteos

Na cadeia de produção de alimentos há correlação positiva entre falhas nos procedimentos de higiene e formação de biofilmes microbianos, pois, havendo condições, as células aderidas evoluem para microcolônias e, posteriormente, ao biofilme maduro (ZOTTOLA, 1994). Desta forma, é de extrema importância a higienização dos equipamentos de processamento levando em consideração tanto a composição orgânica e inorgânica dos depósitos como também a microbiota constitutiva da superfície (FLINT et al., 1997; MITTELMAN, 1998). Atualmente, verifica-se que melhorias na limpeza e sanitização têm ajudado a reduzir a persistência dessas bactérias, que são mais resistentes a processos físicos e agentes químicos do que suas respectivas formas planctônicas (ANNOUS et al., 2009).

A higienização inclui as etapas de limpeza e sanitização das superfícies de alimentos, ambientes de processamento, equipamentos, utensílios, manipuladores e ar de ambientes de processamento. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos, principalmente, por carboidratos, proteínas, gorduras e minerais (ANDRADE et al., 2008). Apesar da etapa de limpeza ser capaz de remover alguns dos microrganismos presentes na superfície, observa-se que a maioria ainda permanece aderida, principalmente quando biofilmes bacterianos maduros estão presentes. Além disso, geralmente, sanitizantes não agem em resíduos de matéria orgânica e inorgânica, que permanecem na superfície após processos de limpeza realizados incorretamente, e não penetram na matriz do biofilme, não sendo capazes de destruir totalmente as células sésseis viáveis (SIMÕES et al., 2006), o que torna a etapa inicial de limpeza fundamental para o sucesso do processo de higienização. Segundo Kumar; Anand (1998), proteínas do leite, as quais se ligam às superfícies das indústrias de processamento de alimentos, usualmente condicionam as superfícies para sedimentação e adesão das células microbianas.

Com a sanitização objetiva-se eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes para níveis considerados seguros. Os sanitizantes químicos mais utilizados em superfícies de equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, como o cloreto de alquildimetilbenzil amônio; compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, como o hipoclorito de sódio e de cálcio; compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, como o dicloroisocianurato de sódio; peróxido orgânico (ácido peracético); peróxido inorgânico (peróxido de hidrogênio); iodo e seus derivados (ANDRADE et al., 2008; ANVISA, 1988, 1993, 1999).

Óleos essenciais e seus constituintes: novas alternativas para o controle de biofilmes bacterianos

Óleos essenciais são compostos naturais voláteis e complexos, caracterizados por forte odor e formados pelas plantas aromáticas como metabólitos secundários. São líquidos, límpidos e raramente coloridos, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos, apresentando densidade, geralmente, menor que a da água. Podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, cascas; e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Esses compostos têm sido amplamente utilizados, em função de suas propriedades já observadas na natureza, como atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida. Aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, agronômica, de alimentos, sanitária, de cosméticos e perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

Os componentes dos óleos essenciais incluem essencialmente dois grupos de origem biossintética distinta. O grupo principal é composto pelos terpenos e o outro por fenilpropanoides (CROTEAU et al., 2000; BOWLES, 2003; BAKKALI et al., 2008).

A interação inicial entre os componentes dos óleos essenciais e a célula microbiana parece ser a difusão passiva da molécula componente por meio da parede celular de bactérias Gram-positivas e fungos ou membrana externa de bactérias Gram-negativas (HAMMER; CARSON, 2011). Contudo, também pode ocorrer interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias Gram-negativas, conforme demonstrado recentemente por La Storia et al. (2011), que utilizaram carvacrol contra diferentes espécies bacterianas. Óleos essenciais são compostos tipicamente lipófilos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento da permeabilidade por danificar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (BAKKALI et al., 2008). O aumento da fluidez da membrana parece estar

entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento com óleos essenciais. A expansão e aumento da fluidez da membrana citoplasmática podem levar àquebra da integridade com consequente perda de pequenos componentes intracelulares, como hidrogênio, potássio e sódio. A perda destes íons está associada ao decréscimo do potencial de membrana, pH intracelular e pool de ATP, causado pelo dano ao gradiente de íons que ocorre entre o interior e exterior da célula. Concentrações elevadas de óleos essenciais ou longos tempos de exposição podem acarretar danos maiores à membrana citoplasmática, ocasionando perda de macromoléculas, como DNA e proteínas, fator estritamente relacionado à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais é uma característica importante destes compostos que já foi relatada *in vitro* inúmeras vezes (OUSSALAH et al., 2007; TRAJANO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Assim, devido ao chamado "consumismo verde", caracterizado pelo apelo por parte dos consumidores para redução da utilização de conservantes químicos, e a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos visando sanar o problema de resistência as alternativas convencionais, estudos vêm sendo realizados sobre o emprego de óleos essenciais no controle microbiano em alimentos (SOLOMAKOS et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Utilização ainda mais recente, que também corrobora com a necessidade do desenvolvimento de antimicrobianos naturais, é a utilização de óleos essenciais no controle de biofilmes.

Apesar de ser uma linha de pesquisa relativamente nova, na literatura internacional se observam alguns estudos sobre o efeito antibiofilme de óleos essenciais com foco para o uso em indústrias de alimentos. Nos estudos realizados até o momento os biofilmes bacterianos são desenvolvidos em superfícies de cupons, sendo utilizado predominantemente o aço inoxidável. Soluções contendo óleos essenciais e seus constituintes são, então, aplicadas em diferentes tempos de contato e temperatura e as células viáveis remanescentes são amostradas, geralmente através de *swabs*, e enumeradas por técnica de plaqueamento apropriada. Para elaboração das soluções sanitizantes é importante a utilização de um composto que auxilie a dissolução do óleo essencial ou do constituinte, como etanol e Tween 80. Geralmente, estudos iniciais são realizados para verificar se os óleos essenciais ou constituintes testados apresentam efeito contra as células bacterianas planctônicas e somente após a comprovação desta propriedade os mesmos são aplicados em biofilmes (LEBERT et al., 2007; CHORIANOPOULOS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; AMALARADJOU; VENKITANARAYANAN, 2011; MILLEZI et al., 2012; VALERIANO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012a, 2012b).

Lebert et al. (2007), em um dos primeiros estudos realizados com enfoque para a área industrial, constataram efeito significativo do óleo essencial de *Satureja thymbra* na redução do número de células dos biofilmes monoespécie e multiespécie de *Pseudomonas fragi, E. coli, S. aureus, L. monocytogenes, Staphylococcus equorum, Staphylococcus succinus* e *Lactobacillus sakei*. Já Chorianopoulos et al. (2008) verificaram que o óleo essencial e o hidrolato de *S. thymbra* possuem efeito contra os biofilmes monoespécies e multiespécies de *Staphylococcus simulans, Lactobacillus fermentum, Pseudomonas putida, Salmonella enterica* e *L. monocytogenes*. Oliveira et al. (2010), por sua vez, constataram que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus e Cymbopogon nardus*, sozinhos e em combinação, são novas alternativas para a sanitização de superfícies industriais de aço inoxidável contaminadas por *L. monocytogenes*. Em estudo realizado por Amalaradjou e Venkitanarayanan (2011) o biofilme de *Cronobacter sakazakii*, formado sobre superfícies abióticas, foi inibido e inativado por trans-cinamaldeído. Millezi et al. (2012), investigando a susceptibilidade de biofilmes formados por *S. aureus* e *E. coli* aos óleos essenciais de *C. nardus* e *Citrus limonia*, verificaram que os mesmos são alternativas promissoras para a sanitização de superfícies industriais de polipropileno. Valeriano et al. (2012) observaram que soluções contendo os óleos essenciais de *C. citratus* e *Mentha piperitaa* presentaram efeito contra o biofilme de *Salmonella* Enteritidis formado sobre o aço inoxidável.

Recentemente, Oliveira et al. (2012a) verificaram que os óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* e *Cinnamomum cassia* podem ser novas alternativas para o controle dos biofilmes formados por *L. monocytogenes* e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Assim, de maneira sequencial, novo estudo foi realizado e Oliveira et al. (2012b) verificaram que o óleo essencial de *C.cassia,* bem como seu constituinte majoritário cinamaldeído, apresentaram efeito antibacteriano contra os biofilmes monoespécie e multiespécie de *L. monocytogenes* e EPEC na presença de alto conteúdo de matéria orgânica representada por leite integral reconstituído. O efeito das soluções de óleo essencial e de cinamaldeído não diferiu do apresentado pelos sanitizantes químicos peróxido de hidrogênio e quaternário de amônio e se mostrou superior ao do hipoclorito de sódio.

De uma maneira geral, a utilização de soluções contendo óleos essenciais ou seus constituintes para sanitização de superfícies não irá alterar significativamente a rotina usual de higienização das indústrias de alimentos. Parâmetros tais como tempo de contato e temperatura devem ser ajustados para que o agente antibacteriano (óleo essencial ou constituinte) seja aplicado na menor concentração possível. Concentrações baixas e efetivas de óleos essenciais ou constituintes serão facilmente removidas após o procedimento de higiene e não irão causar problemas de odores residuais. Um enxágüe final sob pressão com água contendo um composto surfactante e utilizando temperaturas entre 40 e 50 °C deve ser suficiente para

remoção de óleos essenciais e seus constituintes, mas mais estudos devem ser feitos em condições industriais para suportar esta afirmação (OLIVEIRA et al. 2012b).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos trabalhos consultados, tornam-se evidentes os prejuízos e riscos que biofilmes microbianos podem ocasionar às indústrias de laticínios, bem como aos consumidores. O estudo de novas alternativas de controle de biofilmes microbianos é uma linha de pesquisa relativamente nova e em expansão. Dentre as opções mais recentemente propostas encontram-se os óleos essenciais e seus constituintes, alternativas promissoras para a elaboração de soluções sanitizantes naturais. Trabalhos encontrados na literatura indicam como que os óleos essenciais dos gêneros *Cymbopogon* e *Cinnamomum* e da espécie *Satureja thymbra* e o constituinte cinamaldeído se destacam em termos de atividade antibiofilme. Neste contexto, mais estudos devem ser realizados para selecionar os óleos essenciais e constituintes mais efetivos contra as cepas bacterianas resistentes a sanitizantes químicos isoladas de plantas de processamento de leite e derivados localizadas no Brasil. Por fim, estudos que busquem otimizar a concentração, o tempo de contato e a temperatura destas soluções devem ser conduzidos, com intuito de obter uma maior eficiência da ação antimicrobiana. Fatores importantes como o odor residual das soluções sanitizantes e o custo das mesmas devem ser sempre levados em consideração. Futuramente, testes em indústrias de laticínios também serão fundamentais para validar o processo e comprovar a real eficiência de sanitizantes a base de óleos essenciais ou seus constituintes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMALARADJOU,M.A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of *trans*cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 2, p. 200-208, 2011.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. de O.; ROSADO, M. S.. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. (Ed.). **Higiene na indústria de alimentos:** avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008. p. 181-226.

ANNOUS, B. A.; FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 1, p. R24-R37, 2009.

AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 62, n. 3, p. 509-519, 1995.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 3, p. 181-186, 2004.

BOWLES, E. J. **The chemistry of aromatherapeutic oils**. 3 ed. Sydney: Allen & Unwin Academic, 2004. 256 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n. 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm>. Acesso em: 5 mar. 2011.

_____. Portaria n. 122/DTN, de 29 de novembro de 1993. Inclui na Portaria nº 15, de 23/08/88, sub anexo 1, alínea I, o princípio ativo ÁCIDO PERACÉTICO, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 131, n. 228, p. 18255, dez. 1993. Seção 1.

_____. Resolução n. 211, de 18 de junho de 1999. Altera o texto do subitem 3 do item IV da Portaria 15 de 23 de agosto de 1988, que passa a ter a seguinte redação: "desinfetantes para indústrias em superfícies onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, podendo utilizar, exclusivamente, os princípios ativos dos grupos C, D, E, F e H do SUBANEXO 1 e também a substância PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO". **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 136, n. 116-E, p. 34, jun. 1999. Seção 1.

BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

CERESER, N. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 149-155, 2011.

CHARACKLIS, W. G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Ed.). **Biofilms**. New York: J. Wiley, 1990. p. 55-89.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Malden, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, 2008.

CLETO, S. et al. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, e40189, 2012.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant: description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 81-97, 1997.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 87, p. 41-48, 1999.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley, 2011. p. 255-306.

HOLAH, J. T. Industrial monitoring: hygiene in food processing. In: MELO, L. F. et al. (Ed.). **Biofilms:** science and technology. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. p. 645-659.

HOOGERHEIDE, S. L.; MATTIODA, F. Qualidade bacteriológica do leite cru refrigerado em propriedades rurais do estado do Paraná**. Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes,** v. 67, n. 385, p. 58-63, 2012.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, 1998.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 2, p. 164-172, 2011.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 229-233, 2006.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 3, p. 281-287, 2007.

LEHNER, A. et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.

LINDSAY, D.; HOLY, A. von. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, London, v. 14, n. 4, p. 383-390, 1997.

LOMANDER, A. et al. Evaluation of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. **Bioresources Technology**, Raleigh, v. 94, n. 3, p. 275-283, 2004.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.

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, 2012.

MILLEZI, A. F. M. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, Malden, v. 32, n. 3, p. 351-359, 2012.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 81, n. 10, p. 2760-2764, 1998.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in

food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 107-121, 2004.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm: "City of Microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, New York, v. 76, n. 2, p. 125-138, 2007.

OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, Melbourne, v. 90, n. 4, p. 809-818, 2012a.

OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. **European Food Research and Technology**, *Berlin, v.* 234, n. 5, p. 821–832, 2012b.

OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTOS, A. L. et al. Effect of cleaning treatment on adhesion of *Streptococcus agalactiae* to milking machine surfaces. **Food and Bioprocess Technology**, Dublin v.4, n.6, p.1-5, 2011. doi: 10.1007/s11947-011-0665-9.

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry: a case. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 6/7, p. 469-477, 2002.

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 18, n. 9, p. 1254-1427, 2001.

SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 84, n. 4, p. 338-345, 2006.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In: _____. **Proceedings of the international conference processes in biofilms:** fundamentals to applications. Davis: CRC, 2009. p. 58-62.

SOLOMAKOS, N. et al. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 120-127, 2008.

SOUZA, E. L. de et al. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 387-393, 2009.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VALERIANO, C. et al. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella* enterica serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 673-677, 2012.

VIEIRA, M. J.; MELO, L.; PINHEIRO, M. M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 67-80, 1993.

VLKOVÁ, H. et al. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms: a review.

Czech Journal of Food Sciences, Praha, v. 26, n. 5, p. 309-323, 2008.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, 2002.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 39-56, 1943.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.