

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas

Eliane Gama Lucchesi
Bióloga

Orientadora: Prof^a. Dra. Ângela Maria Moraes

Co-Orientadora: Dra. Sílvia Yuko Eguchi

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Campinas – São Paulo

Julho/2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

L963d Lucchesi, Eliane Gama
Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas / Eliane Gama Lucchesi.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadores: Ângela Maria Moraes, Silvia Yuko Eguchi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biofilme. 2. Microorganismos – Efeitos dos
antibióticos. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. I.
Moraes, Ângela Maria. II. Eguchi, Silvia Yuko. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Development of system for in vitro biofilm formation and
evaluation of its susceptibility to biocides

Palavras-chave em Inglês: Biofilm, Biocide, Susceptibility assay, MBECTM
device, Glass beads, Glass spheres

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

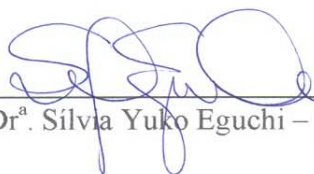
Banca examinadora: Fumio Yokoya, Maria da Graça Stupiello Andrietta e
Claudia Steckelberg

Data da defesa: 23/06/2006

Dissertação de Mestrado defendida por Eliane Gama Lucchesi e aprovada em 23 de junho de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr.ª Angela Maria Moraes - Orientadora



Dr.ª Silvia Yuko Eguchi – Co-orientadora



Dra. Claudia Steckelberg



Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta



Dr. Fumio Yokoya

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, defendida por Eliane Gama Lucchesi, e aprovada pela comissão julgadora, em junho de 2006.



Orientadora - Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes



Co-orientadora - Dra. Silvia Yuko Eguchi

*“Não corra demasiadamente,
as melhores coisas chegam
quando menos se espera”*

Autor desconhecido

*A meu marido, Nelson,
pelo amor, carinho,
e paciência.*

Agradecimentos

A Deus por me conceder a dádiva de viver.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, Emilia, meu pai, Antonio, minha irmã, Bety, meu cunhado, Armando e meu sobrinho, Guilherme, pelo carinho e por não terem me deixado desistir nas horas mais difíceis.

A minha orientadora Prof^a Dra. Ângela Maria Moraes e co-orientadora Dra. Sílvia Yuko Eguchi, pela oportunidade, paciência, ensinamento e apoio recebido durante este tempo.

Ao Sr. Walter Piccirillo Pinto, Diretor Presidente da IPEL - Itibanyl Produtos Especiais Ltda., por incentivar o meu crescimento profissional, e por permitir e financiar a realização do presente trabalho.

Ao Sr. Roberto Marcio Dacorso, pela amizade e as sábias palavras de carinho e incentivo, nos momentos que mais precisei.

Ao Sr. Walter Oliveira, pelas orientações e sugestões.

Ao Sr. Ademar Shimabukuro, cujo conhecimento e experiência foram fundamentais no contato com as empresas colaboradoras e condução do estudo em campo.

Ao Giovanni Caritá Jr., por viabilizar todos os ensaios físico-químicos dos biocidas.

À Raquel Vannucci Capelletti, parceira na obtenção dos resultados do dispositivo MBECTM, por me apoiar nos obstáculos e incentivar nas horas mais difíceis..

Ao corpo técnico dos Laboratórios da IPEL, em especial ao Emerson, Fábio, Thiago e Sílvia pela ajuda, compreensão, carinho e amizade recebidos.

À Faculdade de Engenharia Química – Departamento de Processos Tecnológicos pela oportunidade concedida.

Ao Professor Everson por me desafiar e inspirar a ultrapassar os obstáculos que surgiram ao longo deste estudo.

Ao Paulo de Tarso Vieira e Rosa pelo auxílio na caracterização das esferas de vidro.

Ao Fernando Zago pela compreensão e ajuda na montagem de equipamentos.

A todas as empresas parceiras que cederam as amostras para este estudo.

À Brasquip Ambiental S.A., que gentilmente forneceu as informações e valores envolvidos no descarte de emulsões.

ÍNDICE

ABREVIATÖES.....	i
1. RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
2. INTRODUÇÃO.....	01
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3.1 Formação de biofilmes.....	06
3.2 Dispositivos para desenvolvimento artificial de biofilmes.....	09
3.3 Emprego de fluido de corte em empresas de usinagem de metais.....	14
3.4 Biocidas.....	18
3.5 Susceptibilidade de células planctônicas e sésseis a biocidas.....	22
3.6 Estratégias avançadas de controle e erradicação de biofilmes.....	22
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	24
4.1 Material.....	24
4.2 Metodologia.....	26
4.2.1 Caracterização do Fluido de corte.....	26
4.2.2 Avaliação dos coeficientes de partição dos biocidas.....	27
4.2.3 Determinação do diâmetro médio das esferas de vidro.....	28
4.2.4 Isolamento das cepas do fluido de corte contaminado.....	28
4.2.5 Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos.....	29
4.2.6 Preparo dos inóculos.....	30
4.2.6.1 Inóculos para testes com emulsão óleo/água.....	30
4.2.6.1.1 Inóculo 1.....	30
4.2.6.1.2 Inóculo 2.....	30
4.2.6.2 Inóculo para testes com amaciante de roupas e caldo de cana.....	31

4.2.7 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração mínima de morte (CMM) para células planctônicas presentes na emulsão óleo/água	31
4.2.8 Avaliação do efeito do diâmetro das esferas de vidro na formação do biofilme e determinação do período de sonicação na recuperação celular.....	32
4.2.9 Análise da susceptibilidade aos biocidas do biofilme desenvolvido na superfície das esferas de vidro.....	34
4.2.10 Formação de biofilme no dispositivo MBEC™	34
4.2.11 Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes desenvolvidos no dispositivo MBEC™	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Caracterização do fluido de corte contaminado.....	37
5.2 Isolamento das cepas.....	38
5.3 Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos das bactérias isoladas.....	40
5.4 Avaliação dos coeficientes de partição dos biocidas testados.....	41
5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração mínima de morte (CMM) para células planctônicas.....	43
5.6 Determinação do diâmetro médio das esferas de vidro.....	45
5.7 Avaliação do efeito do diâmetro das esferas e do tempo de incubação na formação do biofilme e determinação do período de sonicação.....	47
5.8 Formação de biofilme no dispositivo MBEC™	51
5.9 Susceptibilidade do biofilme desenvolvido no dispositivo MBEC™ e na superfície das esferas de vidro aos biocidas, a partir do fluido de corte contaminado.....	53
5.10 Formação e susceptibilidade a biocidas do biofilme desenvolvido a partir do amaciante de roupa contaminado na superfície das esferas de vidro e do dispositivo MBEC™	57
5.11 Formação e susceptibilidade a biocidas do biofilme desenvolvido a partir do caldo de cana contaminado na superfície das esferas de vidro e no dispositivo MBEC™	58
5.12 Análise comparativa global entre o sistema de esferas de vidro e o dispositivo MBEC™	60
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	63

6.1 Conclusões.....	63
6.2 Sugestões.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
Anexo 1.....	75
Anexo 2.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do biofilme.....	08
Figura 2: Sistema do tipo fermentador de profundidade constante, CDFF.....	11
Figura 3: (A) sistema de reator de fluxo simples; (B) detalhe das lamínulas para observação em tempo real.....	12
Figura 4: Dispositivo de Robbin modificado.....	12
Figura 5: Biofilmes formados em áreas de respingos em uma empresa de usinagem de metais (SP, Brasil).....	14
Figura 6: Resultados dos testes de degradação de hidrocarbonetos.....	30
Figura 7: Homogeneizador de sangue.....	33
Figura 8: Dispositivo MBEC™.....	35
Figura 9: Fórmulas estruturais das moléculas de principio ativo dos biocidas testados.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os dispositivos mais utilizados para a formação de biofilmes.....	13
Tabela 2: Mecanismos de ação dos principais antimicrobianos.....	20
Tabela 3: Biocidas produzidos pela IPEL Biocidas comumente utilizados em indústrias de usinagem de metais.....	21
Tabela 4: Resultados da caracterização do fluido de corte contaminado e livre de contaminantes.....	37
Tabela 5: População microbiana detectada no fluido de corte contaminado.....	38
Tabela 6: Cepas isoladas do fluido de corte contamiando.....	39

Tabela 7: Coeficiente de partição dos agentes ativos dos biocidas utilizados.....	42
Tabela 8: Custo de cada biocida testado por tonelada de emulsão e seus resultados no teste de MIC e CMM para células planctônicas presentes na emulsão contaminada.....	45
Tabela 9: Determinação da distribuição de diâmetros das esferas de vidro com tamanho nominal de 0,85mm.....	46
Tabela 10: Determinação das áreas superficiais e específicas das esferas, pino do MBEC TM e do tubo de ensaio.....	47
Tabela 11: Formação do biofilme nas esferas de vidro de 0,85 e 3mm de diâmetro médio.....	48
Tabela 12: Formação de biofilme em 0,3g de esferas de 0,85 mm de diâmetro médio após os três períodos de sonicação utilizando como inóculo a emulsão contaminada (inóculo 1).....	50
Tabela 13: Formação de biofilme em 0,3g de esferas de 0,85 mm de diâmetro médio e recuperação celular após os três períodos de sonicação utilizando como inóculo a suspensão microbiana obtida das cepas isoladas (inóculo 2).....	50
Tabela 14: Formação de biofilme no dispositivo MBEC TM utilizando como inóculo a emulsão contaminada.....	52
Tabela 15: Formação de biofilme no dispositivo MBEC TM utilizando como inóculo a suspensão de cepas isoladas.....	52
Tabela 16: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes aos biocidas com as esferas de vidro de 0,85mm de diâmetro médio.....	54
Tabela 17: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes aos biocidas utilizando o dispositivo MBEC TM	55
Tabela 18: Concentração de biocidas para erradicação (CE) de biofilmes formados na superfície das esferas de vidro, em alíquotas de 0,1 a 0,3g de esferas por tubo.....	56
Tabela 19: Concentração de erradicação (CE) dos biofilmes formados a partir da emulsão contaminada, nos dois sistemas testados, com tempo de formação de 72 horas de incubação.....	56
Tabela 20: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes utilizando o sistema de esferas e o amaciante de roupa contaminado como inóculo.....	58
Tabela 21: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes utilizando o dispositivo MBEC TM e o amaciante de roupa contaminado como inóculo.....	58

ABREVIATÖES

CDFE: *Constant Depth Film Fermentor* (Sistema do tipo fermentador de profundidade constante)

CMEB: Concentraçãõ Míñima de Erradicaçãõ do biofilme

EPS: *Extracellular Polymeric Substances* (matriz extracelular)

ELISA: Ensaio com Imunosorbente Ligado a Enzima

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration* (Concentraçãõ Míñima Inibitória)

MBEC: *Minimal Biofilm Eradication Concentration* (Concentraçãõ Míñima de Erradicaçãõ do Biofilme)

MBECTM : Dispositivo para determinaçãõ da concentraçãõ míñima de erradicaçãõ do biofilme

PVC: Cloreto de polivinila

PVDF: Difluoreto de polivinilideno

UFC: Unidades formadoras de colônias, geralmente expressa em UFC/mL ou UFC/g, utilizada em contagens de colônias obtidas em plaqueamento convencional.

1. RESUMO

Biofilme microbiano é definido como uma associação de células microbianas, fixadas a superfícies, bióticas ou abióticas, envolta por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas. Os biofilmes representam mais de 90% dos contaminantes existentes em sistemas aquosos, industriais, clínicos e ambientais. A resistência de microrganismos em biofilmes (sésseis) a biocidas é muito maior que a resistência de células livres (planctônicas), quando se compara seus antibiogramas. A rápida e correta avaliação do efeito de agentes antimicrobianos sobre os microrganismos sésseis é muito importante para a adequada seleção das ações corretivas a serem aplicadas em sistemas industriais contaminados. Atualmente, o sistema *in vitro* mais indicado para gerar, quantificar e erradicar biofilmes é o dispositivo MBEC™, de alto custo, desenvolvido por pesquisadores canadenses.

O presente estudo visou o desenvolvimento de um sistema alternativo que fornecesse resultados análogos ao MBEC™, empregando esferas de vidro como suporte para o crescimento de biofilmes ao invés de placas de poliestireno. Em amostras de três segmentos industriais diferentes (óleo de corte usado na usinagem de metais, amaciante de roupas e caldo de cana) contaminados com microrganismos formadores de biofilmes, foram testadas sete formulações de biocidas em diversas concentrações, tanto no sistema desenvolvido quanto no dispositivo MBEC™.

Os biocidas utilizados foram fornecidos pela IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda, formulados com os seguintes princípios ativos: 2-bromo-2nitropropano-1,3-diol (BNP-115); 2-n-octil-4isotiazolin-3-ona, 2-tiocianometiltiobenzotiazol, dimetilolurea, 5-cloro-2metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (FBP-124); 2-n-octil-4 isotiazolin-3-ona, dimetilolurea, 1,2-benzisotiazolin-3-ona (FBP-128); sódio-2-piridinatiol-n-óxido (FBP-140); hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietil) s-triazina (BP-180); 2-bromo-2nitropropano-1,3-diol, 5-cloro-2metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (BP-509);e 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona, dimethylolurea, 3-iodo-2-propinil butil carbamato (FBP-417).

A concentração inibitória mínima (MIC) dos biocidas e suas concentrações mínimas de morte (CMM) foram determinadas para as bactérias planctônicas do fluido de corte, e a melhor relação custo/benefício foi observada para o biocida BNP-115, que apresentou MIC e CMM de 0,014% (v/v).

Quanto às células sésseis, formadas em ambos os dispositivos utilizando-se fluido de corte contaminado como inóculo, o biocida de melhor relação custo/benefício foi o BP-180. Nos ensaios com amaciante de roupas e caldo de cana, as melhores relações custo/benefício foram verificadas para os biocidas BNP-115, BP-180 e BP-509.

A maturidade do biofilme foi muito importante para avaliar a eficácia dos biocidas. Verificou-se, durante o desenvolvimento do trabalho, que para a concentração de erradicação (CE) do biofilme formado no dispositivo MBEC™ ser semelhante às concentrações determinadas nas esferas de vidro, houve a necessidade de um período de incubação maior (72 horas) no MBEC™ do que no sistema de esferas (48 horas). Os valores de CE determinados para o dispositivo MBEC™, com 48 horas e 72 horas de incubação foram, respectivamente, 12 vezes maior que a concentração tradicional recomendada e de 30 a 125 vezes tal concentração, dependendo do biocida testado. Estes resultados evidenciaram que a maturidade do biofilme formado a partir do óleo de corte contaminado é atingida mais rapidamente no sistema de esferas de vidro do que no dispositivo MBEC™, mostrando que é possível gerar um biofilme representativo da contaminação industrial em 48 horas no sistema alternativo desenvolvido, agilizando as ações corretivas e evitando ou minimizando principalmente os custos com o descarte das emulsões.

ABSTRACT

A microbial biofilm is defined as an association of microbial cells adhered to surfaces, biotic or abiotic, wrapped up in a complex extracellular polymeric matrix. Biofilms represent more than 90% of the existent contaminants in aqueous, industrial, and clinical systems, as well as in the environment. The resistance to biocides of microorganisms in biofilms (sessile cells) is much larger than that observed for cells in suspension (planktonic) when their antibiograms are compared. The fast and correct evaluation of the effect of antimicrobial agents on sessile microorganisms is very important for the appropriate selection of the corrective actions to be applied in contaminated industrial systems. Nowadays, the most indicated system to generate, quantify and eradicate biofilms is the MBEC™ device, developed by Canadian researchers.

The present study sought the development of an alternative system to supply results similar to those obtained with the MBEC™ device, employing glass spheres as a support for biofilm growth instead of polystyrene plates. In samples of three different industrial segments (metal working cutting fluid, liquid fabric softener and sugar cane extract), seven commercial biocide formulations were tested in several concentrations, on both the developed system using glass spheres as support, and on the MBEC™ device.

The biocides employed were provided by IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda, and were formulated with the following active agents: 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (BNP-115); 2-n-octil-4-isotiazolin-3-one, 2-tiocianometiltiobenzotiazol, dimethylolurea, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one, 2-metil-4-isotiazolin-3-one (FBP-124); 2-n-octil-4-isotiazolin-3-one, dimethylolurea, 1,2-benzisotiazolin-3-one (FBP-128); sodium-2-piridinatiol-n-oxide (FBP-140); hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietil) s-triazina (BP-180); 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one, 2-metil-4-isotiazolin-3-one (BP-509); e 2-n-octil-4-isotiazolin-3-one, dimethylolurea, 3-iodo-2-propinil butil carbamate (FBP-417).

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum concentration of death (CMM) of the different biocides were determined for the cutting fluid planktonic bacteria and the best cost/benefit ratio was observed for BNP-115 biocide, which presented MIC and CMM values equal to 0,014% (v/v).

Referring to sessile cells formed on both systems, when the contaminated cutting fluid was used as inoculum, the biocide presenting the best cost/benefit ratio was BP-180. In the tests with liquid fabric softener and sugar cane extract, the best cost/benefit ratios were verified when using BNP-115, BP-180 and BP-509 biocides.

The maturity of the biofilm was very important to evaluate the effectiveness of the biocides. It was verified, during the development of the work, that for the eradication concentration (CE) of the biofilm formed in the MBEC™ device to be similar to the concentrations determined in the glass spheres, a larger incubation period was required (72 hours) in MBEC™ than in the system constituted of spheres (48 hours). The determined values of CE using the MBEC™ device, after incubation periods of 48 hours and 72 hours, were, respectively, 12 times higher than the traditional recommended concentration and from 30 to 125 times such concentration, depending on the tested biocide. These results evidenced that the biofilm formed from the cutting oil reached its maturity more quickly in the glass spheres system than in the MBEC™ device, showing that it is possible to generate a representative biofilm starting from an industrial contaminated sample in 48 hours in the developed system, accelerating the proper corrective actions and avoiding or minimizing mainly the costs related to emulsion disposal.

2. INTRODUÇÃO

Biofilmes microbianos têm sido estudados nos mais diferentes segmentos industriais, onde são os principais causadores de contaminações geralmente de difícil controle e responsáveis pelo insucesso de diversos tratamentos convencionais.

O histórico de problemas com biofilmes está invariavelmente presente em todo segmento industrial que possui água em seu sistema, tais como: torres de resfriamento, sistemas de tratamento de água (leito fluido, resinas de troca iônica, osmose reversa) e em todos os demais sistemas que tenham quaisquer outros tipos de fluidos em circulação.

Biofilme microbiano é definido como uma associação de células bacterianas e de fungos, fixadas às superfícies, bióticas ou abióticas (Ceri *et al.*, 2001), inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS). A EPS possui variada composição química, e não somente provê a estrutura orgânica do biofilme, como também facilita o arranjo espacial das diferentes espécies que o compõem. Os principais componentes da EPS são os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios (Lennox *et al.*, 2006). Esta matriz extracelular é formada em parte pelas próprias células e em parte por componentes do ambiente, como por exemplo, detritos, proteínas, materiais inorgânicos e até mesmo outros seres vivos.

Os biofilmes são considerados uma fase do ciclo de vida dos microrganismos que contrasta com a vida das células planctônicas (em suspensão em um meio líquido). Sua formação é uma estratégia vital adotada pelas células para sobrevivência sob condições adversas (Sepandj *et al.*, 2003), como por exemplo, quando sujeitas a tensões cisalhantes (Ceri *et al.*, 2001).

Os biofilmes têm sido exaustivamente estudados nas áreas de medicina e odontologia, nas quais os problemas gerados são mais críticos por envolver vida humana, ocorrendo principalmente porque os fluidos corpóreos são excelentes meios de cultivo para os microrganismos. Estima-se que biofilmes estejam envolvidos em 65% das infecções humanas de origem bacteriana (Nascimento e

Taveira, 2005). Os dispositivos médicos que apresentam colonização por biofilmes, como os catéteres, são os responsáveis diretos pelo fracasso de muitos dos tratamentos tradicionais (Sepandj *et al.*, 2003), pois permitem a instalação de microrganismos de difícil controle, por apresentar maior resistência à erradicação por agentes antimicrobianos como os antibióticos, biocidas e desinfetantes (Morck *et al.*, 2001).

Os microrganismos presentes na forma de biofilmes são de erradicação mais difícil quando comparado às células microbianas planctônicas, pioneiras na formação do biofilme (Bardouniotis *et al.*, 2001). A dificuldade no estudo de biofilmes, quer seja em laboratórios ou no seu habitat natural está, principalmente, na diferença de comportamento e expressão genética entre as células planctônicas e células sésseis de uma mesma espécie, estimada em até 30% (Marques *et al.*, 2004). Supõe-se que menos de 10% dos microrganismos presentes em um sistema são constituídos por células planctônicas, estando mais de 90% na forma de biofilme (Ceri *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, além da área da saúde, segmentos industriais das mais variadas atividades e de segmentos de mercado distintos como cosméticos, alimentícios, farmacêuticos, fluidos de corte, resinas, tintas e revestimentos, dentre outros, têm sofrido com este problema e têm se conscientizado de sua importância e da necessidade de se tomar medidas preventivas. A implantação das boas práticas de fabricação e os acordos de garantia da qualidade com os fornecedores de matéria-prima, além do uso de biocidas selecionados e aprovados em suas formulações, são medidas que têm sido adotadas para minimizar ou retardar a formação de biofilme. A concentração de biocida necessária para a erradicação do biofilme é muito maior que a concentração para eliminar os microrganismos planctônicos. A grande dificuldade em eliminar biofilmes se deve ao fato de que diferentes gêneros e espécies de microrganismos se agregam a EPS produzido pelas mesmas, que as protege mecânica e quimicamente das medidas aplicadas para a sua erradicação.

As metodologias convencionais utilizadas para testar e selecionar os antimicrobianos são baseadas em células planctônicas, sendo impróprias para a erradicação de biofilmes. As ações acima citadas são importantes em todas as

áreas de produção, porém a utilização de métodos convencionais disponíveis para o estudo e avaliação de biofilmes, tais como o dispositivo de Robbins, quimiostatos e dispositivo MBEC™, dentre outros, ainda é muito dispendioso e moroso para serem investidos e aplicados na área industrial. Apenas uma pequena parcela dos profissionais técnicos (área de produção, controle de qualidade, engenharia, dentre outras) atuantes no mercado industrial compreende que o biofilme pode ser o principal causador de seus problemas de contaminação microbológica. Esta constatação despertou a atenção para a sua importância e motivou a realização de um estudo mais direcionado à aplicação prática nos sistemas industriais, que constitui o foco do presente trabalho.

Dividindo as indústrias existentes, e separando-as em diferentes segmentos de mercado, notou-se recentemente que os problemas gerados por biofilmes são mais intensos e significativos nas indústrias do segmento petrolífero e nas empresas que atuam na usinagem de metais empregando óleo de corte. Além de ocasionar mudanças físico-químicas importantes e quase sempre irreversíveis nos fluidos de corte deste segmento, a deterioração gerada pelos biofilmes leva as indústrias de usinagem a descartar milhares de litros da emulsão contaminada (normalmente óleo/água a 5% em volume), o que gera um grande problema ambiental e um elevado custo para a reposição por uma nova emulsão. Há procedimentos legais requeridos para o descarte deste produto, envolvendo empresas especializadas, além do custo de reposição da emulsão (Runge, 1989).

Como mencionado anteriormente, diversos segmentos de mercado têm problemas com biofilmes. Assim, uma técnica simples, economicamente viável, com elevado grau de confiabilidade, versatilidade e rapidez na detecção de biofilmes e de sua caracterização é de grande interesse para aplicação industrial. Considerando que esferas de vidro são usadas com sucesso como microcarregadores no cultivo de células eucarióticas e bactérias, esta alternativa pareceu ser técnica e economicamente viável quando comparada à utilização da placa de poliestireno MBEC™, de origem canadense, considerado, no momento, o dispositivo mais recomendado para testes com biofilmes.

A IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda. (IPEL Biocidas), uma empresa de capital nacional que formula e sintetiza produtos antimicrobianos (biocidas), disponibilizou recursos financeiros e técnicos para o desenvolvimento deste estudo. A IPEL Biocidas atua em doze segmentos de mercado, entre eles o de fluido de corte, área escolhida para o foco principal de desenvolvimento deste trabalho. Este segmento representa grande parcela dentre os clientes da empresa; e de janeiro a dezembro de 2005 houve um crescimento superior a 55% nas vendas de biocidas pela IPEL Biocidas para este segmento, quando comparado ao mesmo período de 2004.

Pelo histórico do laboratório de microbiologia da IPEL Biocidas há registros de que cerca de 30% dos problemas de natureza microbiana estão relacionados a biofilmes industriais, sendo que 35% deste total é referente ao segmento de óleo de corte.

O presente estudo teve por objetivo geral desenvolver uma metodologia para testar a formação e susceptibilidade de biofilmes aos biocidas disponíveis no mercado, que fosse mais simples, rápida, versátil e menos dispendiosa que a comercialmente disponível, que emprega o dispositivo MBEC™, tendo como objetivos específicos:

- a avaliação dos coeficientes de partição dos biocidas utilizados;
- a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração mínima de erradicação (CMM) para células planctônicas presentes no fluido de corte;
- a avaliação do uso de esferas de vidro como matriz de suporte alternativo para o desenvolvimento de biofilmes a partir de fluido de corte contaminado;
- o estudo do efeito do diâmetro das esferas na formação do biofilme;
- a formação de biofilmes na superfície das esferas de vidro e no dispositivo MBEC™, a partir de amostras de óleo de corte, amaciante de roupa e caldo de cana;
- a determinação da concentração de erradicação dos biofilmes formados pelos biocidas testados.

Para estes ensaios foram utilizados biocidas com diversos princípios ativos conhecidos comercialmente pelos nomes: BNP-115 (Bronopol), FBP-124 (N-octilisotiazolinona, Metilisotiazolinona, Clorometilisotiazolinona e TCMTB), FBP-128 (Benzoisotiazolinona, N-octilisotiazolinona e Dimetiloluréia), FBP-140 (Piritionato), BP-180 (Triazina), BP-509 (Bronopol, Metilisotiazolinona e clorometilisotiazolinona) e FBP-417 (N-octilisotiazolinona, Benzoisotiazolinona, Carbamato e Dimetiloluréia). Como inóculo para os ensaios, foram usados os produtos: a) fluidos de corte de uma indústria de usinagem de peças metálicas situada em São Paulo; b) amaciante de roupas disponibilizado por uma empresa situada em Campinas; c) caldo de cana cedido por uma usina situada em Piracicaba.

O principal segmento industrial selecionado para este estudo foi o de fluido (óleo) de corte. A formação do biofilme e o teste de susceptibilidade aos biocidas foram efetuados concomitantemente nas esferas de vidro e no dispositivo MBECTM, para comparação dos resultados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Formação de biofilmes

A microbiologia tradicional caracterizou durante anos as células planctônicas, encontradas em suspensões. Estas células foram exaustivamente avaliadas, isoladas e identificadas. Algumas das bactérias planctônicas estudadas têm a capacidade de aderir em diversas superfícies, formando biofilmes.

Zobell (1943), em seu experimento com suspensão celular em uma garrafa de vidro, observou, pela primeira vez, que as bactérias localizavam-se em maior número na superfície interna da garrafa do que no líquido dentro dela. Após vários anos, Costerton (1978), através de técnicas de microscopia sofisticadas, confirmou este fato e a partir daí o conceito de biofilme começou a ser difundido e mais atentamente estudado.

A formação do biofilme está diretamente relacionada com a adesão celular. Os fatores que iniciam a adesão são as cargas superficiais da parede celular da bactéria, que interagem positiva ou negativamente com a superfície, e o fato de possuírem fímbrias, pilis e fatores inerentes à sua genética (Tortora *et al.*, 2000). As bactérias crescem preferencialmente em superfícies do que na forma dispersa em fase aquosa, por isso verifica-se a predominância numérica e metabólica das células sésseis (aderidas). Sabe-se que, menos de 10% das células bacterianas são encontradas na forma planctônica (Ceri *et al.*, 1999)

A adesão celular a diferentes superfícies segue diversos mecanismos. Dentre esses mecanismos, podem-se citar: forças de atração e repulsão eletrostática entre as bactérias e a superfície, interações hidrofóbicas entre a membrana celular e a superfície, formação de pontes de hidrogênio, que auxiliam na adesão das células à superfície, carga da matriz extracelular, força da gravidade e movimento desordenado de células, denominado de Browniano (Costerton *et al.*, 1989). Segundo estudos realizados pelo Center for Biofilm Engineering (2005), o material da superfície tem pouco ou nenhum efeito sobre o

desenvolvimento do biofilme, que é formado de maneira quase igual em vidro, aço, Teflon®, cloreto de polivinila (PVC) e difluoreto de poli vinilideno (PVDF).

O processo de adesão ocorre em duas fases, uma inicial (reversível) onde predominam atrações fracas e a segunda (irreversível), na qual predominam forças físicas e químicas, ocorrendo estabilização pela EPS (Christensen e Characklis, 1990). As células, durante a adesão, modificam seu fenótipo em resposta à aproximação de uma superfície, respondendo às condições ambientais com padrões de crescimento diferentes dos observados nas células livres (Costerton *et al.*, 1987).

A colonização da superfície depende diretamente da mistura das espécies planctônicas, sendo que uma espécie pode ser a colonizadora primária, atraindo bactérias da mesma espécie ou de outras espécies, formando uma colônia heterogênea.

A formação do biofilme divide-se em 5 etapas consecutivas (American Society for Microbiology, 2005). A primeira, de adsorção, é reversível e ocorre em segundos. A segunda, de adesão, é irreversível e ocorre no intervalo de segundos a horas. A etapa de crescimento e divisão celular ocorre no período de horas a dias, o mesmo ocorrendo para a de formação de EPS e biofilme. A última etapa, de adesão de outros microrganismos e liberação de micro-colônias, pode ocorrer no período de dias a meses.

Costerton (1995) descreve a estrutura do biofilme *in vitro* como similar a torres de cogumelo com canais de água entre elas, conforme indicado na Figura 1. A penetração de substâncias através destas estruturas é dificultada, e os microrganismos do centro da colônia estão mais protegidos dos agentes antimicrobianos do que os da borda. O transporte de massa ocorrido no biofilme é feito por difusão, que é muito lenta quando comparada à cinética dos bioprocessos microbianos (Xavier, 2002).

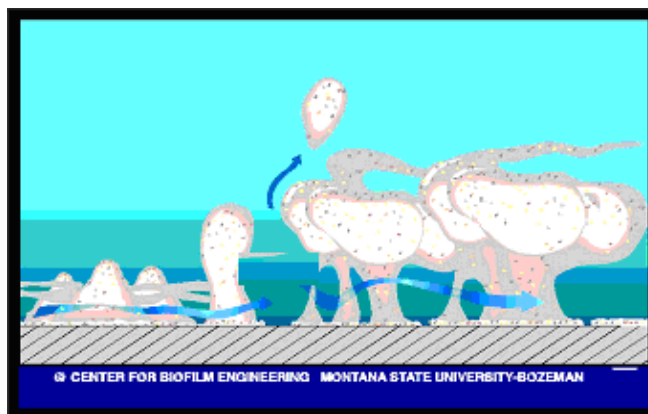


Figura 1: Estrutura do biofilme (fonte: Marques *et al.*, 2004).

Sob determinadas condições, como quando sob a ação de fluidos, parte do biofilme desenvolvido se desprende na forma de microcolônias que vão colonizar outras superfícies. As células em biofilmes têm capacidade de fixar-se em diversas superfícies, principalmente em condições de estresse nutricional. Estas células podem efetuar comunicação célula-célula, e esta é feita por moléculas de sinalização específica (Vieira, 1995). Xavier (2002) sugere que a estrutura do biofilme pode ser atribuída à sua própria forma tridimensional em conjunto com a distribuição espacial das substâncias nele imobilizadas.

Mattila-Sandholm *et al.* (1992) mencionam que os gêneros mais comuns de bactérias formadoras de biofilme são: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes*. A *Pseudomonas aeruginosa* é um dos microrganismos mais estudados, tanto em cultura pura como na forma sésil. Com as avançadas técnicas moleculares hoje se conhece, por exemplo, os genes responsáveis pelo controle da motilidade flagelar deste microrganismo, porém não se conhece ainda muito sobre os genes que controlam a estrutura de comunidade ou cooperação da *P. aeruginosa* com outras espécies quando em biofilmes (Costerton e Wilson, 2004).

Embora a maioria dos estudos descreva as bactérias Gram-negativas como as principais formadoras de biofilme, sabe-se que as bactérias Gram-positivas também estão presentes na estrutura do biofilme (McBain *et al.*, 2003), sendo em alguns casos as responsáveis pelo problema, embora estudos de bactérias Gram

positiva em biofilme ainda sejam escassos. Estudos realizados em indústrias sucroalcooleiras mostram que os principais problemas são causados por bactérias Gram-positivas produtoras de goma, como por exemplo, a dextrana (Oliveira *et al.*, 2002). Os estudos de Locatelli *et al.* (2004) com *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* mostraram que estas bactérias Gram-positivas são capazes de formar biofilme na superfície das lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone.

As comunidades microbianas apresentam interações de mutualismo, comensalismo, antagonismo e saprofitismo, podendo estas ocorrer entre microrganismo-microrganismo ou microrganismo-organismo multicelular (Lennox *et al.*, 2006).

Os maiores problemas associados aos biofilmes são: maior resistência a agentes antimicrobianos, maior população (chegando a 10^{11} a 10^{12} UFC/mL ou g) quando comparadas às células planctônicas enumeradas por plaqueamentos de profundidade, maior dificuldade de remoção, aumento de custo com a substituição, limpeza e manutenção de equipamentos e até efeitos deletérios na qualidade final do produto (Christensen e Characklis, 1990). Esses problemas estão diretamente ligados à produção da matriz de EPS, que forma uma barreira protegendo as células dessa colônia. A EPS pode ser constituído por proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios, dentre outros componentes. Segundo Wimpenney *et al.* (1993), a prevalência é de polissacarídeos, porém estudos posteriores (Jahn *et al.*, 1999) com *Pseudomonas putida* mostram que 75% da EPS é formada por proteínas.

3.2 Dispositivos para desenvolvimento artificial de biofilmes

Ao longo dos anos, diversos sistemas vêm sendo utilizados para o desenvolvimento dos biofilmes *in vitro* para que se possa testar sua susceptibilidade a agentes controladores, através dos testes de concentração inibitória mínima, MIC, e concentração mínima de erradicação do biofilme, MEBC (Hobson *et al.* 2001). Dentre estes métodos, destacam-se o desenvolvimento de biofilmes na superfície de cilindros carreadores, a imobilização de células em

hidrogel, o cultivo celular em quimiostatos, o uso de fermentador de filme com profundidade constante, o sistema de reator de fluxo simples, o dispositivo de Robbin modificado e o cultivo de células em placas com micropoços (Ceri *et al.*, 2001), discutidos a seguir.

A técnica dos cilindros carregadores é utilizada para verificar a eficácia de desinfetantes, e é considerada pioneira na otimização dos dispositivos para formação de biofilmes. O desenvolvimento do biofilme se dá na superfície de cilindros metálicos ocos submersos em meio de cultura inoculados com o microrganismo teste. Mesmo não requerendo bombas, aparatos especiais e tubulações para o desenvolvimento do ensaio, o método é meticuloso e demorado devido às sucessivas etapas até sua finalização.

Na imobilização de células em hidrogel, o biofilme bacteriano é formado em gel de poloxamer, um tipo de polímero, sem a ação de tensões cisalhantes, e utilizado no teste de susceptibilidade para verificar a resistência a antibióticos. Este método não é muito eficiente, pois a relação entre as células imobilizadas no hidrogel e o biofilme formado sob a ação de forças cisalhantes não pode ser claramente definida. A maior desvantagem é a inviabilidade de seu uso industrialmente, pois há a necessidade de se efetuar os testes individualmente, ou seja, no teste de susceptibilidade para cada um dos agentes antimicrobianos e suas respectivas concentrações prováveis, deve ser formado um biofilme em hidrogel.

No cultivo celular em quimiostatos, a formação do biofilme em cultura contínua se dá nas paredes do reator pela ação de forças de cisalhantes. Para estudos de fisiologia, este método funciona adequadamente, pois há grande produção de biofilme, mas para a avaliação de susceptibilidade a biocidas torna-se inviável, principalmente porque a remoção do filme das paredes do reator é complexa, podendo causar danos ao biofilme, dificultando ou mesmo impedindo os ensaios de susceptibilidade.

O dispositivo de formação de filme com profundidade constante, CDFF (Figura 2), caracteriza-se por ser um fermentador contínuo com volume de meio de cultura definido, que funciona como um filme líquido para gerar biofilme sobre

um suporte escolhido (metal, plástico ou vidro). Os biofilmes são formados sob a ação de forças cisalhantes e são equivalentes entre si, apresentando muita resistência a antibióticos e biocidas. Entretanto, seu uso é pouco viável economicamente para o segmento industrial, por ser muito oneroso.

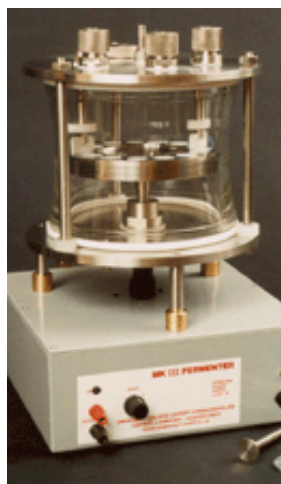


Figura 2: Sistema do tipo fermentador de profundidade constante, CDFF (fonte: eastman.ucl.ac.uk , 2005).

O sistema de reator de fluxo simples consiste de uma placa de acrílico (câmara) com canais perfurados (Figura 3) onde são depositadas lamínulas de vidro. Este sistema é ligado a uma bomba peristáltica de fluxo controlado, que permite o fluxo contínuo e controlado de nutrientes pela câmara, produzindo múltiplos biofilmes, muito útil para a análise fisiológica do filme em tempo real através de microscopia das lamínulas. Porém, o teste de susceptibilidade é limitado pela complexidade de operação do ensaio.

Pelo uso do dispositivo de Robbin modificado, discos de material para teste (cupons) são fixados a um suporte com canais (Figura 4). Este suporte é conectado a um sistema que bombeia a suspensão de microrganismos em meio de cultura através dele. Os cupons podem ser retirados e analisados individualmente. Este dispositivo contribuiu para o desenvolvimento, conhecimento e aceitação da teoria do biofilme e tornou-se o mais popular dispositivo para formação de biofilmes sob ação de forças cisalhantes. Os testes de

susceptibilidade a antibióticos e biocidas neste sistema são muito eficientes, porém a utilização deste dispositivo é complexa e onerosa, já que há a necessidade de sistemas de bombas e múltiplas ligações com tubulações de borracha (Green *et al.*, 1987).

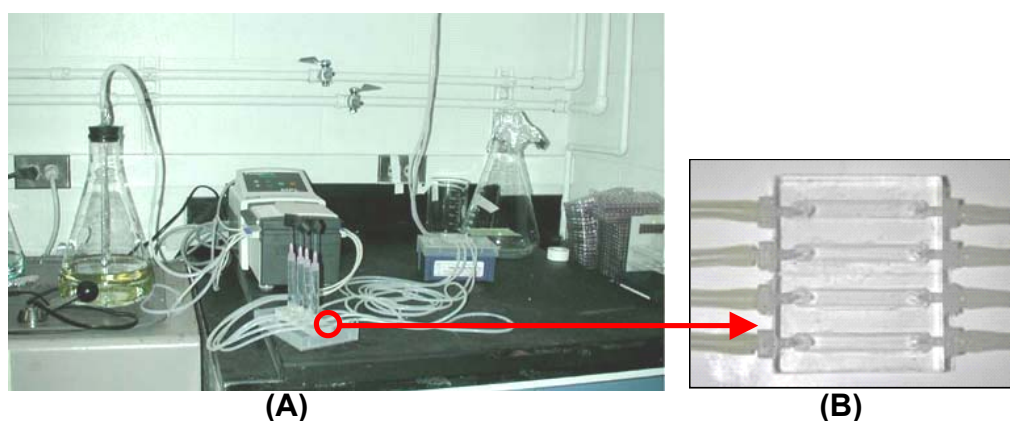


Figura 3 : (A) sistema de reator de fluxo simples; (B) detalhe das lamínulas para observação em tempo real (fonte: Marques *et al.*, 2004).



Figura 4: Dispositivo de Robbin modificado (fonte: Marques *et al.*, 2004).

As microplacas com múltiplos poços consistem em um dos mais recentes dispositivos para a formação de biofilmes *in vitro* (O'Toole, 1998). São de custo acessível, porém não podem ser utilizadas para análise do biofilme em tempo real. A determinação da concentração celular no biofilme é feita com a adição do corante cristal violeta e álcool nos poços, verificando-se a quantidade de corante absorvido e estimando-se assim a massa do biofilme. Entretanto, este método não

é preciso, pois a recuperação do corante nos poços nem sempre condiz com a concentração celular neles, e por muitas vezes o corante não é totalmente recuperado.

O dispositivo MBEC™ é usado para a determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme e emprega uma placa de poliestireno, com fundo formado por oito canais aos quais se adiciona a amostra contaminada (inóculo), e uma tampa contendo 96 pinos, onde são formados 96 biofilmes equivalentes. A tampa do dispositivo permite que os pinos sejam removidos com relativa facilidade, sem que isto afete as células aderidas nos demais pinos. Este dispositivo é utilizado como complemento ao teste de susceptibilidade em microplacas de múltiplos poços (Ceri *et al.*, 2001). Este método tem a proposta de minimizar os custos e reduzir o tempo de teste, pois os biofilmes formados facilitam o teste de susceptibilidade, reduzindo o número de aparatos usados nos sistemas anteriores. É o método mais moderno de que se dispõe até o momento, e ainda não há no mercado um concorrente com desempenho equivalente (Ceri *et al.*, 2000, 2001, 2002, 2003a e 2003b).

As vantagens e desvantagens dos métodos anteriormente citados estão sumarizadas na Tabela 1, observando-se que nenhuma das abordagens pode ser universalmente considerada como mais adequada que as demais.

Tabela 1: Comparação entre os dispositivos mais utilizados para a formação de biofilmes.

Sistemas	Monitoramento do biofilme em tempo real	Possibilidade de efetuar múltiplos ensaios	Capacidade de produção de biofilme
Cilindros carreadores (segundo a AOAC)	não	sim	sim
Hidrogel	não	não	sim
Quimiostato	não	não	sim
Sistema CDFF	não	não	sim
Reator de Fluxo Simples	sim	não	não
Dispositivo de Robbin's	não	sim	não
Sistema MBEC™	não	sim	sim

3.3 Emprego de fluido de corte em empresas de usinagem de metais

Pelo motivo acima citado, e pela quantidade de amostras contaminadas de fluido de corte empregado na usinagem de metais que o laboratório de microbiologia da IPEL Biocidas recebe (cerca de 30% do total de amostras para análises).

Define-se por fluido de corte qualquer fluido usado para corte ou usinagem de metais ou outros materiais. O fluido ou óleo de corte é uma emulsão formada por 5% de óleo (em volume) e 95% de água (emulsão o/a). Essa emulsão é altamente poluente e muito susceptível ao ataque de microrganismos, e a formação de biofilmes é constante, principalmente nas áreas de respingos do sistema, conforme indicado na Figura 5.

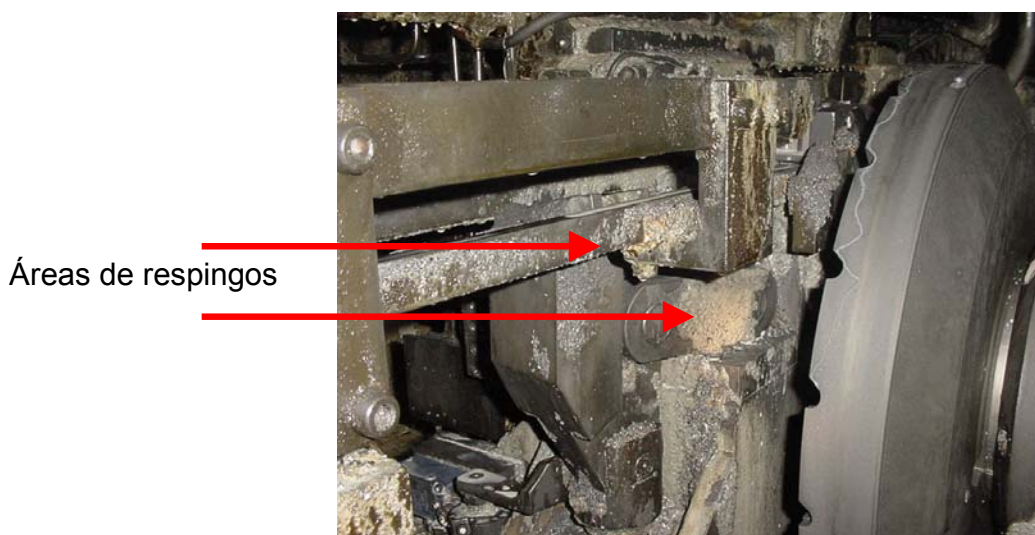


Figura 5: Biofilmes formados em áreas de respingos em uma empresa de usinagem de metais, São Paulo, Brasil.

Há à disposição das indústrias três principais tipos de fluidos de corte, compostos a partir de diferentes tipos de óleo (mineral, sintético e semi-sintético):

- óleo mineral: obtido através da destilação do petróleo, suas moléculas são constituídas fundamentalmente de carbono e hidrogênio, sob a forma de hidrocarbonetos. Possui de 20-25 átomos de carbono e é dividido em dois grupos (parafínicos e naftênicos).

- óleo sintético: obtido através de reações químicas de derivados do petróleo ou de óleos vegetais, de forma a criar cadeias uniformes de hidrocarbonetos. Cerca de 90 % destes óleos dividem-se fundamentalmente em três grupos: a) glicóis (principalmente glicol polialquilenos); b) ésteres de ácidos graxos (como diésteres, polioésteres e ácidos inorgânicos); c) hidrocarbonetos sintéticos (como polialfaolefinas e alquilados).

- óleo semi-sintético: é uma mistura entre o óleo mineral e o óleo sintético.

O tipo menos utilizado é o óleo mineral integral ou puro. O segundo menos frequentemente empregado é o óleo sintético, que não contém óleo mineral, usado em emulsão. E, por último, tem-se o óleo semi-sintético, mais utilizado, que é uma mistura de óleo mineral com fração de óleo sintético.

As indústrias de usinagem de metais utilizam grande quantidade de fluido de corte, e o principal problema que a contaminação deste fluido com formação de biofilme acarreta é o alto custo para a troca da emulsão e descarte do fluido contaminado. A poluição gerada pelo descarte no ambiente de uma tonelada/dia de óleo usado equivale ao esgoto doméstico de 40 mil habitantes, enquanto a queima do óleo sem prévio tratamento gera emissão de óxidos metálicos e gases tóxicos no ar (Revista meio ambiente, 2001).

Estes fluidos são partes integrantes dos processos de fabricação de peças metálicas com sucesso mercadológico. Os fluidos devem ser escolhidos com atenção, e a seleção adequada nem sempre é fácil. Por isso, a escolha é feita baseada na qualidade de acabamento das peças, na produtividade, no custo operacional e no impacto ambiental. O responsável pelo uso do fluido de corte analisa as partes individuais do processo de fabricação das peças como um todo, englobando: composição, manipulação, preparo das emulsões, uso, purificação e conservação do fluido até seu descarte, não deixando de verificar se o fluido escolhido atende às funções para o qual foi desenvolvido. Dentre tais funções pode-se citar a refrigeração, segundo a qual o fluido de corte remove o calor gerado durante o corte, prolongando a vida útil das peças e ferramentas. Destacam-se também a redução do desgaste das ferramentas de corte, a melhoria do acabamento das superfícies, a remoção de cavacos, a proteção

contra corrosão e a lubrificação, que reduz o choque entre a ferramenta e a peça, minimizando a ocorrência de deformações, principalmente as microscópicas.

As indústrias devem considerar também as propriedades intrínsecas dos fluidos de corte para seu melhor aproveitamento (Runge, 1989). Dentre estas propriedades, pode-se citar a ação anticorrosiva, para a proteção das peças e ferramentas, e a atividade antioxidante, que evita a oxidação do fluido, aumentando sua vida útil. São também propriedades relevantes do fluido a capacidade de absorção de calor, que sofre a interferência direta da viscosidade, calor específico e condutividade térmica, o efeito antiespumante, que evita a formação de espuma, que pode interferir na absorção do calor, e a compatibilidade com o meio ambiente.

Assim, as indústrias, normalmente, selecionam o fluido de corte que melhor balanço custo/benefício lhes proporcione, levando-se em conta os aspectos econômicos nas propriedades físicas e químicas, no tipo do equipamento no qual ele é utilizado e, finalmente, na facilidade do descarte (Runge, 1989). O ideal seria que, na indústria, o processo fosse monitorado, e os equipamentos e tubulações fossem projetados para dificultar a formação do biofilme, por exemplo, com menor número de curvas e cotovelos nas tubulações, utilizando materiais de fácil limpeza, desinfecção e manutenção, e pela introdução de aberturas/conecções que facilitassem a remoção do biofilme.

Os principais microrganismos encontrados em fluidos de corte contaminados são as bactérias heterotróficas dos gêneros *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, as bactérias redutoras de sulfato como o *Desulfovibrio* sp, além de fungos filamentosos e leveduras dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Candida* (Rohm & Haas Company, 2005).

Devido a todas essas características, e levando-se em consideração que o fluido está na forma de emulsão, além do fato que a temperatura e umidade nos locais onde os fluidos estão em uso ou armazenados favorecem o crescimento microbiano, observa-se a necessidade de adição de biocidas e controle microbiano periódico.

Como mencionado anteriormente, a contaminação microbiana leva a indústria de usinagem de metais a descartar o fluido de corte. A Brasquip Ambiental S.A., empresa brasileira especializada em tratamento de efluentes em geral localizada em Jandira – SP forneceu dados relevantes sobre o descarte do fluido de corte, dados estes que serão apresentados e discutidos a seguir.

No Brasil foram descartados mais de seis milhões de toneladas de emulsão óleo/água no ano de 2005, porém essa quantidade é muito inferior ao consumo real, pois foram utilizados quatro milhões de litros de óleo para a formulação de fluidos de corte no mesmo período. Em 2004 foram consumidos 5 milhões de litros de óleo para este fim, e estima-se que em 2006 sejam consumidos 4,5 milhões de litros de óleo para a usinagem de metais.

Dentre os diversos meios de tratar o fluido de corte para posterior descarte a Brasquip Ambiental S.A destaca a utilização de processos do tipo evaporativo, físico-químico contínuo, processo físico-químico em batelada, ultrafiltração e termo-compressão, discutidos a seguir.

No processo evaporativo, o fluido em corte é recebido em um tanque de estocagem até sua classificação. O passo seguinte é uma filtração, onde se retira o sobrenadante (sub produto), que é levado para o re-refino. O fluido de corte filtrado vai para o evaporador à temperatura de 99-101°C. O concentrado oleoso resultante deste processo é destinado aos fabricantes de graxa, formuladores de óleo ou para a recuperadora.

O processo físico-químico em batelada é feito em um tanque com volume pré-definido, consiste na filtração do fluido de corte para retirada dos sólidos grandes. A desestabilização da emulsão é feita com produtos químicos, e o sobrenadante segue para o co-processamento ou para fábrica de graxa. A água resultante do processo é analisada e, se estiver de acordo com as especificações, é descartada (em rios) ou reaproveitada no processo.

O processo físico-químico contínuo segue as mesmas etapas do realizado em batelada, porém a borra levada ao filtro prensa e a torta formada é descartada em aterros sanitários.

O processo de termo-compressão é novo no Brasil, e a sua principal vantagem é que não há a necessidade de tratar os diferentes fluidos em separado. Todos os fluídos são misturados e após sofrerem o processo de evaporação sob pressão resulta em um concentrado oleoso, que segue para co-processamento, e água resultante do processo é reutilizada.

O custo (estimado pela Brasquip Ambiental S.A. no ano de 2005) para o descarte de uma tonelada de fluído de corte varia entre R\$ 190,00 a R\$ 300,00, dependendo da formulação do fluido de corte e do processo utilizado.

3.4 Biocidas

Biocidas ou agentes antimicrobianos são produtos químicos que contêm princípios ativos capazes de inibir, prevenir o desenvolvimento ou matar os microrganismos, sendo utilizados, geralmente a baixas concentrações, em diversos segmentos industriais, que envolvem água no processamento de seus produtos (Biocidal Products Directive, 1998).

As literaturas técnicas dos fabricantes de biocidas (IPEL, Buckman e Rohm & Haas, dentre outras) preconizam que os biocidas industriais devem possuir alguns requisitos básicos para poderem ser aplicados em diversos segmentos. Dentre eles, destacam-se: possuir amplo espectro de ação, apresentar mecanismos de ação diferentes para diminuir resistências, apresentar capacidade de permear a membrana celular, possuir baixa toxicidade a seres humanos e animais, não ser carcinogênico e mutagênico, apresentar boa solubilidade e dispersão alta em meio líquido, ser de baixo custo, possuir eficiência em baixas concentrações, ser de fácil manuseio, não inflamável, não irritante e biodegradável.

Os biocidas são divididos em dois grandes grupos, os oxidantes, que compreendem principalmente o cloro, bromo, seus derivados, peróxido de hidrogênio e ozônio, e os não oxidantes, que incluem, principalmente, glutaraldeído, fenóis, formalina, quaternário de amônio, surfatantes e a família das isotiazolinonas.

A maioria dos biocidas utilizados atualmente na usinagem de metais pertence ao grupo dos não oxidantes, mesmo que sua aplicação, ao contrário dos oxidantes, favoreça a capacidade de adaptação dos microrganismos, principalmente quando a subdosagem do produto é aplicada por período suficiente. Os biocidas oxidantes não são utilizados no segmento citado, por serem altamente reativos, não havendo residual disponível de agente ativo no sistema. Além disto, tais biocidas podem causar alterações nas características originais da emulsão e corrosão em equipamentos e tubulações, ocasionando troca antecipada de peças. Segundo Stewart e Raquepas (1995), a capacidade desinfetante de um biocida diminui muito quando o biocida é altamente reativo, pois este é consumido por reação com moléculas presentes no meio antes que o biocida chegue até as células-alvo.

Denyer (1998) relata que os principais alvos dos mecanismos de ação dos biocidas são a parede celular externa, a membrana celular e o citoplasma, destacando-se sua ação na síntese de enzimas. Por isso a composição química e as propriedades físico-químicas dos biocidas, além de suas interações com a EPS, devem ser analisadas cuidadosamente na escolha do antimicrobiano. A Tabela 2 mostra os mecanismos de ação das principais moléculas de biocidas utilizadas comumente.

É preciso cautela na utilização do biocida para o controle de biofilmes, pois a subdosagem pode trazer a falsa sensação de segurança, além de induzir a seleção de microrganismos mais resistentes e causar surtos de contaminação. As estratégias comuns de adição do biocida para minimizar o problema são fundamentalmente duas, o choque e a alimentação contínua.

Na estratégia de choque, uma alta concentração de biocida é adicionada ao sistema. É utilizada quando as formações dos biofilmes são intensas e quando a população de microrganismos no fluido é muito alta, pois nesta condição o sistema favorece a instalação e fixação rápida do biofilme (Lutey, 1995).

Tabela 2: Mecanismos de ação dos principais antimicrobianos (Burk, 1984).

Tipo de biocida	Alvo e mecanismo de ação	Vantagem	Desvantagem
Cloro e seus derivados	difusão pela membrana celular, reação química com enzimas citoplasmáticas, oxidando seus sítios ativos	excelente algicida e esporicida de baixo custo	corrosivo
Ozônio	difusão pela membrana celular, inativação de enzimas essenciais à respiração	bom esporicida	alto custo
Glutaraldeído	parede celular, provoca lise, dependendo da concentração é esterilizante	bactericida, fungicida e esporicida	toxicidade, difícil manuseio
Formaldeído	parede celular, provoca lise	bactericida, fungicida e esporicida	carcinogênico, difícil manuseio
Fenóis clorados	adsorção na parede celular, difusão para o citoplasma, formação de um colóide que precipita proteínas; lise celular	baixo custo, efeito residual prolongado	alta toxicidade e baixa eficiência em pH alcalino
Quaternário de amônio	sítios negativos da parede celular, causa lise; desnatura proteínas da membrana	algicida, bactericida e microbiostático	causa espuma e floculação no sistema
Organossulfurados	remove íon ferro indispensável para a respiração celular	suporta pH alcalino	alta toxicidade
Triazina	parede celular, inativa grupos sulfídricos de enzimas,	bom bactericida, baixo custo	pouco eficaz contra fungos
Isotiazolinonas (clorometilisotiazolona, metilisotiazolona, benzoisotiazolona)	interfere na respiração; inativa enzimas, parede celular	Além da ação bactericida é bom fungicida.	odor e alta toxicidade

A alimentação contínua é utilizada em sistemas microbiologicamente controlados. A concentração de biocida é menor, mantendo-se as condições biostáticas no sistema (Wills *et al.*, 1997).

Os biocidas produzidos pela IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda. mais utilizados nas indústrias de usinagem estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Biocidas produzidos pela IPEL Biocidas comumente utilizados em indústrias de usinagem de metais.

Biocida IPEL	Dosagem de uso (g/L)	Número CAS*	Grupo	Nome Químico dos ativos
BNP-115	3,0	52-51-7	Derivado halogenado	2-bromo-2nitropropano-1,3-diol
FBP-124	1,5	26530-20-1 21564-17-0 140-954 26172-55-4 2682-20-4	Compostos de Isotiazolinonas, mistura de compostos sulfurados e aldeído	2-n-octil-4isotiazolin-3-ona 2-tiocianometiltiobenzotiazol dimethylolurea 5-cloro-2metil-4-isotiazolin-3-ona 2-metil-4-isotiazolin-3-ona
FBP-128	1,0	26530-20-1 140-954 2634-33-5	Compostos de Isotiazolinonas e aldeído	2-n-octil-4isotiazolin-3-ona dimethylolurea 1,2-benzisotiazolin-3-ona
FBP-140	1,5	3811-73-2	Derivados sódicos	Sódio-2-piridinatiol-n-óxido
BP-180	1,2	4719-04-4	aldeído	Hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietil) s-triazina
BP-509	2,0	52-51-7 26172-55-4 2682-20-4	Compostos de Isotiazolinona, derivado halogenado	2-bromo-2nitropropano-1,3-diol 5-cloro-2metil-4-isotiazolin-3-ona 2-metil-4-isotiazolin-3-ona
FBP-417	5,0	26530-20-1 140-954 55406-53-6	Compostos de Isotiazolinona, derivado halogenado e aldeído	2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona dimethylolurea 3-iodo-2-propinil butil carbamato

* CAS (Chemical Abstracts Service), American Chemical Society, 2005.

3.5 Susceptibilidade de células planctônicas e sésseis a biocidas

Há muito se utiliza o teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC), que é o ensaio padrão para verificar a susceptibilidade de células planctônicas a antimicrobianos (Vanderzant, 1992), tanto na medicina como nas indústrias. Porém, quando se trata de células sésseis, este método não fornece as informações corretas quanto aos resultados, pois ensaios de susceptibilidade a biocidas efetuados em biofilmes mostram que a concentração de agente ativo requerido para erradicação do biofilme é de 100 a 1.000 vezes maior do que a determinada no MIC (Ceri *et al.*, 1999). Esta resistência se dá principalmente pelas EPS e pela composição da membrana externa e da parede celular, principalmente em bactérias Gram-negativas (Christensen e Characklis, 1990). Em adição tem-se o efeito de degradação e inativação dos biocidas por enzimas e metabólitos das células do biofilme, discutido em detalhes por Heinzl (1998).

Os estudos efetuados para prevenção, controle e remoção de biofilmes estão sendo conduzidos de forma mais teórica, uma vez que na prática, nos laboratórios e hospitais, devido ao alto custo e do tempo que demanda desde o início até o final dos testes, tem-se preferido, por exemplo, descartar catéteres do que eliminar o foco de contaminação, principalmente por nesses casos haver a necessidade de intervenção imediata (Morck *et al.*, 2001). Ensaio de susceptibilidade de biofilmes industriais a biocidas são poucos citados na literatura, porém o problema não é menos importante. Considerando-se que os custos envolvidos para uma indústria descartar seu material contaminado/deteriorado é bastante elevado, em instalações industriais é técnica e economicamente viável acompanhar a evolução e comportamento dos biofilmes, com a finalidade de se evitar ou minimizar o problema e garantir uma vida útil mais prolongada do sistema industrial como um todo.

3.6 Estratégias avançadas de controle e erradicação de biofilmes

Atualmente diversas técnicas são utilizadas para o controle dos biofilmes, sendo uma delas a utilização de enzimas degradadoras da matriz extracelular, o que torna os microrganismos mais susceptíveis à ação dos agentes

antimicrobianos (Johnsrud, 1997), potencializando a atividade microbiana sobre o biofilme. Entretanto, devido à complexidade e à dificuldade de se obter enzimas específicas adequadas e eficazes, e à heterogeneidade das matrizes extracelulares, essa abordagem ainda é economicamente inviável.

Hughes *et al.*, (1998) propuseram o uso de bacteriófagos capazes de produzir enzimas degradadoras dos polímeros da matriz extracelular. Esta estratégia também continua sendo pouco viável, principalmente devido à resistência dos microrganismos aos fagos, e em decorrência da grande variedade de espécies microbianas presentes nos biofilmes, acrescido ao pouco conhecimento sobre o comportamento dos microrganismos na forma sésil.

Outra técnica passível de utilização é baseada nos princípios do controle microbiológico, onde bactérias não-formadoras de biofilmes são inoculadas para competir com as bactérias formadoras de biofilmes, inibindo a sua formação (Hughes *et al.*, 1998).

Entretanto, até que essas técnicas sejam melhor estudadas e compreendidas, a utilização de biocidas para a prevenção, controle e erradicação de biofilmes ainda é a estratégia mais indicada para aplicação industrial. O uso de produtos antimicrobianos para esta finalidade deve ser feito com a premissa de que a molécula ativa, a dosagem e a sistemática de aplicação estejam corretos e adequados para o biofilme específico e o sistema fabril em questão. Caso contrário, um tratamento inadequado pode levar ao desenvolvimento de um consórcio microbiano resistente e a surtos de difícil erradicação. Como cada sistema possui uma matriz microbiana adaptada às condições da instalação, é primordial que estes biofilmes possam ser rápida e facilmente reproduzidos *in vitro*, para que a escolha do agente antimicrobiano, determinação da dosagem mínima/ótima para controlar e/ou erradicar o biofilme e da estratégia aplicação do mesmo sejam definidas.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Material

Amostras contaminadas: para efetuar os ensaios de formação de biofilme e susceptibilidade a biocidas, foi utilizado fluido de corte (emulsão composta por óleo mineral e água 5% v/v) contaminado, de uma empresa de usinagem de metais do estado de São Paulo. Este fluido (emulsão o/a) foi utilizado na indústria por dois anos e foi usado para o isolamento de cepas formadoras de biofilme. Uma amostra do óleo mineral concentrado foi obtida da mesma empresa, e foi utilizada na suplementação do meio mínimo como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos. Foram efetuados também testes em amaciante de roupa de uma empresa situada em Campinas, e caldo de cana contaminados de uma usina situada em Piracicaba com suas respectivas microbiotas.

Inóculos: Bactérias provenientes da amostra de fluido de corte contaminado tal qual recebido da indústria (inóculo 1) e uma suspensão mista preparada a partir dos microrganismos isolados desta amostra (inóculo 2) foram utilizadas nos principais ensaios deste estudo. Para os testes com amaciante de roupa e caldo de cana foi utilizada a microbiota contaminante natural de cada um dos sistemas de produção contaminados.

Meios de cultura: para a quantificação da população microbiana do fluido de corte contaminado, foram utilizados os meios de cultura: Tryptic Soy Agar (TSA) para detectar bactérias aeróbias totais e bactérias esporuladas, o meio utilizado para bactérias coliformes foi o Eosin Methylene Blue Agar (EMB), para bactérias anaeróbias, empregou-se o meio Fluid Thioglycollate Medium, (FTM); para bactérias sulfato-redutoras, usou-se o meio Postgate Medium B (formulado) e para fungos e leveduras, o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Para o isolamento e manutenção das bactérias foi utilizado o meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA). Para o teste de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, o meio utilizado foi o Davis Minimal Medium suplementado com óleo mineral, formulado e enriquecido com 5% de óleo mineral estéril (MMO). Para os ensaios de susceptibilidade e formação de biofilmes foram utilizados, além do meio de cultura TSA, também o

Tryptic Soy Broth (TSB). Todos os meios de cultura utilizados são da marca Difco e as suas formulações estão apresentadas no Anexo 1.

Biocidas: Os biocidas utilizados nos testes de susceptibilidade estão especificados na Tabela 3, a saber, BNP-115, FBP-124, FBP-128, FBP-140, BP-180, BP-509 e FBP-417, fornecidos pela empresa IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda (Jarinu, SP, Brasil).

Reagentes e soluções: ao longo do estudo foi utilizada água destilada estéril como diluente, conforme sugerido por Capelletti *et al.* (2005) para o preparo das suspensões de microrganismos para análise. Os corantes de Gram (Newprov) foram utilizados para análise dos isolados por microscopia e a separação em dois grandes grupos morfológicos (Gram-positivas e Gram-negativas). 1-octanol (Merck) foi utilizado para a determinação dos coeficientes de partição dos biocidas e solução salina (NaCl marca Synth a 0,85% m/v) foi utilizada como solução de lavagem.

Equipamentos: Os testes de promoção de crescimento microbiano foram realizados em estufa incubadora tipo BOD (marca TECNAL modelo 320 L) com temperatura controlada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A autoclave vertical com capacidade de 30 litros, da marca FANEM, foi utilizada para os procedimentos de esterilização. Um homogeneizador de sangue (marca Phoenix modelo AP-22) foi utilizado para proporcionar o cisalhamento necessário para a formação dos biofilmes. O Densimat (bioMérieux) foi utilizado para o ajuste da concentração da suspensão de microrganismos. O microscópio óptico binocular (marca Olympus, modelo BH2) foi empregado nas análises de microscopia. O sonicador de bancada (marca Thornton, modelo USC1450, 25 khz) foi utilizado para liberar o biofilme formado nas superfícies dos dispositivos no meio de cultura. Uma mesa agitadora (com movimento oscilatório), com inclinação de 5° e 10 oscilações por minuto, projetada e construída por Fernando Zago, mestre em Engenharia Elétrica pela Universidade Estadual de Campinas, foi utilizada para a formação de biofilmes e nos testes de eficácia a antimicrobianos. Outros equipamentos empregados foram capela de fluxo laminar vertical (VECO, modelo VLFS-12), viscosímetro da marca Brookfield modelo LVDV-I+, medidor de pH marca Digimed modelo DM-20, centrífuga (marca Fanem modelo 206 MP), cromatógrafo marca Hewlett Packard

(HP) série 1100 e sistema de peneiras vibratório (Bertel, modelo 1868), com unidades de mesh 12, 16, 24, 48 e fundo não perfurado.

Outros Materiais: para realização dos ensaios foram utilizados tubos de ensaio com tampa de rosqueável nos tamanhos 16x150 mm e 16x100 mm, esferas (pérolas) de vidro de 0,85 mm, modelo U 20 (Só Esferas) e esferas de 3 mm (Labcenter) de diâmetro médio, dispositivo MBECTM fabricado por MBEC Bioproducts, Canadá (modelo HTP, *High-throughput screening*), micropipetas de volume variável de 100 a 1000 µL (marca Brand), ponteiras descartáveis, cureta de aço inoxidável da marca Edlo nº03 de 30 cm de comprimento, alicate de bico curvo, pinça curva de aço inoxidável marca Ervinguth modelo Crile (16 cm de comprimento), microplacas de 96 poços (tipo ELISA) de poliestireno marca Labcenter, placas de Petri estéreis e descartáveis, frasco de reagente tipo Schott com capacidade para 250 mL e 500 mL e alça de inoculação de 10 µL. Todos os materiais citados foram devidamente esterilizados antes de sua utilização.

4.2 Metodologia

Todos os ensaios foram realizados nos Laboratórios da IPEL Itibanyl produtos Especiais Ltda. Os testes foram executados em capela de fluxo laminar, em uma sala asséptica com pressão positiva.

Devido ao alto custo do dispositivo MBECTM, alguns dos resultados da formação dos biofilmes e susceptibilidade a agentes antimicrobianos assim como dos testes de caracterização do fluido de corte foram obtidos em parceria com Raquel Vannucci Capelletti, que desenvolveu tema de dissertação de mestrado em assunto correlato na área de concentração Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da FEQ/UNICAMP.

4.2.1 Caracterização do fluido de corte

Para estabelecer as diferenças entre o fluido de corte contaminado com dois anos de uso e o fluido de corte recém preparado (sem contaminação

microbiana), foram avaliadas as seguintes características físico-químicas: pH, viscosidade, densidade e contagem microbiológica.

A viscosidade e o pH foram medidos nos equipamentos citados no item materiais (4.1). A densidade foi calculada pela relação entre a massa e o volume da amostra.

A população microbiana foi mensurada na amostra através de diluição em série e plaqueamento de profundidade nos meios de culturas TSA, SDA e EMB. A técnica do número mais provável (NMP) foi utilizada para verificar a população de bactérias anaeróbias totais em meio FTM e de bactérias sulfato redutoras em meio Postegate B.

A técnica de NMP é considerada como um método de detecção indireto ou estimativo, baseado em probabilidade estatística. Esta estimativa é obtida por diluições seriadas das amostras, com transferência de alíquotas para tubos múltiplos (3 ou 5 por diluição). Após incubação, o crescimento é anotado, na forma de números de tubos com crescimento positivo sobre o número total de tubos por diluição. A combinação obtida é convertida em NMP através de uma tabela NMP padrão.

4.2.2 Avaliação dos coeficientes de partição dos biocidas

Este teste foi efetuado para verificar a capacidade de permeação dos biocidas em membranas biológicas, a partir da avaliação da partição deste ativo entre a fase aquosa e a orgânica. O teste de coeficiente de partição foi realizado com base nos procedimentos descritos por Moraes (1996) e Justo (1999), utilizando o sistema água/1-octanol, que simula adequadamente o microambiente das membranas celulares.

Previamente, o 1-octanol foi saturado adicionando-se 13 mL de água deionizada a 130 mL de 1-octanol, deixando em repouso por uma noite. Após o repouso, em tubos de ensaio com tampa de rosca, foi efetuada a mistura de uma alíquota de 3 mL de solução aquosa de cada biocida (diluídos previamente para sua concentração de uso) e 3 mL de 1-octanol saturado. Estes tubos foram homogeneizados através de 30 inversões manuais e incubados por 30 minutos à

temperatura de 25°C. Para assegurar a eficiente separação de fases, as amostras foram centrifugadas a 200 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação foi coletada uma amostra da fase aquosa e as concentrações do agente antimicrobiano foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

A concentração do biocida na fase de 1-octanol foi estimada pela diferença entre a concentração adicionada inicialmente e a determinada na fase aquosa. O coeficiente de partição (P) foi calculado pela razão entre as concentrações do agente antimicrobiano na fase hidrofóbica (1-octanol) e a concentração na fase aquosa.

4.2.3 Determinação do diâmetro médio das esferas de vidro

A avaliação e seleção do tamanho das esferas de vidro foram efetuadas visando à utilização de uma população homogênea possível, minimizando erros na metodologia.

A determinação da distribuição de tamanho das esferas foi realizada utilizando um sistema de peneiras vibratórias com peneiras de mesh 12, 16, 24, 48 e fundo não perfurado, com abertura para partículas com diâmetros equivalentes a 1,41; 1,00; 0,71 e 0,297 mm, respectivamente. As peneiras foram pesadas e montadas no sistema. As esferas de vidro foram colocadas na peneira de mesh 12. Após intervalos de vibração consecutivos de 15 minutos, o sistema foi desligado e as peneiras com as frações de amostras foram novamente pesadas até atingir massa constante.

Após a separação foi determinada a área superficial e a área específica da amostra que apresentou a maior retenção de esferas retidas em uma única peneira

4.2.4 Isolamento das cepas do fluido de corte contaminado

Cepas de bactérias presentes como contaminantes no fluido de corte foram isoladas e caracterizadas para posterior preparo de suspensão microbiana mista.

A partir da diluição em série do fluido de corte contaminado e seu plaqueamento em profundidade (*"pour plate"*) em meio de cultura TSA (Maturin e Peeler, 2001), as cepas de bactérias foram isoladas, por estrias de esgotamento sucessivas. As cepas sofreram coloração com os reagentes de Gram e foram divididas em dois grupos, bactérias Gram-positivas, coradas de azul/violeta, ou Gram-negativas coradas de vermelho. Estes isolados foram utilizados posteriormente como inóculo 2 para o desenvolvimento dos testes de formação de biofilmes e susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

4.2.5 Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos

Este ensaio foi efetuado para auxiliar na caracterização do fluido de corte contaminado utilizado como inóculo nos ensaios posteriores.

Nas cepas isoladas foi efetuado o teste de degradação de hidrocarboneto baseado na metodologia descrita por Morton (1987). O método utiliza o Davis Minimal Medium suplementado com óleo mineral (MMO), formulado, meio de cultura que tem por fontes de carbono o citrato de sódio e o óleo mineral. Alíquotas de 20 a 25 mL foram dispensadas em placas de Petri estéreis e após solidificação do meio de cultura, cada cepa isolada foi estriada na superfície do meio MMO enriquecido. As placas foram incubadas por até 7 dias à temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A cepa foi considerada degradadora de hidrocarboneto se utilizasse em seu metabolismo o carbono fornecido pelo óleo. Esse fenômeno é evidenciado pela formação de uma zona mais clara ao redor das estrias (Figura 6A). Se a cepa não for degradadora de hidrocarbonetos, não se verifica a formação da zona clara ao redor da cultura crescida, conforme mostra a Figura 6B, pois as bactérias, neste caso, utilizam como fonte nutritiva o carbono do citrato de sódio presente no meio de cultura diferentemente do indicado, na Figura 6C onde não houve crescimento microbiano.

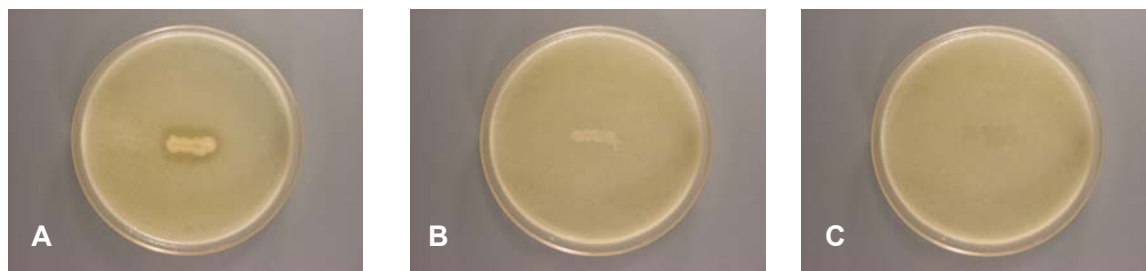


Figura 6: Resultados típicos do teste de degradação de hidrocarboneto: (A) formação de halo (claro) ao redor da cultura crescida por bactérias degradadoras de hidrocarboneto, (B) crescimento de bactérias não degradadoras, que utilizam carbono de outra fonte, e (C) sem crescimento.

4.2.6 Preparo dos inóculos

4.2.6.1 Inóculos para testes com a emulsão óleo/água

Para o desenvolvimento dos testes de formação de biofilmes e de susceptibilidade aos biocidas foram utilizados dois tipos de inóculos, que foram preparados como descrito a seguir.

4.2.6.1.1 Inóculo 1: A amostra de emulsão óleo/água contaminada foi utilizada diretamente como suspensão de inóculo, tendo-se como objetivo obter um consórcio microbiano em que foram preservadas, as interações entre os microrganismos e o meio ao qual estavam adaptados. A concentração celular foi determinada por diluição seriada e posterior plaqueamento por profundidade.

4.2.6.1.2 Inóculo 2: A partir de cada uma das cepas isoladas foram feitos dois repiques sucessivos de 24 horas em tubos inclinados de TSA, para a obtenção de células na mesma fase de crescimento. Com o auxílio de uma alça de inoculação foi preparada, em solução salina, a suspensão microbiana de 10^{10} UFC/mL de cada um dos isolados. As suspensões foram misturadas em partes iguais em um

frasco tipo Schott estéril, formando o inóculo para posterior utilização. A contagem microbiana deste inóculo misto foi padronizada no Densimat com leitura de 0,5 da escala de McFarland (Anexo 2), e validada por plaqueamento.

4.2.6.2 Inóculos para testes com amaciante de roupa e caldo de cana

Os testes de formação de biofilmes e de susceptibilidade aos biocidas para as amostras de amaciante de roupa e caldo de cana foram efetuados utilizando como inóculo as próprias amostras contaminadas.

4.2.7 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração mínima de morte (CMM) para células planctônicas presentes na emulsão óleo/água

A MIC é a concentração microbiostática, ou seja, a menor concentração de biocida necessária para impedir a proliferação celular, inibindo o seu crescimento. A CMM é a concentração microbicida, ou seja, a menor concentração de biocida necessária para erradicar as células planctônicas.

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) é fundamental para a escolha correta do biocida nos sistemas industriais, minimizando os erros de dosagens.

Para o teste de concentração inibitória mínima das bactérias planctônicas, foi utilizado o inóculo 1 obtido diretamente da emulsão contaminada a uma concentração celular de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL.

Soluções dos biocidas com concentração três vezes maior que a concentração de uso foram utilizadas para o teste de MIC. Essas soluções foram diluídas à proporção de 1:1 v/v (a concentração inicial ficou diluída à metade), até a concentração de 1,56% da inicial. Essas diluições foram efetuadas adicionando-se 3 mL da solução de biocida em 3 mL do meio de cultura TSB previamente contaminado com 1% do inóculo 1 (fluido de corte contaminado). Após homogeneização, foi retirada uma alíquota de 3 mL e adicionada ao tubo seguinte. O processo foi repetido até a diluição desejada. Neste ensaio foram efetuadas

sete transferências de 1:1 (v/v). Os tubos controles continham: meio de cultura TSB como controle negativo, meio de cultura com o inóculo como controle positivo, e meio de cultura contendo biocida para controle da turbidez. O crescimento bacteriano foi evidenciado pela turbidez do meio de cultura. A menor concentração na qual não houve crescimento foi assumida como a concentração inibitória mínima.

Após leitura dos resultados da MIC, o meio de cultura dos tubos com resultados negativos foram estriados em meio de cultura TSA para a determinação da concentração mínima de morte dos microrganismos (CMM).

4.2.8 Avaliação do efeito do diâmetro das esferas de vidro na formação do biofilme e determinação do período de sonicação na recuperação celular

Este ensaio visou determinar qual o diâmetro de esfera mais adequado para ser utilizado na metodologia proposta, de acordo com os testes de formação e susceptibilidade do biofilme gerado a partir do fluido de corte contaminado, e qual o período de sonicação mais adequado para recuperar as células que compõem o biofilme, evitando a perda por lise.

Os ensaios foram efetuados em triplicata para cada biocida e suas respectivas concentrações.

Em tubos de ensaio com tampa de rosca (16x100 mm) foram pesadas alíquotas de 0,3 g de esferas de vidro (por tubo) apresentando diâmetros médios de 0,85 e 3,00 mm. Aos tubos foram adicionados 4,5 mL de emulsão contaminada contendo $1,0 \times 10^9$ UFC/mL (inóculo 1) e 0,5 mL de meio de cultura TSB. Esses tubos foram colocados no sistema projetado para homogeneização de sangue (Figura 7) na velocidade de agitação de 4 a 5 rotações por minuto, por 48 horas à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$.



Figura 7: Homogeneizador de sangue.

Após períodos de incubação de 24 e 48 horas, as esferas foram removidas com auxílio de uma cureta, transferidas para novos tubos de ensaio estéreis, e lavadas duas vezes com solução salina estéril. Após as lavagens adicionou-se 5 mL de água destilada estéril e os tubos foram levados ao sonicador. Após 20, 30 e 40 minutos de sonicação, alíquotas de 1 mL de cada um dos tubos foram retiradas e serialmente diluídas até 10^{-8} , com posterior plaqueamento em profundidade em meio de cultura TSA. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias foram quantificadas por inspeção visual nas placas contendo de 30 a 250 colônias.

Após a formação do biofilme e a remoção das esferas, foram adicionados 5 mL de água destilada estéril aos tubos (agora vazios), que foram sonicados por 20, 30 e 40 minutos. Após este período, alíquotas de 1 mL foram diluídas em série até a diluição 10^{-8} e plaqueadas, para verificar se o biofilme formado na parede interna do tubo de ensaio representava uma parcela significativa das células consideradas como aderidas.

O tempo de sonicação foi selecionado após a escolha do diâmetro das esferas, seguindo a metodologia acima descrita, acrescido de uma série de ensaios contendo também o inóculo 2 (cepas isoladas).

4.2.9 Análise da susceptibilidade aos biocidas do biofilme desenvolvido na superfície das esferas de vidro

Após o crescimento dos biofilmes, obtidos tanto a partir das amostras de fluido de corte quanto de amaciante de roupas e caldo de cana contaminados, como mencionado no item 4.2.8, as esferas foram retiradas com auxílio de uma cureta e foram lavadas por duas vezes com solução salina estéril, em tubos de ensaio com tampa de rosca. Após a lavagem, a cada tubo, adicionou-se 2,5 mL de biocida a várias concentrações e 2,5 mL do meio de cultura TSB. Os tubos foram incubados por 24 horas. Após a incubação, as pérolas foram lavadas com solução salina estéril e transferidas para tubos contendo 5mL de meio de cultura TSB fresco. Os tubos foram sonicados por 30 minutos e incubados por 24 horas à temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, quando foi avaliado o crescimento celular, por turbidez ou estrias em meio de cultura TSA. A menor concentração na qual não se verificou crescimento de células foi denominada como concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB).

4.2.10 Formação de biofilme no dispositivo MBEC™

Nestes ensaios foram empregados quatro inóculos distintos, sendo os inóculos 1 e 2 obtidos a partir do fluido de corte contaminado conforme descrito no item 4.2.6.2.1 e 4.2.6.2.2, e os inóculos restantes, as amostras de amaciante de roupas e caldo de cana contaminados, com concentração celular ajustada para $1,0 \times 10^9$ UFC/mL.

O dispositivo MBEC™, como descrito anteriormente, apresenta fundo retangular com 8 canais e uma tampa com 96 pinos onde as células se fixam formando o biofilme microbiano (Figuras 8A e 8B). Em fundos distintos foram adicionados 22 mL de cada um dos inóculos padronizados ($1,0 \times 10^9$ UFC/mL), e 2mL de meio de cultura TSB. Os dispositivos foram tampados e transferidos para uma mesa agitadora do tipo gangorra, com velocidade de 4 a 5 oscilações por minuto e inclinação de 5° , posicionando-os de forma que o fluxo do meio de cultura na base do dispositivo ficasse direcionado no sentido dos canais. O crescimento microbiano foi efetuado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas para permitir a

formação dos filmes em cada um dos pinos com população microbiana superior a $1,0 \times 10^6$ UFC/pino.

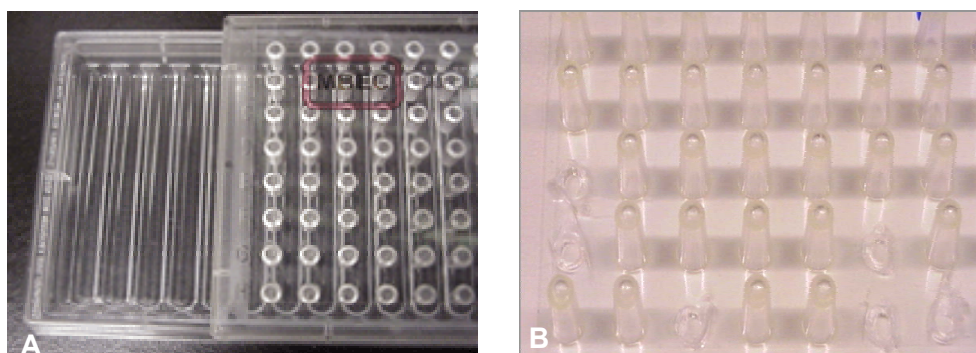


Figura 8: Placa de cultivo do dispositivo MBEC™ : (A) fundo com poços em forma de canais; (B) tampa com 96 pinos (fonte: Marques *et al*, 2004).

Após a incubação e em ambiente asséptico, os pinos controle foram removidos da tampa do dispositivo com o auxílio de uma pinça curva, e transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca (16x100 mm) contendo 5 mL de diluente, os quais foram sonicados por 30 minutos. Uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada um dos tubos e diluída em série até 10^{-8} . As amostras foram plaqueadas por profundidade em meio de cultura TSA e incubadas por 48 horas, selecionando-se as diluições que forneceram placas contendo de 30 a 250 unidades formadoras de colônias para determinação da contagem celular.

4.2.11 Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes desenvolvidos no dispositivo MBEC™

A formação do biofilme foi feita conforme descrita no item anterior para as diferentes amostras em teste (fluido de corte, amaciante de roupa e caldo de cana). Após 48 horas de incubação, a tampa do dispositivo MBEC™ foi retirada e lavada por duas vezes com solução salina, para remoção das células planctônicas. Esta lavagem foi efetuada colocando-se a tampa do dispositivo em uma placa do tipo ELISA com 96 poços, contendo 0,2 mL de solução salina estéril por poço. Após a lavagem, a tampa do dispositivo foi encaixada em outra microplaca (tipo ELISA) com 96 orifícios, cada um contendo 0,1 mL das diferentes

concentrações dos biocidas e 0,1 mL do meio de cultura TSB, de modo a encaixar um pino em cada poço. As placas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação, a tampa foi novamente lavada com solução salina e colocada em uma nova microplaca contendo 200 μL (0,2 mL) de meio TSB fresco por poço. Após 30 minutos de sonicação, a placa foi incubada por mais 24 horas, quando, então, foi verificado o crescimento celular por turbidez ou por estrias em meio TSA. A menor concentração na qual não foi verificado o crescimento de células foi denominada, como anteriormente descrito, concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do fluido de corte contaminado

A determinação da concentração de bactérias heterotróficas totais, da densidade, da viscosidade e do pH foi realizada na emulsão óleo/água estéril e na emulsão contaminada, e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da caracterização do fluido de corte contaminado e livre de contaminantes.

Amostra	Bactérias heterotróficas totais (UFC/mL)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (cp)	pH
Fluido sem contaminação	$< 10^2$	1,00	3,0	9,68
Fluido com 2 anos de uso	$5,6 \times 10^8$	0,99	48,0	6,71

Pode-se verificar que a densidade não foi afetada pelo aumento da população microbiana, enquanto que a variação do pH e da viscosidade eram esperadas. O pH foi reduzido provavelmente pela liberação dos metabólitos excretados pelas bactérias, principalmente ácidos orgânicos sintetizados no metabolismo celular. O aumento da viscosidade pode ser atribuído principalmente ao aumento da população de bactérias heterotróficas totais, à presença de debris celulares decorrentes de lise e ao aumento da quantidade de EPS.

Runge (1989) afirma que o pH ideal para o fluido de corte em uso é 8,7 ou superior. Quando abaixo deste valor, deve-se adicionar um agente alcalinizante e um biocida para manter a população microbiana inferior a 10^4 UFC/mL.

A quantificação da população microbiana dos fluidos de corte com e sem contaminação foi efetuada através de diluição seriada e posterior plaqueamento profundidade utilizando os meios de culturas TSA, SDA, EMB, FTM e Postegate B.

A Tabela 5 mostra a microbiota encontrada, verificando-se a prevalência das bactérias.

Tabela 5: População microbiana detectada no fluido de corte contaminado.

Microrganismos	Fluido de corte sem contaminação (UFC/mL)	Fluido de corte contaminado (UFC/mL)
Bactérias Totais	<100	$5,6 \times 10^8$
Bactérias anaeróbias totais	<100	$5,3 \times 10^3$
Bactérias sulfato-redutoras	< 100	$2,0 \times 10^3$
Fungos	<100	<100
Leveduras	<100	<100

O fluido de corte contaminado utilizado nos testes foi descartado pela empresa que o cedeu, pois estava fora das especificações de uso. Entretanto, os testes a seguir foram efetuados com o intuito de se verificar a possibilidade de recuperação deste fluido, para que em caso de reincidência, a emulsão não venha a ser descartada, e sim, recuperada.

5.2 Isolamento das cepas

O isolamento e a caracterização das cepas presentes no fluido de corte contaminado foi efetuado para verificar os tipos de contaminantes presentes na amostra, e para viabilizar sua utilização como inóculo misto (inóculo 2) nos testes de formação de biofilmes e de susceptibilidade aos biocidas. Visou-se, assim, verificar se os resultados obtidos nos ensaios diferem dos encontrados quando se utiliza como inóculo o fluido de corte contaminado para o mesmo fim, já que a técnica de isolamento é bastante comum em ensaios microbiológicos tradicionais.

Após o isolamento e a purificação das bactérias heterotróficas totais presentes na amostra de fluido contaminado, foi efetuada a coloração de Gram. Obteve-se um total de 43 cepas (Tabela 6), das quais 14% não foram propagáveis em laboratório, ou seja, não apresentaram crescimento visível após o primeiro

repique, quando o teste de Gram foi efetuado. Esses microrganismos são encontrados em amostras do ambiente adaptados ao seu habitat natural, e o fato de não ser possível mantê-los viáveis em laboratório indica que muitas espécies necessitam do ambiente natural e da interação em consórcio microbiano para a manutenção do seu crescimento e reprodução (Lennox *et al.*, 2006). Muitos estudos estão sendo efetuados visando formular meios de culturas e técnicas alternativas para sua avaliação, dentre elas a identificação genética e a observação direta por microscopia confocal.

Tabela 6: Cepas isoladas do fluido de corte contaminado

Cepas isoladas	Bactérias		
	Gram +	Gram -	Não propagáveis
43	1	42	6

Dentre as cepas isoladas, 97,67% são bactérias do grupo das Gram-negativas, que são citadas como as maiores responsáveis pela formação de biofilmes (Christensen e Characklis, 1990), devido principalmente aos apêndices celulares, que facilitam sua locomoção e adesão (Tortora, 2000). Esses microrganismos possuem maior facilidade para se adaptarem a condições adversas que as bactérias Gram-positivas. Possuem ainda maior resistência a agentes antimicrobianos, devido principalmente à composição de sua parede celular, que é constituída de uma bicamada fosfolipoproteica que é uma barreira osmótica à permeação de determinadas substâncias, e neste caso dificulta a penetração de biocidas. Por esses motivos, as bactérias Gram-negativas são consideradas as grandes causadoras de problemas microbiológicos, principalmente nos segmentos estudados.

As bactérias Gram-positivas também são citadas na literatura, porém com menos freqüência, e fazem parte da estrutura do biofilme. Na maioria dos casos descritos na literatura, estes microrganismos (bactérias Gram-positivas) foram detectados em meio de cultura Manitol Agar, que favorece seu crescimento. Tais

bactérias têm maior importância na área médica e em plaqueamentos com meios de culturas não seletivos, as bactérias Gram-positivas perdem a competição, principalmente devido à especificidade dos resíduos de carboidratos da parede pela superfície, aparecendo assim, em menor número. Entretanto, não significa que elas não formam biofilmes *in vitro*, visto que as bactérias Gram positivas estão presentes com muita frequência nas indústrias sucroalcooleiras, que frequentemente apresentam este problema.

5.3 Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos das bactérias isoladas

O teste de degradação de hidrocarbonetos foi efetuado nas cepas isoladas cultiváveis que foram obtidas a partir do fluido contaminado. Dos 37 isolados testados, 23 (62,2%) apresentaram-se positivos para a degradação de hidrocarbonetos. A importância deste grupo de bactérias reside no fato que elas estão envolvidas diretamente na desestabilização da estrutura da emulsão, quebrando as cadeias de hidrocarboneto em cadeias menores, o que altera as propriedades do fluido, causando separação de fases do fluido e alteração de viscosidade, entre outros problemas. Enfim, estas bactérias podem comprometer consideravelmente a qualidade final da peça usinada, além de reduzir a durabilidade da emulsão.

Segundo Lima (1975), dentre os microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, a maioria são bactérias e actinomicetos; os fungos filamentosos e as leveduras aparecem em menor número.

Embora haja muitos estudos sobre a degradação de hidrocarbonetos por microrganismos, ainda não se conhece com exatidão as fases deste processo. Considera-se, de maneira geral, que os microrganismos podem modificar ligeiramente a estrutura do hidrocarboneto, ou provocar mudanças profundas rompendo cadeias e formando compostos orgânicos variados, como, por exemplo, ácidos, álcoois e cetonas (Lima,1975). Porém, respostas mais claras a estas especulações somente serão obtidas com uma melhor compreensão das microbiotas envolvidas, incluindo aquelas não cultiváveis.

5.4 Avaliação dos coeficientes de partição dos biocidas testados

O coeficiente de partição é calculado pela razão entre a concentração dos ativos distribuídos entre a fase 1-octanol (hidrofóbica) e a fase aquosa (hidrofílica), indicando onde tenderia a se concentrar a maior parte dos ativos. O coeficiente de partição pode também indicar indiretamente a capacidade de permeação dos diferentes biocidas através de membranas biológicas. Os compostos que apresentam maior permeação através da membrana são geralmente moléculas pequenas que possuem regiões predominantemente hidrofóbicas e não apresentam carga, porém estes resultados devem ser convalidados com os testes microbiológicos de eficácia antimicrobiana, pois neste caso não se considera a reatividade dos princípios ativos e sim a hidrofobicidade de cada um deles.

O coeficiente de partição foi determinado para os sete biocidas utilizados no estudo. Após cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) da fase aquosa da mistura, o coeficiente de partição foi calculado para cada princípio ativo que compõe os biocidas testados e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que, exceto pela clorometilisotiazolinona presente no FBP-124, todos os demais agentes ativos mostraram maior tendência de acúmulo na fase oleosa. Os biocidas com maior probabilidade de permear a membrana celular foram o FBP-140 e o FBP-417, seguido pelo FBP-128.

Observa-se também que o coeficiente de partição de um mesmo agente ativo varia de acordo com a formulação do biocida, como é o caso do bronopol nos biocidas BNP-115 e BP-509, da metilisotiazolinona e da clorometilisotiazolinona nos biocidas BP-509 e FBP-124 e da benzoisotiazolinona nos biocidas FBP-417 e FBP-128. Estes resultados indicam que interações entre os diferentes ativos em um mesmo biocida podem estar ocorrendo, levando a diferentes acumulações entre as fases aquosa e oleosa para distintas combinações de ativos.

Tabela 7: Coeficientes de partição dos agentes ativos dos biocidas utilizados.

Biocida	Princípio ativo	Coeficiente de partição, P (moles/L)	Log (P)
BNP-115	Bronopol	1,54	0,19
	Bronopol	2,12	0,33
BP-509	Metilisotiazolinona	3,38	0,53
	Clorometilisotiazolinona	2,88	0,46
	N-octilisotiazolinona	>>10	>>1
FBP-417	Benzoisotiazolinona	88,23	1,95
	Carbamato e dimetiloluréia	113,33	2,05
FBP-124	Metilisotiazolinona	7,66	0,88
	Clorometilisotiazolinona	1,00	0,00
	TCMTB	2,23	0,35
	N-octilisotiazolinona	>>10	>>1
FBP-140	Piritionato	81,81	1,91
	Benzoisotiazolinona	56,52	1,75
FBP-128	N-octilisotiazolinona e dimetiloluréia	>>10	>>1
BP-180	Triazina	2,703	1,62

Este fenômeno pode explicar, em parte, porque alguns biocidas formados pela mistura de princípios ativos apresentam eficácia global (sinergismo) superior aos mesmos compostos quando utilizados isoladamente, e também o porquê de algumas combinações de ativos antimicrobianos resultarem em atividades antagônicas (redução da eficácia quando em mistura).

Com base apenas na capacidade potencial de permeação dos agentes ativos através das membranas celulares, seria de se esperar que aqueles com maior coeficiente de partição fossem os mais eficazes no controle do crescimento microbiano.

Para facilitar a análise dos resultados, as fórmulas estruturais dos princípios ativos são apresentadas na Figura 9.

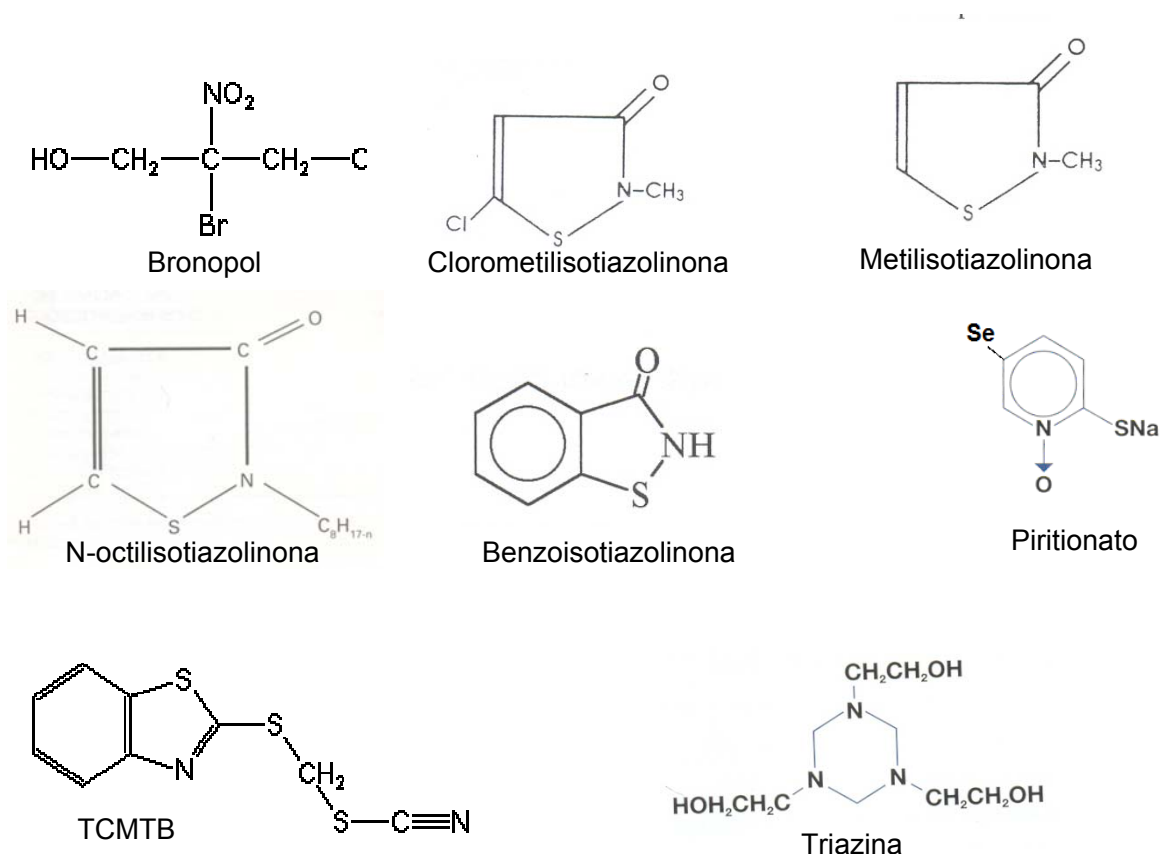


Figura 9: Fórmulas estruturais das moléculas de princípio ativo dos biocidas testados.

Pela análise das formulas estruturais, o agente ativo com maior caráter hidrofóbico seria a N-octilisotiazolinona, o que é corroborado pelos dados do coeficiente de partição, que indicam a concentração de ativos predominantemente na fase hidrofóbica.

5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração mínima de morte (CMM) para células planctônicas

A MIC é definida como a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para impedir o aumento da população de microrganismos. A CMM é definida como a quantidade mínima do biocida para eliminar os microrganismos.

A análise da concentração inibitória mínima (MIC) foi efetuada para determinar qual o agente antimicrobiano oferece melhor relação custo/benefício no controle da contaminação causada por células planctônicas do fluido de corte contaminado (inóculo 1). Assim, o biocida pode ser utilizado de maneira correta, evitando-se a subdosagem, que causa a falsa sensação de segurança, ou a supradosagem, que causa custos e riscos desnecessários. A Tabela 8 mostra que para todos os biocidas testados, os resultados de MIC para as células planctônicas na emulsão contaminada foi sempre inferior à concentração de uso. Isto indica que a dosagem preconizada garante o controle do crescimento celular, com um residual de agente antimicrobiano capaz de manter o fluido sem o crescimento do contaminante planctônico por um dado período, sem nova adição de biocida.

A concentração mínima de morte (CMM) das células planctônicas foi muito próxima à MIC para a maioria dos biocidas testados, com exceção do FBP-140, que requer uma concentração quatro vezes maior que a inibitória para matar as bactérias presentes na emulsão. Este resultado já era esperado devido à característica predominantemente bacteriostática, e não bactericida, deste produto, que apresenta o piritionato como único princípio ativo antimicrobiano.

Os resultados do coeficiente de partição corroboram, em parte, com os resultados encontrados no teste de MIC, pois o FBP-140 mostrou ser um dos dois biocidas com maior probabilidade de permeação pela membrana e a maior ação bacteriostática que os demais biocidas testados. Entretanto, o fato do coeficiente de partição de alguns princípios ativos serem altos, não confere a melhor eficácia de erradicação aos biocidas que os contêm.

A maioria dos biocidas comercialmente utilizados possui mais de um princípio ativo em sua formulação, conforme mostrado na Tabela 3. Esta combinação confere ação bacteriostática e bactericida no fluido de corte, ampliando o espectro de ação do biocida e maximizando a atividade antimicrobiana.

Os biocidas mais eficientes foram o FBP-140 (bacteriostático) e o BNP-115 (bactericida), pois foram eficazes na inibição bacteriana a uma concentração muito

inferior às dosagens de uso preconizadas, deixando disponível 95,3% de residual de agente antimicrobiano, valor este bem acima dos demais biocidas testados. Contudo, como já mencionado anteriormente, o FBP-140 tem ação bacteriostática mais pronunciada e pode proporcionar a falsa sensação de segurança, uma vez que o espectro de ação é bastante limitado.

Tabela 8: Custo de cada biocida testado por tonelada de emulsão e seus resultados no teste de MIC e CMM para células planctônicas presentes na emulsão contaminada.

Biocida IPEL	Custo do Biocida*	Dosagem tradicional (% v/v)	Faixa de concentrações avaliadas (% v/v)	MIC (% v/v)	CMM (% v/v)
BNP-115	4,00	0,30	0,007 a 0,45	0,014	0,014
FBP-124	10,00	0,15	0,003 a 0,22	0,056	0,056
FBP-128	8,00	0,10	0,002 a 0,15	0,075	0,075
FBP-140	26,00	0,15	0,003 a 0,22	0,007	0,028
BP-180	4,00	0,12	0,003 a 0,18	0,045	0,045
BP-509	4,00	0,20	0,046 a 0,30	0,075	0,075
FBP-417	35,00	0,50	0,011 a 0,75	0,093	0,093

* Custo do biocida: Reais/tonelada de emulsão, baseada na dosagem tradicional.

A avaliação da relação custo/benefício de cada um dos biocidas (Tabela 8), mostrou que nas condições preconizadas pelo fornecedor, o BNP-115 é o biocida que apresenta a relação mais atrativa, seguidos pelos biocidas FBP-140, FBP-124, BP-509 e BP-180, com valores equivalentes, enquanto o FBP-417 foi a opção menos indicada tanto com base nos resultados da MIC quanto de CMM.

5.6 Determinação do diâmetro médio das esferas de vidro

Para o estabelecimento do protocolo experimental a ser empregado nos testes de formação e de susceptibilidade dos biofilmes, a caracterização das esferas de vidro foi fundamental na escolha do diâmetro médio apropriado.

Uma vez que as partículas com diâmetro médio nominal de 0,85 mm mostraram-se apenas razoavelmente heterogêneas quando analisadas a olho nu, seu diâmetro médio efetivo foi determinado pela reclassificação em sistema de múltiplas peneiras.

A Tabela 9 apresenta os resultados após estabilização da massa das várias frações da amostra nas peneiras com diferentes aberturas. Observa-se que pelo menos 95,9% das partículas ficaram retidas na peneira de mesh 24, correspondendo ao diâmetro médio de 0,85 mm. Durante a caracterização das esferas no sistema de peneiras, ocorreu uma perda de 2,35 g (0,30%) em relação ao total de esferas no início do processo. As esferas com diâmetro médio superior a 1 mm (mesh 16 e 12) e as com diâmetro médios inferior a 0,71 mm (mesh 48) foram descartadas.

No caso das partículas com diâmetro médio nominal de 3 mm, de acordo com o fornecedor, 95% das esferas apresentam este tamanho e, como sua heterogeneidade era visivelmente menor, as mesmas não foram reclassificadas.

Tabela 9: Determinação da distribuição de diâmetros das esferas de vidro com tamanho nominal de 0,85mm.

Abertura da peneira	Massa de partículas retidas (g)	Porcentagem do total (%)
Mesh 12 (1,41 mm)	0,01	0,001
Mesh 16 (1,00 mm)	29,54	3,893
Mesh 24 (0,71 mm)	727,82	95,910
Mesh 48 (0,297 mm)	1,14	0,150
Fundo	0,31	0,041
Total (g)	758,82	100,00

A área superficial e a área específica das esferas foram calculadas e comparadas com a área superficial de um pino do dispositivo MBECTM e do tubo de ensaio utilizado no teste de formação dos biofilmes (Tabela 10).

De acordo com as áreas superficiais dos sistemas em estudo, para a realização dos ensaios cada tubo deveria conter aproximadamente 0,06 g de esferas de vidro. Entretanto, é operacionalmente inviável o manuseio desta quantidade de material com a finalidade de garantir a equivalência entre a área superficial de um pino do dispositivo MBEC™ e as partículas, pois o risco de erro experimental na medida da massa de partículas é muito grande. Portanto, alíquotas de 0,3 g de esferas foram empregadas pela facilidade de manuseio desta maior massa de partículas e por proporcionar maior segurança no decorrer dos ensaios, minimizando o erro experimental associado ao teste.

Tabela 10: Determinação das áreas superficiais e específicas das esferas, pino do MBEC™ e do tubo de ensaio.

Tipo de sistema	Área superficial (mm ²)	Área específica (mm ² /g)
Esferas de 0,85 mm	2,27	2034,00
Esferas de 3 mm	28,27	1696,20
Pino MBEC™	102,00	-
Tubo de ensaio	3996,10	-

5.7 Avaliação do efeito do diâmetro das esferas e do tempo de incubação na formação do biofilme e determinação do período de sonicação

Os ensaios de formação de biofilmes foram efetuados duas vezes e, em cada uma das vezes, em triplicata. As esferas utilizadas nos ensaios eram de borossilicato, portanto muito susceptíveis a riscos/sulcos em sua superfície, podendo causar interferências nos resultados de adesão e recuperação celular. Por esse motivo as esferas foram utilizadas somente uma vez e descartadas.

Estes ensaios foram efetuados com dois objetivos distintos. O primeiro foi a seleção do diâmetro das esferas para o desenvolvimento da metodologia proposta, e o segundo, a determinação do período de sonicação, fundamental para a quantificação das células aderidas nas esferas. Para desprender as células do biofilme da superfície onde estão aderidas, utilizou-se o sonicador, projetado

para gerar energia ultrassônica de alta intensidade. Quando este equipamento transforma energia elétrica em energia mecânica, obtêm-se ciclos de tensão e compressão locais da ordem de milhares de atmosfera.

O ensaio de formação de biofilmes foi efetuado nas esferas de vidro com diâmetros médios de 0,85 e 3,00 mm, conforme descrito no item 4.2.8, para determinar quais esferas seriam as mais apropriadas para os testes de formação e susceptibilidade dos biofilmes em comparação ao dispositivo MBEC™. A Tabela 11 apresenta os resultados da recuperação de bactérias a partir dos biofilmes formados na superfície das esferas de vidro, submetidos a diferentes períodos de sonicação. A massa de esferas de vidro utilizada foi de 0,3 g das esferas de cada um dos diâmetros médios testados, para o fluido de corte contaminado.

Após 24 horas de incubação, a população microbiana nos biofilmes formados sobre as esferas de 3 mm de diâmetro médio foi de 10^4 UFC/mL, quando comparada a 10^3 UFC/mL nas esferas de 0,85 mm de diâmetro.

Tabela 11: Formação do biofilme nas esferas de vidro de 0,85 e 3 mm de diâmetro médio.

Diâmetro médio (mm)	Tempo de sonicação (min)	Recuperação celular (log UFC/tubo*)	
		Amostragem em 24 h	Amostragem em 48 h
0,85	20	3,80	7,00
	30	3,80	8,69
	40	3,80	8,81
3,00	20	4,80	5,81
	30	4,87	5,80
	40	4,79	6,17

* Cada tubo contém 0,3g de esferas de vidro

Entretanto em nenhuma das amostras com 24 horas de incubação atingiu-se a população mínima de 10^6 UFC/mL indicada na literatura para realizar o teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Marques *et al.*, 2004), independentemente do tempo de sonicação.

As esferas escolhidas para os ensaios foram as de diâmetro médio de 0,85 mm, com base nos resultados obtidos após 48 horas de incubação, onde a população microbiana atingiu valores necessários para realizar o teste de susceptibilidade a antimicrobianos nos três tempos de sonicação testados.

A menor recuperação celular para as esferas de 3,00 mm pode ser atribuída a vários fatores. Primeiramente, a área específica é maior para as partículas de menor diâmetro. Desta forma área total disponível para fixação celular e desenvolvimento de biofilme é maior nas partículas de 0,85 mm de diâmetro que nas de 3,00 mm. Entretanto, devido ao próprio peso de cada uma das esferas, o atrito gerado entre as esferas e a parede do tubo e entre as próprias esferas é maior nas esferas de maior diâmetro. Isto resulta em maior cisalhamento e, portanto, maior remoção das células aderidas, acarretando maior dificuldade no desenvolvimento de biofilmes na superfície destas partículas.

Após a determinação do melhor tamanho das esferas, um novo ensaio de formação de biofilmes foi efetuado para a determinação do tempo de sonicação a ser adotado foi realizado. Para tanto, foram utilizadas as esferas de 0,85 mm de diâmetro médio, escolhidas no ensaio anterior, e o desempenho do inóculo 1 foi comparado ao do inóculo 2. Os resultados estão descritos nas tabelas 12 e 13.

Analisando-se os resultados da Tabela 12, que mostra a formação de biofilmes obtidos a partir do inóculo 1, verifica-se que com 24 horas de incubação a recuperação celular foi inferior à necessária para o teste de susceptibilidade, enquanto que com 48 horas de incubação a recuperação celular foi satisfatória (superior a 10^6 UFC/tubo), reproduzindo os resultados anteriores. Como não houve diferença significativa entre os tempos de sonicação de 30 e 40 minutos, indicando que não há morte celular nesses períodos para este sistema, o tempo escolhido foi o de 30 min, que implica em menor duração do ensaio e menor dispêndio energético quando se testa várias amostras ao mesmo tempo. O período de 20 minutos apresentou recuperação celular inferior aos demais, sendo, então, descartado nos ensaios subseqüentes.

Tabela 12: Formação de biofilme em 0,3g de esferas de 0,85 mm de diâmetro médio após os três períodos de sonicação utilizando como inóculo a emulsão contaminada (inóculo 1).

Tempo amostragem (h)	Recuperação celular (Log UFC/tubo)		
	Sonicação de 20 min	Sonicação de 30 min	Sonicação de 40 min
24	4,84	4,72	4,54
48	7,47	8,90	8,74

De acordo com a Tabela 13, obtida para inóculo 2 (suspensão bacteriana a partir dos isolados), a população microbiana na superfície das esferas não atingiu 10^6 UFC/mL em 72 horas de incubação, nos três tempos de sonicação testados, mesmo com a população microbiana suspensa no líquido sendo superior a 10^8 UFC/mL (resultados obtidos por diluição em série e plaqueamento em profundidade em meio de cultura TSA).

Tabela 13: Formação de biofilme em 0,3g de esferas de 0,85 mm de diâmetro médio e recuperação celular após os três períodos de sonicação utilizando como inóculo a suspensão microbiana obtida das cepas isoladas (inóculo 2).

Tempo de sonicação	Recuperação celular (Log UFC/tubo)	
	Incubação por 48 horas	Incubação por 72 horas
20 minutos	2,97	3,70
30 minutos	2,87	3,43
40 minutos	2,95	3,54

As prováveis razões para a má aderência dos microrganismos sobre a superfície das esferas de vidro, utilizando-se o inóculo 2 obtido a partir das cepas isoladas do fluido de corte são: os microrganismos isolados não possuem a mesma capacidade de se fixarem na superfície quando retirados de seu habitat, ou necessitam de meio de cultura pré-enriquecido ou específico. Para descartar a possibilidade das células não se terem fixado por estarem estressadas ou por

número insuficiente de células no inóculo, um novo ensaio foi realizado utilizando-se o meio de TSB para enriquecimento e empregando-se um inóculo 100 vezes mais concentrado (10^{10} UFC/mL).

Os resultados obtidos foram semelhantes ao do teste anterior, ou seja, a fixação e o aumento de população aderida às esferas utilizando o inóculo 2 não depende de enriquecimento do meio ou do número de microrganismos inicial inoculados. A não fixação das bactérias nas esferas pode ser decorrente do fato de cepas não aderentes terem sido preferencialmente selecionadas ou ainda de ter ocorrido perda de capacidade de adesão das células no decorrer do isolamento. Porém, o fator mais importante talvez seja a incapacidade de se reconstituir um inóculo “natural” a partir de isolados obtidos do mesmo.

A interação entre as inúmeras espécies presentes no fluido de corte contaminado, cultiváveis e não cultiváveis, apresenta equilíbrio dinâmico e sensível, e indica ser o elemento chave na formação de biofilmes em sistemas industriais, como o do presente estudo.

5.8 Formação de biofilme no dispositivo MBEC™

O tempo de formação de um biofilme maduro deve ser estipulado para que os testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos sejam efetivos e condizentes com a realidade industrial. A formação de biofilme no dispositivo MBEC™ foi verificada utilizando-se os dois inóculos utilizados no estudo das esferas de vidro citados.

Os resultados utilizando o inóculo 1 (emulsão contaminada) e 30 minutos de sonicação na etapa de recuperação celular estão relacionados na Tabela 14. A metodologia do dispositivo MBEC™ recomenda um período de sonicação entre 5 e 30 minutos. Dependendo do equipamento utilizado, períodos superiores a 30 min podem causar lise celular, provocando queda na contagem de células viáveis.

Embora a concentração celular mínima para o teste de susceptibilidade a antimicrobianos já tenha sido atingida com 24 horas de incubação, nesse ensaio, o tempo escolhido de formação do biofilme foi o de 48 horas, tendo em vista o tempo de incubação praticado para as células planctônicas e o fato de que biofilmes com

idade acima de 24 horas possuem maior maturidade, principalmente com relação à EPS produzida e ao aumento na estabilidade do filme.

Tabela 14: Formação de biofilme no dispositivo MBEC™ utilizando como inóculo a emulsão contaminada.

Tempo de incubação (h)	Recuperação celular (Log UFC/pino)
2	1,00
3	4,34
24	6,07
27	5,80
44	7,92
48	7,11

Os resultados obtidos utilizando o inóculo 2 estão relacionados na Tabela 15, também empregando 30 minutos de sonicação na etapa de recuperação celular. Confirmando os resultados obtidos no ensaio utilizando as esferas de vidro, a população microbiana na superfície dos pinos, mesmo após 72 horas de incubação, não atingiu $1,0 \times 10^3$ UFC/pino, tendo já praticamente se estabilizado com 48 horas de incubação. Olson *et al.* (2002) observaram que algumas espécies de bactérias não formam biofilme em condições normais de ensaio, havendo a necessidade de adição de suplementos ao meio de cultura e aumento no tempo de incubação. Mesmo atendendo a estes requisitos, a população bacteriana não atingiu 10^6 UFC/pino, indicando, conforme mencionado anteriormente, que estas cepas isoladas perderam algumas das características que possuíam nos biofilmes originais.

Tabela 15: Formação de biofilme no dispositivo MBEC™ utilizando como inóculo a suspensão de cepas isoladas.

Tempo de incubação (h)	Recuperação celular (Log UFC/pino)
48	2,81
72	2,84

5.9 Susceptibilidade do biofilme desenvolvido no dispositivo MBEC™ e na superfície das esferas de vidro aos biocidas, a partir do fluido de corte contaminado

Estes ensaios foram divididos em duas partes: a) susceptibilidade do biofilme formado na superfície das esferas de vidro aos biocidas e b) susceptibilidade do biofilme formado no dispositivo MBEC™.

Nos ensaios com as esferas de vidro utilizou-se para cada biocida 10 concentrações diferentes variando entre 2,5 a 37,5 vezes a concentração normalmente utilizada. Os resultados obtidos foram compilados na Tabela 16, que mostra a concentração determinada como necessária para erradicação do biofilme (CE), a concentração tradicional de uso (C_t), o fator de aumento de CE em relação à C_t ($x C_t$) e o custo em R\$ (reais) por litro de emulsão para cada biocida utilizado na concentração CE.

Os resultados apresentados na Tabela 16 indicam que todos os biocidas selecionados para o estudo foram eficientes na erradicação dos biofilmes formados na superfície das esferas. Entretanto, as concentrações próximas às de uso não foram eficientes na erradicação dos biofilmes formados nas esferas, sendo requeridas concentrações muito superiores às aquelas indicadas e praticadas para uso em sistemas de usinagem. Esses dados corroboram os resultados obtidos em diversos estudos de erradicação de biofilmes na área clínica, com o uso de antibióticos, nos quais as concentrações requeridas para erradicação de microrganismos isolados desenvolvidos em biofilmes podem variar entre 100 e 1.000 vezes a MIC (Ceri *et al.*, 1999).

Neste ensaio, o biocida que melhor relação custo/benefício apresentou foi o BP-180, seguido do BP-509, e a opção menos indicada é a utilização do FBP-417.

O dispositivo MBEC™ é o sistema mais efetivo disponível atualmente no mercado para o estudo e teste de erradicação de biofilmes, pois permite avaliar simultaneamente varias concentrações ou tipos de biocidas, minimizando o tempo e/ou facilitando o ensaio. Este ensaio é efetuado para a determinação da concentração mínima de biocida necessária para erradicar um biofilme já

instalado. Juntamente com os dados da MIC, é de grande valia não só na indústria de usinagem de metais como em outros segmentos de mercado.

Tabela 16: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes aos biocidas com as esferas de vidro de 0,85mm de diâmetro médio.

Característica do sistema	Biocidas						
	FBP-124	FBP-128	FBP-140	FBP-417	BNP-115	BP-180	BP-509
C _t (g/L)	1,5	1,0	1,5	5,0	3,0	1,2	3,0
CE (g/L)	75,0	50,0	75,0	125,0	112,5	30,0	51,0
xC _t	50,0	50,0	50,0	25,0	37,5	25,0	17,0
Custo (R\$/L) *	0,75	0,40	1,95	4,37	0,45	0,12	0,20

C_t: Concentração tradicional de uso; CE: concentração de erradicação do biofilme; xC_t: fator de aumento de CE em relação à C_t; * Valores em fevereiro/2006.

Com o biofilme obtido no dispositivo MBEC™, a partir da emulsão contaminada (item 5.8), foi efetuado o teste de susceptibilidade aos biocidas anteriormente citados nas dosagens de 2,5 a 37,5 vezes a concentração tradicional de uso indicada pelo fornecedor dos biocidas. A Tabela 17 mostra os resultados obtidos no ensaio.

Os resultados mostram que todos os biocidas apresentaram concentração de erradicação provavelmente inferior a 12 vezes a concentração de uso, porém o biocida que apresentou a melhor relação custo/benefício foi o BP-180 seguido do FBP-128 e do BP-509. O resultado de erradicação com o biocida FBP-417 foi o menos adequado nos testes no dispositivo MBEC™.

Analisando os dados obtidos nos testes utilizando-se os dois dispositivos, pode-se concluir que em ambos dispositivos os biocidas de melhor relação custo/benefício se repetem (BP-180), mostrando que, para os ensaios de formação e erradicação de biofilmes a partir de emulsão contaminada, o sistema com esferas de vidro apresentou boa reprodutibilidade quando comparado ao dispositivo MBEC™.

Tabela 17: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes aos biocidas utilizando o dispositivo MBEC™.

Característica do sistema	Biocidas						
	FBP-124	FBP-128	FBP-140	FBP-417	BNP-115	BP-180	BP-509
C _t (g/L)	1,5	1,0	1,5	5,0	3,0	1,2	3,0
CE (g/L)	18	12	18	60	36	14,4	24
xC _t	12	12	12	12	12	12	12
Custo (R\$/L) *	0,18	0,09	0,47	2,10	0,14	0,06	0,09

C_t: Concentração tradicional de uso; CE: concentração de erradicação do biofilme; xC_t: fator de aumento de CE em relação à C_t; * Valores em fevereiro/2006.

Entretanto, as concentrações de erradicação no MBEC™ sempre foram inferiores às obtidas no sistema de esferas. Foram levantadas duas hipóteses para explicar este fato: a) como a área superficial global das esferas é substancialmente maior do que a área do pino, isto poderia acarretar no aumento da concentração de biocida necessária para a erradicação do biofilme; b) como as células formam estruturas diferentes quando aderidas a superfícies diferentes, os biofilmes nos dois sistemas potencialmente não são exatamente iguais.

Para confirmar a hipótese (a) foram efetuados testes de formação de biofilmes e de susceptibilidade aos biocidas, alterando a quantidade de esferas nos tubos de incubação. Foram utilizadas alíquotas de 0,1, 0,2 e 0,3g de esferas por tubo, e todas as demais condições de ensaio, descritas anteriormente, foram mantidas. A Tabela 18 mostra os resultados do teste de susceptibilidade obtidos com este ensaio, na qual a formação de biofilme na superfície das esferas foi superior a 10⁶ UFC/mL em todos os tubos.

Estes resultados mostraram que não há diferença na concentração de erradicação dos biofilmes formados, entre as três alíquotas de esferas utilizadas, indicando que a área superficial não interfere na ação do biocida na estrutura do biofilme. Por outro lado, isto significa que a escala dos ensaios não afeta muito os resultados.

Tabela 18: Concentração de biocidas para erradicação (CE) de biofilmes formados na superfície das esferas de vidro, em alíquotas de 0,1 a 0,3g de esferas por tubo.

Massa de esferas/tubo (g)	CE dos biocidas (g/L)						
	FBP-124	FBP-128	FBP-140	FBP-417	BNP-115	BP-180	BP-509
0,1	75	50	75	125	112,5	30	50
0,2	75	50	75	125	112,5	30	50
0,3	75	50	75	125	112,5	30	50

CE: Concentração de erradicação do biofilme

O dispositivo desenvolvido pode ser utilizado em outras escalas de tubos de ensaios para a determinação da concentração de erradicação de biofilmes, economizando principalmente meios de cultura, reagentes, e tempo para desenvolvimento dos ensaios.

Para verificação da hipótese (b), os testes de formação e erradicação do biofilme foram efetuados tanto no sistema de esferas quanto no dispositivo MBECTM. A única alteração efetuada na metodologia já descrita anteriormente foi o período de incubação para a formação do biofilme, de 48 para 72 horas. A Tabela 19 mostra que para o dispositivo MBECTM, a concentração de erradicação aumenta quando comparada ao ensaio utilizando 48 horas de incubação para a formação do biofilme, enquanto que para os testes no sistema de esferas, ficaram inalteradas quando comparadas com os resultados de 48 horas de incubação.

Tabela 19: Concentração de erradicação (CE) dos biofilmes formados a partir da emulsão contaminada, nos dois sistemas testados, com tempo de formação de 72 horas de incubação.

Dispositivos	CE para biofilmes formados com 72 horas de incubação (g/L)						
	FBP-124	FBP-128	FBP-140	FBP-417	BNP-115	BP-180	BP-509
Esferas	75	50	75	125	112,5	30	50
MBEC TM	70	50	70	112,5	125	25	50

De acordo com os resultados obtidos com o tempo de incubação de 72 horas, os valores de CE encontrados no dispositivo MBEC™ aumentaram, ficando próximos dos encontrados no sistema de esferas de vidro, indicando que a estrutura e o amadurecimento do biofilme formado na superfície do pino interferem diretamente na concentração de erradicação. Isto permite inferir que no sistema de esferas de vidro, a formação e maturidade do biofilme são aceleradas, quando comparadas ao MBEC™. Para que resultados comparativos aos obtidos em 48 horas no sistema de esferas de vidro possam ser obtidos, há a necessidade de pelo menos 72 horas de incubação no MBEC™. Como nos sistemas industriais a rapidez é um elemento vital, o sistema de esferas proposto atende mais eficientemente esta necessidade.

5.10 Formação e susceptibilidade a biocidas do biofilme desenvolvido a partir do amaciante de roupa contaminado na superfície das esferas de vidro e no dispositivo MBEC™

Os procedimentos de formação e susceptibilidade dos biofilmes aos sete biocidas no sistema de esferas de vidro e no dispositivo MBEC™ foram efetuados em outros dois segmentos de mercado para verificar se o sistema de esferas de vidro seria eficiente para amostras distintas.

No ensaio utilizando amaciante de roupa contaminado como inóculo, cujos resultados estão descritos nas Tabelas 20 e 21, a reprodutibilidade de comportamento do sistema foi comprovada. As concentrações de biocida utilizadas foram de 11 a 37,5 vezes a concentração de uso (C_t).

Analisando-se os resultados comparativamente entre os dois sistemas testados, verificou-se que as concentrações de erradicação dos biofilmes formados a partir do amaciante de roupas contaminado, determinadas nos dois sistemas, foram idênticas. Para ambos os sistemas obteve-se três biocidas com melhor performance considerando-se a relação custo/benefício: o BNP-115, o BP-180 e o BP-509. O biocida FBP-417 apresentou melhor custo/benefício que os demais biocidas testados.

Tabela 20: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes utilizando o sistema de esferas e o amaciante de roupa contaminado como inóculo.

Característica do sistema	Biocidas						
	FBP-124	FBP-128	FBP-140	FBP-417	BNP-115	BP-180	BP-509
C _t (g/L)	1,5	1,0	1,5	5,0	3,0	1,2	3,0
CE (g/L)	16,5	11,0	16,5	55,0	33,0	13,2	33,0
xC _t	11	11	11	11	11	11	11
Custo (R\$/L) *	0,11	0,09	0,28	0,38	0,04	0,04	0,04

C_t: Concentração tradicional de uso; CE: concentração de erradicação do biofilme; xC_t: fator de aumento de CE em relação à Ct; * Valores em fevereiro/2006.

Tabela 21: Resultados obtidos no teste de susceptibilidade dos biofilmes utilizando o dispositivo MBEC™ e o amaciante de roupa contaminado como inóculo.

Característica do sistema	Biocidas						
	FBP-124	FBP-128	FBP-140	FBP-417	BNP-115	BP-180	BP-509
C _t (g/L)	1,5	1,0	1,5	5,0	3,0	1,2	3,0
CE (g/L)	16,5	11,0	16,5	55,0	33,0	13,2	33,0
xC _t	11	11	11	11	11	11	11
Custo (R\$/L) *	0,11	0,09	0,28	0,38	0,04	0,04	0,04

C_t: Concentração tradicional de uso; CE: concentração de erradicação do biofilme; xC_t: fator de aumento de CE em relação à Ct; * Valores em fevereiro/2006.

5.11 Formação e teste de susceptibilidade do biofilme desenvolvido na superfície das esferas de vidro e no dispositivo MBEC™, a partir do caldo de cana contaminado

Os ensaios de formação e erradicação de biofilmes foram repetidos utilizando-se como inóculo o caldo de cana contaminado, para verificar se o procedimento utilizando-se o sistema de esferas apresentaria reprodutibilidade de resultados com amostras de segmentos de mercados distintos.

O caldo de cana contaminado foi escolhido principalmente pelo fato de aproximadamente 85% do total de contaminantes serem bactérias Gram-positivas naturais da cana-de-açúcar (tais como *Leuconostoc* sp. e *Lactobacillus* sp.), que têm a característica de formar grande quantidade de goma (por exemplo a dextrana), que é altamente prejudicial à indústria sucroalcooleira (McBain *et al.*, 2003). Estas características, distintas das apresentadas pelos microrganismos estudados no fluido de corte e no amaciante de roupas, motivaram a escolha deste segmento para expandir a potencial utilização do sistema de esferas e do dispositivo MBEC™.

A população microbiana do inóculo foi ajustada para $1,0 \times 10^9$ UFC/mL, e os parâmetros dos ensaios anteriores foram mantidos, porém a adesão na superfície do sistema de esferas de vidro e no dispositivo MBEC™ foram respectivamente $2,5 \times 10^4$ e $9,0 \times 10^4$ UFC/mL, diferentemente das populações determinadas utilizando-se fluido de corte e amaciante de roupas contaminados. A população recuperada no caldo de cana após incubação foi de $7,2 \times 10^9$ UFC/mL, indicando que a baixa adesão não pode ser atribuída à morte celular.

Duas hipóteses podem explicar estes resultados: a) bactérias Gram-positivas são citadas na literatura como tendo menor capacidade de fixação a superfícies que as bactérias Gram-negativas; b) a formação rápida e intensa de goma nas duas superfícies testadas pode ter aprisionado a maioria das células que estavam disponíveis para adesão, de forma que a lavagem efetuada após o período de incubação retirou a goma depositada nas superfícies, arrastando as células fracamente aderidas a ambos os sistemas testados.

O ensaio utilizando o caldo de cana contaminado como inóculo apresentou problemas no decorrer do teste de formação de biofilme, devido principalmente à formação de gás, oriundo do metabolismo da sacarose pelas células contaminantes (por processos fermentativos). Alguns tubos contendo esferas de vidro e inóculo apresentaram vazamento de material durante a incubação em decorrência do aumento da pressão interna, aumentando a quantidade de material utilizado. Este problema pode ser minimizado utilizando-se meios específicos para o crescimento de bactéria (como, por exemplo, meio de cultura Caldo para *Lactobacillus* segundo DE MAN (MRS) contendo antibióticos (como a actidiona)

para inibir o crescimento de leveduras, que são as prováveis repensáveis pela formação abundante de gás.

Os ensaios no dispositivo MBEC™ não apresentaram os mesmos problemas de vazamento, porém a adesão na superfície dos pinos mostrou-se tão limitada quanto a verificada na superfície das esferas.

Os testes de susceptibilidade a biocidas não foram efetuados, pois a população celular mínima requerida nos biofilmes não foi atingida, de forma que, para este segmento específico de mercado, deve-se buscar abordagens alternativas, que poderiam incluir a alteração do procedimento de obtenção dos biofilmes nos sistemas empregados.

5.12 Análise comparativa global entre o sistema de esferas de vidro e o dispositivo MBEC™

Para sumarizar os resultados obtidos nos dois sistemas de ensaio para o estudo de biofilmes, estes foram comparados e discutidos a seguir.

No teste de formação de biofilmes, a partir do fluido de corte contaminado, a recuperação celular após 48 horas de incubação para o sistema de esferas de vidro e para o dispositivo MBEC™ foram, respectivamente, $1,3 \times 10^7$ e $8,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para os testes efetuados tendo como inóculo o amaciante de roupas obteve-se $3,1 \times 10^7$ UFC/mL no dispositivo MBEC™ e $6,0 \times 10^7$ UFC/mL no sistema de esferas.

Nos ensaios de susceptibilidade, para o fluido de corte contaminado, as concentrações de erradicação (CE) dos biofilmes formados foram diferentes entre os dois sistemas testados. No dispositivo MBEC™ a CE, para todos os biocidas utilizados, foi 12 vezes superior à concentração normalmente utilizada, enquanto que no sistema de esferas, os valores de CE variaram entre 17 e 50 vezes a concentração recomendada para o sistema de fluido de corte. Porém, quando se forma o biofilme em 72 horas de incubação, os valores de CE não apresentam tantas diferenças (variam entre 25 e 125 g/L nos dois sistemas). Isso pode ser explicado com base na maturidade do biofilme formado nos dois dispositivos ou pode estar relacionado às características da amostra de fluido de corte.

Todos os biocidas foram similarmente eficientes na erradicação dos biofilmes formados nos dois sistemas testados, sendo que o BP-180 e o BP-509 apresentaram as melhores relações custo/benefício.

Nos ensaios utilizando o amaciante de roupas contaminado, os resultados confirmaram a similaridade entre os dois dispositivos. A recuperação celular após a formação dos biofilmes em 48 horas de incubação, foi de $3,1 \times 10^7$ no dispositivo MBEC™ e de $6,0 \times 10^7$ no sistema de esferas de vidro. As CE foram muito similares, variando, de acordo com os biocidas testados, de 25 a 125 g de biocida por litro de emulsão. Os ensaios com 72 horas de incubação não foram efetuados, pois com 48 horas já se observou a mesma susceptibilidade aos biocidas testados nos dois dispositivos, sendo que os biocidas que apresentaram as melhores relações custo/benefício foram o BP-180 e o BP-509, seguidos do BNP-115.

Quando comparados os resultados da erradicação dos biofilmes formados a partir do fluido de corte com os do amaciante de roupas, observou-se que os tempos de incubação para a formação dos biofilmes no dispositivo MBEC™ foram diferentes. Para as CE serem próximas às CE determinadas no sistema de esferas necessitou-se de 72 horas de incubação para a formação dos biofilmes no dispositivo MBEC™ e de 48 horas para o amaciante de roupas. Isto pode ser devido às características de uso, composição ou contaminação das amostras, pois o fluido de corte vinha sendo recuperado e utilizado por dois anos na empresa de usinagem de metais, enquanto que a contaminação no amaciante de roupas foi detectada logo após sua fabricação, indo diretamente ao laboratório para início dos testes.

Os ensaios de formação de biofilmes a partir do caldo de cana contaminado não apresentaram repetibilidade quando comparados aos testes efetuados com o fluido de corte e o amaciante de roupas contaminados. A recuperação da população microbiana após incubação foi inferior à população indicada na literatura para os ensaios de susceptibilidade a biocidas.

O método desenvolvido é bastante promissor do ponto de vista técnico e mostra-se atraente também com relação ao aspecto econômico. Considerando

apenas os materiais que são descartados após os experimentos (esferas, meios de cultura, placas de Petri, dispositivo MBECTM) e a mão-de-obra técnica para o preparo de materiais e reagentes, o custo estimado para efetuar os testes de formação de biofilmes e de susceptibilidade aos sete biocidas em quatro concentrações e em triplicata para o dispositivo MBECTM é de aproximadamente R\$ 65,20 (sessenta e cinco reais e vinte centavos), enquanto que o gasto para o mesmo estudo no sistema de esferas de vidro é de R\$ 25,20 (vinte e cinco reais e vinte centavos).

Espera-se que o sistema desenvolvido possa ser difundido comercialmente para propiciar o conhecimento e aperfeiçoamento da técnica por laboratórios afins.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

No fluido de corte contaminado foram obtidas 43 cepas isoladas, a grande maioria de Gram-negativas (aproximadamente 98%), sendo 14% do total cepas não propagáveis, e 62,2% com capacidade de degradar o hidrocarboneto.

Os ensaios de coeficientes de partição mostraram que, com exceção da clorometilisotiazolinona no biocida FBP-124, todos os demais agentes ativos mostraram maior tendência de se acumular na fase oleosa. O princípio ativo com maior caráter hidrofóbico é a n-octilisotiazolinona, por isso os biocidas com maior probabilidade de permeação através das membranas seriam o FBP-417, o FBP-124 e o FBP-128, porém os testes de erradicação não corroboraram com essa afirmação, mostrando que a melhor efetividade foi do BNP-115, na maioria dos casos estudados.

Os ensaios de MIC e de CMM com as células planctônicas mostraram que as concentrações requeridas para inibir ou matar os microrganismos estão muito abaixo das concentrações de uso para os sete biocidas testados. Este fato indica que a contaminação do fluido de corte não se deu por decorrência da presença de microrganismos resistentes aos biocidas.

O inóculo constituído das cepas isoladas do fluido de corte contaminado não apresentou grande capacidade de adesão em ambos os dispositivos testados, indicando que a interação entre as espécies pode ser fundamental no desenvolvimento de biofilmes.

Para a utilização de esferas com diâmetro médio de 0,85 mm, o tempo de incubação mínimo necessário para a formação dos biofilmes com população microbiana superior a 10^6 UFC/mL, foi de 48 horas a 35-37°C. O período de sonicação de 30 minutos foi suficiente para desagregar o biofilme da superfície das esferas sem, no entanto, ocasionar lise celular.

Embora a literatura mostre que o material da superfície tem pouco ou nenhum efeito sobre o desenvolvimento do biofilme, o presente trabalho mostrou que há diferença na formação do biofilme entre os dois materiais utilizados

(borossilicato e poliestireno) principalmente devido aos tipos de tensões cizalhantes utilizados nos dois sistemas e no tempo de incubação.

Verificou-se que, no sistema desenvolvido, mesmo variando a massa de esferas de vidro contida nos tubos de incubação e o tempo de incubação para a formação dos biofilmes, não houve variação na concentração de biocida para erradicação dos contaminantes.

No dispositivo MBECTM, no caso do fluido de corte contaminado, a variação no tempo de incubação para a formação dos biofilmes de 48 horas para 72 horas causou um aumento expressivo na concentração de biocida para erradicação dos biofilmes, que passou de 12 a 60 g/L (12 vezes a concentração de uso) para uma faixa entre 25 e 125 g/L, dependendo do biocida utilizado.

Os biocidas que apresentaram a melhor relação custo/benefício em ambos os dispositivos foram o BP-180 e o BP-509.

Para o caso do amaciante de roupas, os ensaios comparativos entre o sistema de esferas de vidro e o dispositivo MBECTM não apresentaram diferença na população microbiana no biofilme formado e nem na concentração de biocida para a erradicação do biofilme formado, mostrando a equivalência entre os dois sistemas.

Para os ensaios utilizando-se o caldo de cana contaminado, a população microbiana aderida às superfícies dos dois dispositivos testados não alcançou o mínimo necessário para o teste de susceptibilidade a biocidas. Os testes não foram repetidos utilizando-se tempo de incubação superior a 48 horas, para a formação do biofilme, devido aos problemas de vazamento nos tubos de incubação do sistema de esferas, indicando que, para este segmento, deve-se verificar abordagens alternativas para o estudo.

Mediante aos resultados obtidos nos testes de formação de biofilmes e susceptibilidade a agentes antimicrobianos, concluiu-se que o sistema alternativo desenvolvido foi tão eficiente quanto o dispositivo MBECTM, para os inóculos testados, além de possuir custo mais acessível para sua aplicação em laboratórios afins.

6.2 Sugestões

O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema de formação e de erradicação de biofilmes que fosse mais simples, rápido, versátil e menos dispendioso que o comercialmente disponível, que emprega o dispositivo MBEC™, porém esta metodologia pode ser aprimorada.

As sugestões para os trabalhos futuros são:

- Avaliar amostras de outros processos industriais, para estabelecer a amplitude de aplicação do sistema desenvolvido;
- Otimizar as condições experimentais, para melhorar o desempenho do sistema desenvolvido, tais como: tipo de material de suporte, temperatura de incubação, meios de cultura, etc;
- Analisar a formação de biofilmes de outros microrganismos, como leveduras, fungos filamentosos, algas, etc;
- Aprofundar os estudos do complexo microbiano de biofilmes formados a partir de amostras naturais, utilizando outros métodos de isolamento e separação, uma vez que o isolamento pelos métodos tradicionais não permitiu reconstituir a contaminação natural existente no sistema industrial;
- Aplicar recursos de taxonomia molecular para compreender melhor a interação entre as espécies em um biofilme;
- Utilizar recursos complementares como a microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal e coloração seletiva dos microrganismos com marcadores, para verificar a estrutura dos biofilmes formados em superfícies distintas, correlacionando a estrutura com a eficácia do tratamento antimicrobiano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Chemical Society. Disponível em <<http://www.cas.org.html>> acesso em 03 de setembro de 2005.
- American Society for Microbiology. Disponível em <<http://www.asm.org.html>> acesso em 25 de fevereiro de 2005.
- AOAC Official Methods of Analysis – Capítulo 6 - Disinfectants, pp 1-17., 2000
- Biocidal Products Directive, Disponível em http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/evaluation/borderline_en.htm. Último acesso em 14 de outubro de 2005.
- Bardouniotis, E.; Huddleston, W.; Ceri, H. e Olson, M.E. - **Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of Mycobacterium phlei using the MBEC assay system** FEMS Microbiology Letters, 203, pp 263-267, 2001.
- Buckman Laboratories. Disponível em <<http://www.buckman.com.br>> acesso em 20 Janeiro de 2005.
- Burk, J.M. **Slime control seminar**. Buckman Laboratories Incorporation, Campinas, São Paulo, Brasil, 1984.
- Capelletti, R.V.; Moraes, A.M.; Eguchi, S.Y. e Lucchesi, E.G. - **Efeito do diluente na recuperação de microrganismos em amostras industriais**. XV - Simpósio Nacional de Bioprocessos, Sinaferm. Recife-PE. 7 páginas, 2005.
- Center for Biofilm Engineer – **New discoveries**. Montana State University. 1990. Disponível em <http://www.erc.montana.edu>. Último acesso em Janeiro de 2006.

Ceri, H.; Olson, M.E.; Stremick, C.; Read, R.R.; Morck, D. e Buret, A. - **The Calgary Biofilm Device: A new technology for the rapid determination of antibiotic susceptibility of bacterial biofilms.** Journal Clinical Microbiology 37 (6), 1771-1776, 1999.

Ceri, H.; Morck, D.W. e Olson, M.E. - **Biocide susceptibility testing of biofilms.** In: Disinfection, Sterilization and Preservation Block, Seymour S. Editora Lippincott Williams & Wilkins 5º ed., capítulo 75; 1429 a 1437, 2001.

Ceri, H.; Olson, M.E.; Morck, D.W.; Read, R.R. e Buret, A.G. - **Biofilm assay.** United States Patents nº 6.051.423, Abril de 2000. Disponível em <http://www.uspto.gov/patft/index.html>, último acesso setembro de 2005.

Ceri, H.; Olson, M.E.; Morck, D.W.; Read, R.R. e Buret, A.G.- **Biofilm assay.** United States Patents nº 6.326.190, Dezembro de 2001. Disponível em <http://www.uspto.gov/patft/index.html>, último acesso setembro de 2005.

Ceri, H.; Olson, M.E.; Morck, D.W.; Read, R.R. e Buret, A.G. - **Method of making biofilms** United States Patents nº 6.410.256, Junho de 2002. Disponível em <http://www.uspto.gov/patft/index.html>, último acesso setembro de 2005.

Ceri, H. e Olson, M.E. - **Apparatus and methods for testing effects of materials and surface coatings on the formation of biofilms.** United States Patents nº 6.596.505, Julho de 2003 (a). Disponível em <http://www.uspto.gov/patft/index.html> último acesso setembro de 2005.

Ceri, H.; Olson, M.E.; Morck, D.W.; Read, R.R. e Buret, A.G. - **Method of growing and analyzing a biofilm.** United States Patents nº 6.599.714, Julho de 2003

(b). Disponível em <http://www.uspto.gov/patft/index.html>, último acesso setembro de 2005.

Christensen, B.E. e Characklis, W.G. - **Physical and chemical properties of biofilms**. In: Biofilms. Characklis, W.G., Marshall, K.C. Editora John Wiley and sons, Inc, 93-130, 1990.

Costerton, J.W. e Wilson, M. – **Introducing Biofilms**. Editorial de Cambridge University Press, Biofilms, 1, 1-4, 2004

Costerton, J.W.; Geesey, G.G. e Cheng, K.J. - **How bacteria sick**. Scientific American, 238, 86-95, 1978.

Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta M. e Marrie, T.J. - **Bacterial biofilms in nature and disease**. Annual review of microbiology. 41 pp 435-464, California, 1987.

Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R. e Lappin-Scott H.M. - **Microbial biofilms** In Annual review of microbiology. Oenston L. N., Balows A. and Greenberg E. P.. Editora Annual Reviews Inc. 49 pp711-745, California, 1995.

Costerton, J.W. e Lappin-Scott, H.M.- **Behaviour of bacteria in biofilm**. ASM News, vol.55, nº 12, 650-654, 1989.

Denyer, S.P. e Stewart, G.S.A.B. - **Mechanisms of action of disinfectants**. International Biodeterioration & Biodegradation, 41, 261-268. 1998 Eastman.ucl.ac.uk , em <http://www.eastman.ucl.ac.uk/research/images/>

MImages/ BiofilmsModels/ cdff_ 3.1.gif . Último acesso em Agosto de 2005.

Green, P.N.; Bousfield, I.J. e Stones, A. - **The laboratory generation of biofilms and their use in biocide evaluation** In Industrial Microbiological Testing. Editors Hopton, J.W. and Hill, E.C. Blackwell Scientific Publications, Boston, 99-108, 1987.

Heinzel, M. - **Phenomena of Biocide Resistance in Microorganisms** International Biodeterioration & Biodegradation, 41, 225-234, 1998.

Hobson, D.W. e Bolsen, K.- **Methods of the testing oral and topical antiseptics and antimicrobials.** In: Disinfection, Sterilization and Preservation. Block, Seymour S. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 5a ed., Capítulo 69, 1329-1359, 2001

Hughes, K.A.; Sutherland, I.W. e Martin, V.J. - **Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase.** Microbiology, 144, 3039-3047, 1998.

IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda. Boletins e literaturas técnicas, 2005.

Jahn, A.; Griebel, T. e Nielsen, P.H. - **Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix.** Biofouling 14 (1), 49-57, 1999.

Johnsrud, S.C. - **Biotechnology for solving slime problems in the pulp and paper industry.** In: Scheper, T. ed. Biotechnology in the pulp and paper industry – Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 311-328, 1997.

Justo, O.R. – **Preparação e caracterização de lipossomas para administração por inalação de compostos terapêuticos utilizados na terapia de tuberculose.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, Campinas, SP, 1999.

Lennox, J.E.; Douthwright, J.; Delisle, G. e Eidemiller, B. – **Biofilms : Online Manual.** Disponível em <http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms>.
Último acesso abril de 2006

Lima, U.A. - **Microbiologia do Petróleo** in Tópicos de Microbiologia Industrial Vol. 2. Cordenadores Aquarone, E.; Borzani, W.; Lima, U.A. Editora Edgard Blucher Ltda.São Paulo, Cap. 8, páginas 151-168, 1975.

Locatelli, C.I.; Englert, G.E.; Kwitko, S. e Simonetti, A.B. – **Aderência bacteriana *in vitro* a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone.** Arquivos Brasileiro de Oftalmologia. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttex&pid, último acesso em Janeiro de 2006.

Lutey, R.W. - **Process cooling water.** In: Handbook of biocide and Preservative Use. Rossmore, H.W. Editora Blackic Academic & Professional, 51-82, 1995.

Mattila-Sandholm, T. e Wirtanen, G. - **Biofilm formation in the industry: a review.** Food Reviews International, 8 (4), 573-603, 1992.

Maturin, L.J. e Peeler, J.T. - **Bacteriological Analytical Manual.** Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Último acesso em janeiro de 2005.

- Marques, L.L.R. e Manfio, G.P. - **Procedimento padrão para determinação de MIC, MBC e MBEC. Workshop em biofilmes microbianos.** CPQBA, Unicamp, 2004. MBEC Bioproducts Incorporation, Canadá. Disponível em [http://www.mbec.ca/productsnew .html](http://www.mbec.ca/productsnew.html). Último acesso em 20 de janeiro de 2005.
- McBain, A.J.; Bartolo, R.G.; Catrenich, C.E.; Charbonneau, D.; Ledder, R.G.; Rickard, A.H. e Symmons, S.A. – **Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms.** Applied and Environmental Microbiology 69 (1), 177-185, 2003.
- Moraes, A.M. – **Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L-p-boronofenilalanina e doxorubicina.** Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
- Morck, D. W.; Olson, M. E. e Ceri H. - **Microbial Biofilms: preservation, control and removal** In Disinfection, Sterilization and Preservation. Organizador Block, S. Editora Lippincott Williams & Wilkins 5º ed., capítulo 34; 1429 a 1437, 2001.
- Morton, L.H.G. - **Detection of significant spoilage organisms in soluble oil-in-water metal- working Fluids.** In: Industrial Microbiological Testing. Editors Hopton, J.W. and Hill, E.C. Blackwell Scientific Publications, Boston, 221-225, 1987.
- Nascimento, T. e Taveira, N. – **Os biofilmes microbianos como agentes causais de doenças humanas.** Instituto Superior da Saúde. Disponível em

<http://www.egasmoniz.edu.pt/iscss/disciplinas/microbiologia/biofilmes.em.doencas.pdf>. Último acesso em Janeiro de 2006.

Oliveira, A.S.; Hauly, M.C.O.; Rinaldi, D.A.; Voll, C.E. e Tamanini, C. – **Integração Empresa e Universidade no controle de qualidade na agroindústria sucroalcooleira**. Universidade Estadual de Londrina - Revista Estação, Ed. 1, 2002. Disponível em http://www.proex.uel.br/estacao/index.php?arq=ARQ_rel&FWS. Último acesso em Janeiro de 2006.

Olson, M.E.; Ceri, H.; Morck, D.W.; Buret, A.G. e Read, R.R. - **Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics**. Canadian Journal Veterinary Research, 66 (2), 86-92, 2002.

O'Toole, G.A. e Kolter, R. - **Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis**. Mol. Microbiol. 28, 449-461, 1998.

Pásteran, F.; Corso, A. e Galas, M. – **Manual de procedimentos, Parte II, capítulo II.1** Sensibilidad a los antimicrobianos, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires, Argentina, 9-11. 2003.

Revista Meio Ambiente Industrial – **Óleos Lubrificantes**. Ano VI, ed. 31 nº30, 2001. Disponível em <http://www.meioambienteindustrial.com.br>. Último acesso em Agosto de 2005.

Rohm & Haas Company. Disponível em <<http://www.rohmhass.com>> Acesso em 25 de fevereiro de 2005.

- Runge P. R. F. e Duarte G. N. - **Lubrificantes industriais** Editora Triboconcept – Cotia, 313 páginas, 1989.
- Sepandj, F., Ceri H., Gibb A. P., Read R. R. e Olson M. E. - **Biofilm Infections in Peritoneal Dialysis** - Related Peritonitis: Comparison of Standard MIC and MBEC in Evaluation of Antibiotic Sensitivity of Coagulase-Negative Staphylococci – Peritoneal Dialysis International, Vol.23, pp 74-94, 2003.
- Stewart, P.S. e Raquepas, J.B. – **Implications of reaction-diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents.** Chemical Engineering Science, 50 (19), 3099-3104, 1995.
- Tortora G., Funk B. e Case C. – **Microbiologia** – Editora Artmed, 6º edição, capítulo 11, 294-317, 2000.
- Vanderzant, C. e Splittstoesser, D. – **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** – American Public Health Association 3º ed, 1992.
- Vieira, M.J. - **Estudo da formação de biofilmes biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino.** Universidade do Minho, Braga, Portugal. Tese Doutorado. 1995.
- Xavier, J.B. – **Biomatemática – Modelação da estrutura de biofilmes.** Boletim de Biotecnologia, 4, 3-13, 2002.

Wills, A.J. e Bott, T.R. - **Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* biofilm development by hydrogen peroxide.** In: Understanding heat exchanger fouling and its mitigation. Ciocco Conference Center. 1997.

Wimpenney, J.W.T.; Peters, A. e Scourfield, M.A. - **The physiology and biochemistry of biofilm.** In: Structure and function of biofilms. Characlaris, W.G., Wilderer, P.A. John Wiley and Sons, Inc, 111-127. 1993.

Zobell, C.E. - **The effect of solid surfaces upon bacterial activity.** Journal of bacteriology, 46, 39-56. 1943.

ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA

Tryptic Soy Agar (TSA), Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	15 g
Digerido enzimático de soja.....	5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Eosin Methylen Blue Agar (EMB), Difco.

Peptona.....	10 g
Lactose.....	10 g
Fosfato de potássio dibásico.....	2 g
Eosina Y.....	0,4 g
Azul de metileno.....	0,065 g
Àgar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Fluid Thioglycollate Medium (FTM), Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	15 g
Extrato de levedura.....	5 g
Dextrose.....	5,5 g
Cloreto de sódio.....	2,5 g
L-cistina.....	0,5 g
Tioglicolato de sódio.....	0,5 g
Resazurina.....	0,001 g
Àgar.....	0,75 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Postgate Medium B, formulado.

Fosfato de Potássio monobásico	0,5 g
Cloreto de amônia	1 g
Sulfato de sódio.....	0,1 g
Cloreto de magnésio.....	1,6 g
Extrato de levedura.....	1 g
Sulfato de ferro.....	0.0004 g
Piruvato de sódio	3,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Difco.

Concentrado enzimático de caseína.....	10 g
Dextrose.....	40 g
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Tryptic Soy Broth (TSB), Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	17 g
Digerido enzimático de soja.....	3 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Fosfato dipotássico.....	2,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Minimal Medium Davis suplementado com óleo mineral (MMO), formulado.

Fosfato de potássio bibásico.....	7 g
Fosfato de potássio monobásico	5 g
Citrato de sódio.....	5 g
Sulfato de magnésio.....	0,1 g
Sulfato de amônio.....	1 g
Óleo de corte mineral.....	50 mL
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

ANEXO 2 – Escala de McFarland

Correspondência da Escala de McFarland com o resultado do Densimat, determinado pela bioMérieux para concentrações de células bacterianas Gram-negativas (Pastéran *et al.*, 2003).

Escala de McFarland	Número de bactérias (x10 ⁸ UFC/mL)
0,5	1,5
1	3,0
2	6,0
3	9,0
4	12,0
5	15,0
6	18,0
7	21,0
8	24,0
9	27,0
10	30,0