
Métodos para detecção e caracterização de biofilmes

Mônica Voss, Sandra Kunde Schlesner, Salah Chaji

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c6>

Resumo

A detecção de microrganismos, na forma de biofilmes tem sido amplamente discutida principalmente na formação deles nas superfícies de materiais encontrados em ambiente hospitalar e nas indústrias alimentícias. Dessa forma, é de extrema necessidade o uso de técnicas que consigam detectar a presença de biofilmes em quaisquer superfícies de diferentes materiais. Embora sejam utilizadas técnicas não-destrutivas e destrutivas de monitoramento de biofilmes, as estratégias comumente empregadas são análises por parâmetros de referências bioquímicos, químicos, microbiológicos e físicos. O método mais utilizado é o químico de coloração *Live/Dead*, realizado através da utilização de corantes para verificar células vivas e mortas. No método bioquímico, a análise mais empregada é a de EPS, onde ocorre à desestruturação do biofilme, onde é possível verificar a quantidade de carboidratos e proteínas que fazem parte da estrutura do biofilme. No método de parâmetros microbiológicos, o mais utilizado é a coleta da amostra utilizando *swab* com posterior plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia. Diversas técnicas físicas são aplicadas na caracterização de biofilmes em superfícies, entre as técnicas que possuem destaque estão microscópio de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser, microscopia de elétrons, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de refletância. Além da portabilidade, os métodos analíticos utilizados para analisar biofilmes devem ser simples, reprodutíveis, sensíveis e de baixo custo. Sabe-se os equipamentos utilizados na atualidade são rebuscados, alguns possuem elevada sensibilidade e reprodutibilidade, porém possuem elevado custo de aquisição, de manutenção e não são portáteis. Diferentes técnicas estão disponíveis para a detecção de biofilmes, entretanto para a análise *in situ* e no local, onde o biofilme está localizado, é necessário um método que apresente vantagens como a portabilidade, análise *in situ* e não destrutivo. Nesse sentido, recentemente foi desenvolvido um novo método de detecção empregando a termografia ativa no infravermelho que consiste em aplicar um estímulo energético externo e através do gradiente térmico entre o biofilme e a superfície metálica foi possível detectar o biofilme. As imagens capturadas pela termografia no infravermelho são semelhantes as imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura, mas podendo ser executado em poucos minutos. É um método sem contato, não destrutivo, de baixo custo, portátil e de fácil uso.

Palavras-chave: Biofilme; detecção; indústrias alimentícias; hospitais; microrganismos; termografia no infravermelho.

1. Introdução

Um desafio a ser superado nas indústrias de alimentos e ambiente hospitalar é em relação a contaminação microbiológica causada pela formação de biofilme sobre as superfícies dos equipamentos e utensílios.

A ocorrência de enfermidades de origem alimentar ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos é um problema recorrente no mundo inteiro e que ocorre, em grande parte, devido à elevada facilidade da formação dos biofilmes em ambientes de produção e manipulação de alimentos. Apesar de ser realizada a higienização e sanitização de todas as superfícies de processamento de alimentos, quando há a presença de sujidade ou os microrganismos apresentam-se na forma de biofilme, estes podem ser potencialmente resistentes a sanitizantes e a produtos químicos (ANDRADE, 2008).

A formação de biofilmes envolve múltiplos estágios, que inicia com a adesão microbiana e subsequente produção e acumulação de uma matriz extracelular. A matriz extracelular servirá como proteção para os microrganismos contra agentes químicos e físicos, dessa forma dificultando a remoção dos biofilmes das superfícies em que se estabelecem (FLEMMING; WINGENDER, 2010; COSTERTON, 1999).

Contudo, a avaliação da eficiência da sanitização na formação de biofilmes ainda é considerada um desafio (FERNÁNDEZ, *et al.*, 2019). Embora sejam utilizadas diferentes técnicas de monitoramento de biofilmes e sujidades *in situ*, as estratégias comumente empregadas são análises por parâmetros de referência bioquímicos, químicos, microbiológicos ou físicos (p. ex. microscópio de luz e microscopia eletrônica de varredura). Entretanto, os métodos de referência possuem características limitante para serem aplicados em análises de rotina, tais fatores que limitam o seu uso são a complexidade de operação, o tempo gasto, elevados volumes de reagentes, amostragem invasiva que por consequência degrada o biofilme, além da necessidade de infraestrutura adequada e pessoal especializado. Ademais, alguns equipamentos não são portáteis e não permitem o monitoramento contínuo durante os processos industriais (DOLL *et al.*, 2016; DENKHAUS *et al.*, 2007; CORTIZO; FERNÁNDEZ, 2003; ZHANG; FANG, 2001).

Considerando, que para a avaliação e detecção de biofilmes microbianos em diferentes superfícies são utilizados métodos físico, químicos e bioquímicos, esta revisão visa destacar a importância da detecção dos biofilmes nas indústrias de alimentos bem como no ambiente hospitalar, e dessa forma apresenta os principais aspectos, características, vantagens, limitações e aplicações desses métodos.

2. Biofilmes

Os biofilmes são definidos como adjuntos bacterianos sésseis que consistem em grupos multicelulares, compostos por células procarióticas e/ou eucarióticas unidos em uma matriz composta por substância polimérica extracelular (COSTERTON *et al.*, 1999; PANTANELLA *et al.*, 2013; ACHINAS *et al.*, 2020). A formação de biofilmes envolve múltiplos estágios, iniciando com a adesão microbiana com subsequente produção e acumulação de uma matriz extracelular, que é composta por uma ou mais substâncias poliméricas, tais como, proteínas, polissacarídeos, substâncias húmicas e DNA extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Para as bactérias a formação de biofilme promove algumas vantagens como a proteção contra antibióticos, desinfetantes, condições ambientais e a capacidade de sobreviver em condições deficientes de nutrientes (GOLDBERG, 2002; CHEN *et al.*, 1998; PENG; TSAI; CHOU, 2002; KOCH *et al.*, 2001; ACHINAS *et al.*, 2020).

Cerca de 99% da população de bactérias pode ser encontrada na forma de um biofilme em vários estágios de crescimento (DALTON; MARCH, 1998). O surgimento dessas comunidades sésseis e sua resistência inerente aos agentes antimicrobianos estão no centro de muitas infecções bacterianas persistentes e crônicas (COSTERTON, 1999).

Os microrganismos que crescem envolvidos no biofilme possuem vários mecanismos que aumentam a sua resistência a tratamentos antimicrobianos externos em comparação com bactérias no estado planctônico. Uma das teorias destinadas a compreender esta recalcitrância envolve a penetração lenta ou

incompleta de agentes antimicrobianos através da substância polimérica extracelular (EPS) do biofilme (FRANCOLINI; DONELLI, 2010).

A barreira da matriz pode também atuar como um mecanismo de defesa contra outros estímulos externos tais como luz ultravioleta e desidratação. A EPS também possui capacidade de neutralizar e diluir substâncias antimicrobianas (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). De fato, foi relatado que os biofilmes maduros são mais resistentes aos agentes bactericidas necessários para desestruturar células planctônicas do mesmo organismo no estado livre (KHOURY et al., 1992). Embora, a penetração incompleta da barreira da matriz tenha sido bem registada e revisada, este mecanismo de resistência não é eficaz contra todos os antimicrobianos.

Sendo os biofilmes bacterianos os maiores causadores de problemas nas indústrias de alimentos (KUMAR; ANAND, 1998), sistemas de água (FLEMMING; WINGENDER, 2010; BOTT, 1998), área de odontologia (MAROTTA, *et al.*, 2002) e principalmente no ambiente hospitalar (HALABI *et al.*, 2001), é muito importante saber quais são os microrganismos e identificá-los diretamente na superfície em que estão presentes.

2.1. Biofilmes no ambiente hospitalar

No ambiente hospitalar os biofilmes bacterianos são os principais responsáveis por infecções, e os microrganismos associados mais frequentemente às infecções são as bactérias gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* e as bactérias gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, e leveduras, particularmente espécies de *Candida* (DONLAN, 2001).

Comumente no âmbito hospitalar são utilizados dispositivos, como cateteres, *shunts*, endoscópios, respirador pulmonar que melhoraram significativamente os serviços de saúde e a recuperação do quadro clínico dos pacientes. Entretanto, complicações devido a infecções estão correlacionadas diretamente com os dispositivos médicos, pois os biofilmes são encontrados em

superfícies inertes, nesses dispositivos médicos de uso interno ou externo (BORDI; BENTZMANN, 2011).

As infecções provenientes de biofilmes em implantes ou nas superfícies de outros dispositivos são difíceis de erradicar devido à sua proteção natural, pois como mencionado anteriormente, os biofilmes protegem as bactérias, tornando-as mais resistentes a antibióticos e sanitizantes, em comparação com células vivas livres, levando a graves complicações clínicas. Isso está associado ao aumento dos casos de mortalidade e morbidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos, hospitalizados, idosos que correm maior risco devido a complicações sépticas e pacientes pediátricos. Devido às complicações no estado clínico dos pacientes e das internações ocorre o aumento dos custos de hospitalização (CRUZEIRO; CAMARGOS; MIRANDA, 2006; SRIVASTAVA; BHARGAVA, 2016).

As infecções clínicas estão associadas na maioria das vezes a formação de biofilmes em dispositivos médicos. Os marcapassos, os dialisadores elétricos, as próteses articulares, os cateteres intravenosos e urinários são indispensáveis para o tratamento dos pacientes, uma vez que não existe nenhuma alternativa para a substituição desses dispositivos. Na maioria das vezes, as bactérias das espécies *Staphylococcus* e *Pseudomonas* infectam oportunamente esses dispositivos de intervenção médica e através deles as bactérias entram no sistema do paciente. Sobre isso, observou-se que os *Staphylococcus* podem infectar feridas abertas e implantes (AKIYAMA, *et al.*, 2002), também foi relatado à presença de *Staphylococcus epidermidis* em dispositivos médicos (OTTO, 2009).

Em cateteres venosos centrais, foi relatada a presença de organismos formadores de biofilmes no lúmen e na superfície desses cateteres (DONLAN, 2008), e os principais microrganismos colonizadores são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (KOKARE., *et al.*, 2009).

Já em cateteres urinários, que podem ter sistemas aberto ou fechados, os microrganismos que causam contaminações são *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Enterococcus faecalis* e algumas bactérias gram-negativas (DONLAN, 2001; KOKARE., *et al.*, 2009).

As implantações de próteses, biopróteses e válvulas mecânicas (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; SIHORKAR; VYAS, 2001). são suscetíveis à colonização microbiana e subsequentemente a formação de biofilmes. Os microrganismos mais comuns que formam biofilmes nestes casos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, bacilos gram-negativos, *candida spp*, *Enterococci* e *diphtheroids* (KOKARE., *et al.*, 2009).

A colonização por essas bactérias em corpos estranhos médicos ou dispositivos permanentes é uma das principais causas de infecções associadas à hospitalização (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Além disso, esses organismos ubíquos causam infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos (BOU *et al.*, 2006). As infecções bacterianas são provavelmente as complicações pós-cirúrgicas mais comuns e desafiadoras que afetam os implantes biomédicos. Nesse sentido, a formação de biofilmes em superfícies implantadas é uma das principais causas de falha do implante (DOUGLAS, 2003). Estes microrganismos muitas vezes provocam infecções persistentes e crônicas em pacientes que têm cateteres, próteses ou outros dispositivos semelhantes e aqueles com sistema imunológico comprometido (FOXMAN, 2002).

2.2 Impactos causados pela presença de biofilmes na indústria de alimentos

Os procedimentos de limpeza e higienização são essenciais para uma boa manutenção do ambiente de processamento de alimentos, evitando a contaminação bacteriana. Porém, quando os equipamentos e utensílios são higienizados inadequadamente pode ocorrer a formação de biofilmes bacterianos, que constituem uma importante fonte de problemas sanitários e perdas econômicas nas indústrias de alimentos e podem contribuir para a contaminação cruzada e transmissão de microrganismos patogênicos e deteriorantes para os alimentos. Por consequência, os riscos de surtos alimentares aumentam, podendo causar doenças infecciosas, além de reduzir a

vida útil dos produtos e a perda de credibilidade da indústria (NYACHUBA, 2010; TODD *et al.*, 2009).

A presença de resíduos de alimentos em equipamentos industriais, muitas vezes são oriundos das práticas inadequadas de limpeza, e esses resíduos aderidos podem facilitar a sobrevivência de microrganismos (LEON & ALBRECHT, 2007). Portanto, é necessária uma limpeza frequente para remover e evitar quaisquer adesões de material orgânico, inorgânico e, principalmente de microrganismos. Se a higienização não for adequada, ocorrerá a necessidade de nova higienização que pode exigir procedimentos de limpeza mecânica intensos ou concentrações muito altas de desinfetantes ou ambos, que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (WHITEHEAD, SMITH & VERRAN, 2008; FERNÁNDEZ, *et al.*, 2019).

Além disso, uma vez que os biofilmes estejam instalados nas superfícies dos equipamentos eles agem como camadas isolantes e ocasionam o processo denominado corrosão microbiologicamente induzida, assim prejudicando a transferência de calor entre as superfícies e reduzindo a vida útil dos equipamentos. Conseqüentemente, há redução da eficiência energética e acréscimo de despesa de relacionadas a manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos.

Na indústria de alimentos os biofilmes podem se acumular em superfícies de diferentes materiais, tais como, aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, polietileno de baixa densidade, policarbonato, entre outros. Convém ressaltar que o biofilme, quando submetido ao calor, pode cristalizar e formar depósitos ou crostas que são muito aderentes, protegendo novos microrganismos e dificultando ainda mais os procedimentos de higiene (PARIZZI *et al.*, 2004).

Portanto, o controle da aderência de microrganismos às superfícies é essencial para manutenção da qualidade dos alimentos. As operações de lavagem e sanitização, mesmo que frequentes, não podem garantir a eliminação completa dos biofilmes, pois sabe-se que muitas das superfícies em contato com o alimento assim como as tubulações e equipamentos, apresentam cantos,

sulcos, rugosidades, rachaduras, e zonas de baixo fluxo, onde os biofilmes facilmente se desenvolvem (NITSCHKE, 2006).

3. Métodos de detecção para avaliar eficiência de higienização

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a eficiência de higienização das superfícies tanto nas indústrias de alimentos quanto nos hospitais é o teste de bioluminescência de adenosina trifosfato (ATP), que é um método bioquímico rápido que estima o ATP total, em que a amostra é coletada através de *swab*. O ATP total está relacionado à quantidade de resíduos alimentares e/ou microrganismos coletados. O método baseia-se na reação enzimática do ATP com luciferina-luciferase, resultando em emissão de luz que é mensurada por um luminômetro, cuja intensidade é expressa em unidades de luminescência relativa (RLU) (SHAMA; MALIK, 2013).

A bioluminescência de ATP é um bom método para a determinação rápida da eficiência de limpeza, geralmente o resultado é obtido entre 5 e 10 min. Nesse método tanto os resíduos de alimentos quanto os microrganismos são detectados. Como o teste é realizado rapidamente, podem ser tomadas medidas corretivas imediatas (SHAMA; MALIK, 2013). Os métodos de bioluminescência de ATP são uma alternativa atrativa porque fornecem avaliação da limpeza da superfície em tempo real (GRIFFITHS, 1993; VILAR, *et al.*, 2008). Assim, esses métodos são adequados para monitorar a limpeza dentro dos sistemas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (AYCICEK *et al.*, 2006).

A bioluminescência do ATP tem sido utilizada para avaliar a higiene das superfícies de contato com alimentos em diversas situações, incluindo hospitais (AMODIO; DINO, 2014) e equipamentos das indústrias de laticínios (VILAR, *et al.*, 2008). Além disso, este método foi usado para avaliar a contaminação microbiana em alimentos como leite cru (COSTA *et al.*, 2006), carcaças de frango (BAUTISTA *et al.*, 1997), presença de bactérias e para avaliar a eficiência de limpeza de sujidades em diferentes superfícies (KOO *et al.*, 2013; WHITEHEAD; SMITH; VERRAN, 2008). Esse método detecta contaminação bacteriana, mas também fontes não-microbianas de ATP, tais

como resíduos orgânicos (alimentares), a presença destes indica uma limpeza deficiente que beneficia o crescimento microbiano.

As principais vantagens desse método são a rapidez, simplicidade e principalmente a possibilidade de efetuar análises em campo. Entretanto, como limitantes esse método requer que sejam delimitadas áreas antes das análises, dessa forma, não é possível verificar a localização exata das sujidades ou microrganismos presente no local analisado. Além disso, por ser uma reação enzimática, a técnica de ATP bioluminescência é afetada por parâmetros como pH e temperatura. Valores acima ou abaixo destes podem inativar a luciferase ou retardar a velocidade da reação. Além desses parâmetros, a turbidez e a cor, no caso de análise de amostra líquida, podem influenciar diretamente os resultados (SHAMA; MALIK, 2013).

Além desse método rápido e de fácil manuseio, WHITEHEAD *et al.*, (2009) verificaram que com o uso de métodos físicos é possível detectar incrustações residuais nas superfícies, por exemplo, medindo mudanças no ângulo de contato. Contudo, os resultados obtidos pelos autores demonstram que não é possível verificar a distribuição da sujidade sobre a superfície e os dados são de difícil interpretação. Outra técnica empregada para o monitoramento de diferentes tipos de sujidade em superfícies, como por exemplo aço inoxidável, é a microscopia de epifluorescência, que foi utilizada para a identificação do padrão de adesão ou remoção celular. Para tanto, a avaliação foi efetuada através da adição de uma película de proteína sobre o microrganismo *Staphylococcus aureus* em superfícies de titânio. Sobre essa superfície, foi pulverizada uma solução de dodecilsulfato de sódio para simular o processo de higienização. Dessa forma, pôde-se observar que quando as células dos microrganismos estavam protegidas pela película de proteína as mesmas não foram removidas, mostrando *in situ* que a presença de material orgânico nas superfícies altera a sua capacidade de limpeza. Apesar da possibilidade da detecção dos microrganismos o tamanho da área analisada (2 μm) é um limitante para as análises de rotina nas indústrias, pois não ocorre a amostragem real da superfície analisada, ocasionando erros na análise (VERRAN; WHITEHEAD, 2006).

WHITEHEAD; BENSON; VERRAN (2015) avaliaram sujidades de extrato de peixe e células de *Listeria monocytogenes* depositados sobre placas de aço inoxidável. Os substratos aderidos foram visualizados por microscopia de epifluorescência (510-560 nm), onde a porcentagem da área coberta pelos materiais orgânicos e pelos microrganismos foi determinada. Por sua vez, essa técnica possibilitou a visualização direta da contaminação de superfícies e a área onde havia a presença de células. As imagens das células foram obtidas *in situ*, com resultados imediatos, representando verdadeiramente o número de células e o material orgânico que também pode ser visualizado e quantificado. Porém, essa técnica apresenta limitações como a difícil disponibilidade do equipamento, necessidade de operadores treinados, grande número de replicatas da amostra e, principalmente, não é possível representar toda a superfície, ou seja, esse método não possibilita a visualização de uma grande área de exposição.

Em outro trabalho da literatura a microscopia de epifluorescência e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados para visualizar a distribuição de *Escherichia coli* e de resíduos de alimentos (proteína, gordura e carboidratos) em superfícies de aço inoxidável. A técnica de microscopia de epifluorescência possibilitou a determinação de baixos níveis de sujidade (0,1 % a 1 %), enquanto com MEV foi possível fazer a detecção somente em níveis de 10 % de sujidade, ou seja, com o uso do MEV não foi possível detectar baixos níveis de sujidade (0,1 % e 1%) (WHITEHEAD; SMITH; VERRAN, 2008). Embora o MEV forneça informações sobre a distribuição de materiais e células em uma superfície, é um método que requer manipuladores treinados e especializados, necessita do preparo da amostra e apresenta custo elevado de aquisição e manutenção.

Além dessas técnicas utilizadas para a detecção de sujidades, pode-se ainda citar a espectroscopia de Raios-X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, radiação ultravioleta (UV) e microscopia de força atômica. Mas, esses métodos requerem analistas qualificados, são de alto custo, e não fazem o monitoramento completo de uma superfície, ou seja, somente avaliam pequenas áreas, o que limita sua utilização em análises de rotinas nas indústrias de alimentos (WHITEHEAD; BENSON; VERRAN, 2011; ABBAN; JAKOBSEN; JESPERSEN, 2014; PHINNEY *et al.*, 2017).

4. Detecção e caracterização dos biofilmes

Na atualidade, a detecção de microrganismos na forma de biofilmes tem ganhado destaque, devido aos problemas de contaminações associados a eles em ambientes hospitalares e industriais. A presença de biofilme nas superfícies de equipamentos na área alimentícia ou em dispositivos médicos podem causar sérios danos à saúde, pois desencadeia infecções que podem ser letais em pessoas com quadro clínico crítico (DENKHAUS *et al.*, 2007).

Vários métodos são usados para detectar e monitorar a carga microbiana em superfícies nas indústrias de processamento de alimentos e em superfícies em geral. Além do monitoramento *in situ* de biofilmes, as estratégias comumente empregadas são análises por parâmetros de referências bioquímicos, químicos e microbiológicos (AZEREDO *et al.*, 2017). As técnicas são classificadas de acordo com a definição:

- Química: quando utiliza corantes ou fluorocromos que podem se ligar ou adsorver aos componentes do biofilme.
- Física: quando a biomassa total do biofilme pode ser obtida a partir de medidas de peso seco ou úmido.
- Microscópica: quando uma modalidade de imagem é usada para detectar a formação de biofilme (ou seja, sempre que um microscópio é usado).
- Biológica: quando uma técnica utiliza a estimativa da viabilidade celular na medição e detecção da formação de biofilme.

4.1. Métodos Químicos

O método químico mais utilizado é o de coloração *Live/Dead*, que é realizado através da utilização de corantes para verificar células vivas e mortas, sendo que as células vivas apresentam coloração azulada, enquanto as células mortas ficam na coloração avermelhada (DOLL *et al.*, 2016).

Porém, segundo RAMAJANI *et al.*, (2019), a coloração de placa de microtitulação é a mais comum, sendo a quantificação de biofilme estático, se baseia principalmente em corantes colorimétricos (mais comumente usados são cristal violeta e safranina) (RAJAMANI *et al.*, 2019). Nesse método, placas de

microtitulação (placa de 96 poços) são cultivadas com uma suspensão bacteriana, a seguir, as placas são cobertas e incubadas por um tempo específico (OJIMA; NUNOGAMI; TAYA, 2016). Depois o tempo de incubação, as placas são lavadas para remover microrganismos não aderentes. O restante microrganismos são fixados na superfície, normalmente pela adição de uma solução de metanol (STEPANOVIC; VUKOVIC; DAKIC, 2000). Depois de adição da solução de metanol, as placas contendo os microrganismos são deixadas para secar. O biofilme pode ser corado para avaliar a atividade metabólica ou obter a biomassa total.

Outro método utilizado e reportado na literatura é a atividade metabólica de uma amostra contendo biofilme que é medida para discriminar entre células vivas e mortas. Dois corantes usados para avaliar a viabilidade de uma amostra são o cianoditolil tetrazólio sal de cloreto e sal de tetrazólio sódico (AZEREDO *et al.*, 2017; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). A mensuração da biomassa da atividade metabólica é principalmente aplicada para a quantificação de células viáveis em culturas planctônicas (GABRIELSON, *et al.*, 2002).

A biomassa total de um biofilme pode ser obtida por coloração, mas dois exemplos de obtenção de biomassa total por coloração são dados em OJIMA *et al.*, (2016) e NGUYEN *et al.*, (2012) onde os autores usaram uma solução de safranina para manchar células de *E. coli*. Após 20 min de repouso à temperatura ambiente, as placas de microtitulação foram lavadas duas vezes. Após a etapa de lavagem, as manchas células foram solubilizadas pela adição de acetona em etanol, a suspensão foi condensada, e o índice do biofilme e o número de células foi medido pela absorção da solução de corante com um leitor de placas (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). Outra possibilidade de medir a biomassa total é aplicar a coloração com cristal violeta (CV) (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2014). MARCOS-ZAMBRANO *et al.* (2014) seguido o mesmo procedimento de OJIMA *et al.* (2016) e NGUYEN *et al.* (2012), utilizou um espectrofotômetro para calcular as medições finais do biofilme total. Ao comparar os diferentes métodos, os resultados variam, portanto, pode-se concluir que MPDS para biomassa total tem baixa reprodutibilidade. Além disso, as leituras colorimétricas são frequentemente prejudicadas por variações que podem ocorrer (RAJAMAN *et al.*, 2019).

A análise de biomassa baseada em fosfolipídios é baseada na medição de fosfolipídios, que são componentes celulares, pois estes são universalmente distribuídos e expressos em um nível constante entre a comunidade microbiana. No entanto, a determinação de fosfolipídios é limitada pela sua taxa de recuperação e pela sensibilidade do equipamento analítico (AZEREDO *et al.*, 2017). Para identificar os diferentes fosfolipídios, pode ser utilizado um cromatógrafo a gás. Esta técnica é aplicada principalmente na diferenciação de microrganismos no solo e fornece informações sobre a viabilidade do microrganismo e estrutura (WU *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2019). No entanto, AZEREDO *et al.*, (2017) descreveu esta técnica como uma possível substituição para unidades formadoras de colônias (CFU). Além disso, um artigo recente de HUANG *et al.*, (2019) foi o primeiro a vincular a atividade respiratória microbiana com o ácido graxo fosfolipídico de biofilmes em escala real em biorreatores. Os microrganismos formam diversos ácidos graxos fosfolipídicos (PFA) por meio de vários processos químicos. Essas reações químicas variam por espécie, portanto, o PFA é específico da espécie e pode ser usado para coletar informações sobre as diferentes espécies de microrganismos que vivem em biofilmes (HUANG *et al.*, 2019). Além disso, como dito, é possível avaliar a viabilidade dos microrganismos presentes no biofilme. O PFA e a taxa de consumo de oxigênio são descobertos apenas em organismos vivos, células e, portanto, podem ser usados como biomarcadores característicos para microrganismos vivos (HUANG *et al.*, 2019). A partir disso, pode-se concluir que a análise de biomassa baseada em fosfolipídios pode ser usada para diferenciar entre microrganismos presentes em um meio específico. Além disso, pode-se estimar a viabilidade das células presentes em um meio.

4.2. Métodos Biológicos/ Bioquímicos

No método bioquímico a análise mais empregada é a caracterização da EPS. Nesse tipo de análise, ocorre a desestruturação do biofilme, e a verificação da quantidade de carboidratos e proteínas que fazem parte da estrutura dele. Entretanto, nesse método é necessário saber a localização exata do biofilme para que o mesmo possa ser coletado para análise (KARUNAKARAN *et al.*, 2011). Já os métodos baseados em parâmetros microbiológicos mais comuns

utilizam a coleta da amostra com *swab* com posterior plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (DOLL *et al.*, 2016).

Unidades formadoras de colônias é a técnica mais amplamente utilizada para estimar a viabilidade celular do biofilme (AZEREDO *et al.*, 2017). O conceito básico deste ensaio é separar as células individuais em uma placa de ágar e cultivar colônias das células, diferenciando assim as células vivas das células mortas. Se uma célula individual pode proliferar e dividir em células maduras, formará uma colônia individual (WILSON *et al.*, 2017). Células viáveis, mas não cultiváveis (do inglês, *Viable but non-culturable*, VBNC), são caracterizadas por uma perda de cultura em ágar, o que dificulta sua detecção por UFC (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). De acordo com LI *et al.*, (2014), é até possível que todas as bactérias em uma amostra estejam no estado VBNC. Se esse fenômeno ocorrer, a amostra pode ser considerada como livre de germes devido à não detecção (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). O procedimento começa com uma maturidade biofilme que é transferido para um meio líquido por meio de raspagem, vórtex ou sonicação e é, portanto, uma técnica de medição de biofilme destrutiva. Após a incubação no meio líquido, as colônias são contadas nas placas e o número de células da cultura original é calculada usando contagens médias de colônias, o volume amostra utilizado (UFC/mL) de cultura semeado e o fator de diluição do biofilme suspenso (WILSON *et al.*, 2017).

Exceto para medir a viabilidade usando o número de UFC, esta técnica também pode ser usada para outras finalidades, como por exemplo disso é a aplicação para testar se diferentes materiais afetam o crescimento do microrganismo (AKENS *et al.*, 2018). AKENS *et al.*, (2018) aplicou UFC para comparar placas ortopédicas de aço inoxidável e titânio. Outra aplicação do UFC é avaliar o desempenho de vários materiais anti-bioincrustantes (VAN DEN DRIESSCHE *et al.*, 2014).

Os métodos microbiológicos em geral, são baratos e de fácil manuseio, além das análises poderem ser realizadas em meios seletivos, onde bactérias específicas podem ser isoladas e identificadas. Entre as principais limitações desse método cabe destacar o elevado tempo para as análises e a pequena área analisada, pois ela deve ser previamente delimitada e durante esse procedimento podem erros de amostragem e conseqüentemente resultados

falso-negativos (CHAE; SCHRAFT 2001; WIRTANEN; MATILLA-SANDHOLM, 1993).

Outro método utilizado para as análises microbiológicas de biofilmes é o contato da superfície a ser analisada diretamente com uma superfície de ágar solidificado depositado em uma placa, chamado de placa de *RODAC*. Este método é mais simples do que o *swab*, mas não é possível amostrar superfícies irregulares, além disso, esse método depende do tempo de contato ágar/superfície e pressão aplicada onde elevadas pressões podem danificar e inutilizar o ágar (OKAMOTO, 2018; NYDER, 2003). Ademais, os microrganismos podem não aderir quantitativamente à superfície do ágar, ocorrendo a subestimação do número de microrganismos presentes na superfície amostrada (OKAMOTO, 2018; NYDER, 2003).

Dessa maneira, pode-se perceber que os métodos microbiológicos incluindo *swab* e métodos de contato em ágar, são amplamente utilizados para avaliar a limpeza das superfícies em indústrias alimentícias, entretanto exigem longos períodos de incubação (24 a 72 h de crescimento), o que não é desejado em análises de rotina, pois nas indústrias de alimentos os resultados devem ser obtidos rapidamente.

4.3. Métodos Físicos

KINNER *et al.*, (1983) e MURGA *et al.*, (1995), foram os pesquisadores pioneiros a publicar artigos sobre a análise de biofilmes, sendo essas pesquisas relacionadas aos parâmetros microbiológicos, tais como espessura do biofilme, peso seco total e contagem total de células. Entretanto, essa caracterização foi insuficiente para descrever a atividade do biofilme. Dessa forma, muitos métodos foram aperfeiçoados para que fosse possível realizar a caracterização dos mesmos (LAZAROVA; MANEM, 1995). Assim os métodos podem ser organizados de acordo com o tipo de informação trazida acerca dos biofilmes: (i) formação e estrutura do biofilme, (ii) composição do biofilme, componentes específicos do biofilme e (iii) atividade da biomassa (DENKHAUS *et al.*, 2007).

Outra informação importante é a identificação fenotípica de cepas produtoras de biofilme pode ser realizada pelo método do tubo de ensaio ou pelo

teste de placa de micro titulação (MtP) que é baseado na mensuração da densidade óptica (O.D.) de biofilmes bacterianos corados que estão depositados em microplacas de 96 poços, a leitura é realizada em espectrofotômetro produzindo resultados quantitativos do biofilme total, não distinguindo entre células mortas e vivas (MERINO *et al.*, 2019).

Segundo RAJAMANI *et al.* (2019), a coloração de placa de microtitulação é o método mais utilizado para a quantificação estática de biofilme, que se baseia principalmente em corantes colorimétricos (mais comumente usados são cristal violeta (CV) e safranina) que são extraídos de biofilmes corados.

Outra técnica que é utilizada na detecção de biofilmes é visível (Vis) e infravermelho próximo ((NIR) que é baseado nas propriedades dos materiais em absorver e/ou refletir luz em diferentes bandas espectrais. Foi realizado estudos com biofilmes é o método utilizado obteve várias imagens nas bandas espectrais usando uma câmera fotográfica digital (GRISKIN; IAKUSKIN; STEPENKO, 2017). Essas imagens foram analisadas comparando-as com grupos conhecidos de índices de vegetação, como o índice de vegetação de diferença normalizada e a vegetação de diferença normalizada aprimorada. O processamento de imagens é uma técnica amplamente utilizada e sua aplicação varia. Exemplos de a aplicação desta técnica é a análise da umidade do solo, monitoramento bacteriano em fontes de água potável, indústrias de alimentos e atividade antibacteriana de materiais têxteis (GHEORGHE; DEAC; FILIP, 2019; ANCUTA *et al.*, 2019; FERNANDEZ *et al.*, 2019; SHAMS-NATERI; PIRI; MOKTHARI, 2018). Além disso, existem técnicas que usam luz visível para desencadear uma reação do biofilme em questão.

ZHIQIANG *et al.*, (2019), fabricaram anfifílicos liberadores de óxido nítrico (NO) e aplicou isso ao biofilme, que desencadeou uma reação e, por sua vez, liberou NO quando exposto a luz visível. No entanto, esta última técnica é diferente da técnica VIS&NIR, pois sua implementação requer os anfifílicos liberadores de NO fabricados e um microscópio para visualizar a reação.

4.3. Microscópios

Na literatura são relatadas diversas técnicas aplicadas na caracterização de biofilmes em superfícies. Entre as técnicas que possuem destaque, pode-se elencar o microscópio de luz, (CORTIZO; FERNÁNDEZ, 2003) microscopia eletrônica de varredura (MEV) (WOLF; CRESPO; REIS, 2002; CLAYBORN, *et al.*, 2015; PANDE; MCWHORTER; CHOUSALKAR, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; AZEREDO, *et al.*, 2017), microscopia confocal de varredura a laser (ZHANG; FANG, 2001), microscopia de elétrons e microscopia de força atômica (AFM) (OZKAN *et al.*, 2016). Essas técnicas são utilizadas para verificar a morfologia, espessura do biofilme, caracterização das espécies presentes, características estruturais do biofilme e análise detalhada da adesão dos biofilmes na superfície e análise topográfica do biofilme (MOREIRA *et al.*, 2017; ORTEGA *et al.*, 2010; OZKAN *et al.*, 2016).

A microscopia de luz é uma técnica de linha de base útil para fornecer identificação visual do biofilme formação (AZEREDO *et al.*, 2017). A absorção de luz por biofilmes foi correlacionada com a massa celular do biofilme e massa total de biofilme. A microscopia de luz é baseada na relação linear entre a intensidade de um pixel em imagens de biofilme e o número correspondente de células. Esta relação permite o cálculo da espessura do biofilme (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2007). A microscopia de luz requer um preparo simples de amostra, sendo está barata e fácil de executar.

A aplicação de microscopia de luz resulta em uma imagem do biofilme, porém para ocorrer a aquisição da imagem há a necessidade da coloração do biofilme. E para isso primeiramente deve-se selecionar um método de coloração adequado.

No entanto, em comparação com outras técnicas de microscopia, sua resolução é relativamente baixa, não sendo o suficiente para determinar relações intercelulares e diferenciação morfotipo (AZEREDO *et al.*, 2017).

A microscopia confocal de varredura a laser (do inglês, *Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis*, CLSM) é uma microscopia de fluorescência, amplamente utilizada para estudar biofilmes, pois permite a avaliação da

estrutura espacial do biofilme e a visualização da distribuição celular na matriz do biofilme (NEU; LAWRENCE, 2014).

A aplicação da técnica resulta em imagens 3D do biofilme e os parâmetros como espessura e rugosidade do biofilme podem ser obtidos (NEU; LAWRENCE, 2014). Ao contrário de muitas outras técnicas de microscopia, o CLSM não requer fixação e desidratação da amostra de biofilme, portanto, é uma técnica não destrutiva que pode ser realizada *in situ* e em tempo real (PALMER; STERNBER, 1999).

No entanto, a alegação de estar *in situ* só é válida para amostras de biofilme formadas em uma superfície plana que caberá sob o microscópio. Além disso, CLSM tem sido aplicado em muitos domínios diferentes, exemplos dos quais são a detecção de biofilme em membranas de osmose reversa em indústrias processadoras de leite (STOICA, *et al.*, 2018), na validação de propriedades anti-incrustantes de polímeros específicos (BOGUSLAVSKY, *et al.*, 2018), e na identificação de bactérias marinhas e suas características de bioincrustação (JEONG, *et al.*, 2018).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de microscopia baseada na dispersão de superfície e na absorção de elétrons atingindo alta profundidade, produzindo uma aparência 3D da superfície do biofilme, visualização do biofilme, distribuição do biofilme e EPS disperso nos biofilmes (CLAYBORN, *et al.*, 2015). Para visualizar essas características, é necessário secar a amostra e operar sob vácuo (WANG, *et al.*, 2018; CLAYBORN, *et al.*, 2015; CHATTERJEE, *et al.*, 2014). Vários exemplos da aplicação do MEV são para estudar a capacidade das bactérias desenvolver biofilmes em diferentes superfícies em várias condições ambientais, como por exemplo avaliar a formação de biofilmes de *Salmonella spp.*, (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2014), e a distribuição de *Pseudomona aeruginosa* em superfície de aço inoxidável (VOSS, *et al.*, 2020).

Devido às propriedades do MEV para aumentar as amostras até um único nível molecular, as propriedades de adesão de microrganismos individuais podem ser monitoradas (BOGUSLAVSKY, *et al.*, 2018).

De acordo com NORTON *et al.*, (1998), o MEV é capaz de visualizar um biofilme muito fino porque se concentra nas superfícies dos objetos. Isso é favorável quando a formação inicial do biofilme é investigada, no entanto, quando a formação do biofilme está em um estágio de crescimento posterior, como a proliferação dos microrganismos, as imagens obtidas por MEV permanecem focadas na camada superior do biofilme e, portanto, não fornecem informações sobre a espessura do biofilme ou sua estrutura 3D (NORTON *et al.*, 1998).

Apesar da alta resolução, o MEV não é capaz de diferenciar entre diferentes microorganismos, portanto o microorganismo do qual o biofilme consiste deve ser conhecido de antemão. Para qualquer aplicação de MEV, um extenso preparo de amostra é necessário, e isso pode resultar em danos às amostras biológicas (CHATTERJEE, *et al.*, 2014). Assim, se o MEV for aplicado para análise de biofilme em superfícies, uma amostra de biofilme deve ser removida e preparada para posterior análise, o que implicará em danos à amostra, portanto, o MEV pode ser considerado como uma técnica destrutiva.

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica de microscopia baseada na deflexão de uma “ponta” metálica. Esta ponta metálica se move sobre a superfície do alvo, e a deflexão da ponta é registrada (OZKAN, *et al.*, 2016). Utilizando a deflexão registrada, a topologia e as propriedades do material de uma superfície podem ser medidas. MFA é uma técnica não destrutiva e é capaz de obter visualizações topográficas em 3D, detalhes estruturais do biofilme e várias interações, como forças de interação microrganismos de superfície e coesão do biofilme (CHATTERJEE, *et al.*, 2014; MERINO, *et al.*, 2019).

Além disso, em contraste com outras técnicas de microscopia, o MFA pode ser aplicado em condições ambientais e, portanto, torna obsoleto o pré-tratamento das amostras (CHATTERJEE, *et al.*, 2014). AFM também é aplicável em superfícies líquidas, o que geralmente é necessário na imagem *in situ* de biofilmes (HANNIG *et al.*, 2010).

No entanto, para aplicar MFA em amostras líquidas, o procedimento deve ser alterado. Se a ponta passar a superfície, a ponta pode danificar o biofilme. Para superar o dano do biofilme, o modo de varrimento da ponta ao longo da superfície do biofilme é alterado para o modo de toque (*tapping*) (CHATTERJEE,

et al., 2014). A técnica de toque, em vez de mover-se constantemente pela superfície do biofilme, é amplamente utilizada (CHEN *et al.*, 2019). Apesar da afirmação de MERINO *et al.*, (2019) que o MFA é uma técnica não destrutiva de detecção de biofilme, BIRARDA *et al.*, (2019) afirmaram que para avaliar a espessura da matriz, parte da matriz foi riscada e a diferença de espessura entre a área riscada e a área do biofilme foi medida e diferenças foram encontradas.

A aplicação do MFA por Birarda *et al.* (2019) indica que a técnica é destrutiva se o objetivo é obter informações sobre a espessura do biofilme de uma amostra. Além disso, em comparação com outras técnicas de microscopia, o MFA é capaz de oferecer a mais alta resolução de 1–10 nm (MERINO *et al.*, (2019), e de acordo com CHATTERJEE *et al.*, (2014), essa técnica pode fornecer resolução nanométrica quase rotineiramente. Para detectar um biofilme formado em uma superfície de equipamento e/ou utensílio não é necessário um exaustivo preparo de amostra, porém o biofilme deve ser transferido para uma superfície na qual o microscópio possa focalizar.

De acordo com SURMAN *et al.*, (1996), a microscopia eletrônica de varredura ambiental (do inglês, *Environmental Scanning Electron Microscopy*, ESEM) é uma forma modificada de MEV, no entanto, a literatura recente afirmou que ESEM é um instrumento separado e em maioria dos casos não é uma modificação do MEV (FRÁNKOVÁ *et al.*, 2018). A alta pressão da água usada no ESEM permite imagens do espécime hidratado, ao contrário do MEV que só pode gerar imagens de amostras secas (NGUYEN; RODDICK; FAN, 2012). Além disso, não há necessidade das análises serem realizadas em alto vácuo como MEV (DOUCET *et al.*, 2005).

O benefício mais importante do ESEM, em comparação com o seu predecessor MEV, é a capacidade de investigação dinâmica *in situ* de mudanças de amostra ou reações sob várias temperaturas e pressões (KRAUSKO *et al.*, 2014).

O preparo de amostra para ESEM é bastante rápida em comparação com a maioria das outras técnicas de microscopia. ESEM não requer coloração, secagem ou revestimento de amostras. Isso torna o ESEM benéfico no que diz respeito ao consumo de tempo do processo de visualização do biofilme e causa significativamente menos interrupção e danos à amostra de biofilme (DOUCET

et al., 2005). O preparo da amostra requer que o biofilme formado na superfície de um equipamento e/ou utensílio seja removido e colocado em uma placa que caiba na câmara do equipamento, e isso pode causar danos ao biofilme, no entanto, devido à ausência de secagem e coloração necessárias da amostra, nenhum dano posterior é causado.

Essas técnicas para a caracterização de biofilmes são amplamente utilizadas, porém a grande maioria possui limitações nos quesitos de rapidez e portabilidade e muitas vezes necessitam de uma etapa prévia de preparo de amostra, resultando na destruição do biofilme e/ ou a remoção do mesmo do local de origem (PARKER et al., 2017).

5. Termografia ativa no infravermelho para detecção de biofilmes

Como citado anteriormente há técnicas diferentes para a detecção de sujidade e biofilmes, no entanto, para a análise *in situ* e onde a sujidade e o biofilme estão localizados, é necessário utilizar metodologias que ofereçam a vantagem de portabilidade, análise *in situ*, não invasiva, não destrutiva de fácil uso e sem preparo de amostra. Desta forma, recentemente foi publicado na literatura um trabalho utilizando a termografia ativa no infravermelho para detecção de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície metálica.

A termografia ativa necessita de um estímulo energético externo sobre a superfície do objeto, para que a temperatura seja determinada. As fontes de energia externa que podem ser utilizadas são ar quente, lâmpadas, radiações eletromagnéticas, flashes, ultrassom, micro-ondas, laser, entre outros. Em todos os casos, o objetivo é a produção de um diferencial térmico no corpo, permitindo a visualização de regiões com diferentes características (GOWEN et al., 2010; USAMENTIAGA et al., 2014).

Neste contexto, algumas aplicações da termografia ativa também são relatadas na área de alimentos, tais como o controle da temperatura de frangos e salsichas durante o aquecimento e cozimento (IBARRA et al., 2000; CISCHOSKI et al., 2015), o monitoramento da temperatura de alimentos durante os processos de secagem (TRAFFANO-SCHIFFO et al., 2014.; CUCCURULLO

et al., 2012; FITO, et al., 2004), o monitoramento de injúrias pós-colheita em frutas e hortaliças (VARITH et al., 2003; VAN LINDEN et al., 2003).

Além disso, a termografia no infravermelho também pode ser empregada na detecção de contaminação microbiológica em alimentos (HAHN, et al., 2006; STOLL et al., 2008), detecção de objetos estranhos em linhas de produção (SENNI, et al., 2014) e infestações em grãos de trigo por insetos em diferentes estádios de vida (MANICKAVASAGAN et al., 2008). Ademais, essa técnica vem sendo utilizada na identificação de defeitos em embalagens e no controle de climatização durante o armazenamento (VADIVAMBAL; JAYAS, 2011).

Para a detecção de biofilme e *Pseudomonas aeruginosa* em superfície metálica VOSS *et al.*, (2020) desenvolveram um método em que placas de aço inoxidável (1x1 cm²) foram utilizadas como superfície para o crescimento e desenvolvimento de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. As diferenças de temperatura de superfície medidas pela câmera infravermelha podem ser causadas pela variação espacial do fluxo de calor devido às diferentes propriedades térmicas dos materiais, obtidas no TA, nesse caso para que ocorresse a detecção do biofilme com a câmera de infravermelho, foi necessário gerar um gradiente térmico entre o biofilme e as placas de aço inoxidável e para isso as placas metálicas foram resfriadas com temperatura de $-11 \pm 1^\circ\text{C}$, e com isso foi produzido um gradiente térmico, pois as propriedades termodinâmicas dos materiais são diferentes.

Desta forma, as diferentes propriedades térmicas entre o aço inoxidável e o biofilme revelou a presença de biofilmes nas superfícies metálicas sob resfriamento. No entanto, é difícil afirmar com precisão as propriedades térmicas dos biofilmes devido ao alto número de variáveis relacionadas à sua formação. Por exemplo, o calor específico do aço é 0,50 J/g °C, alguns valores de calor específico foram relatados para biofilmes, tais como 0,21 J/g °C para *Pseudomonas cepacia*, 0,60 J/g °C para matéria seca de *Escherichia coli*.

A variação de temperatura (ΔT) durante o resfriamento foi maior para os biofilmes em relação ao aço inoxidável, com ΔT de 8,7 °C e 1,6 °C, respectivamente. Esse comportamento segundo VOSS *et al.*, (2020) pode ser caracterizado pelas diferenças de difusividade térmica e efusividade dos materiais.

A termografia ativa no infravermelho para detecção de biofilmes foi comparada com MEV e imagens semelhantes foram obtidas, portanto esse método recente pode ser utilizado para detecção de biofilme em superfície metálica, sendo esse um método simples, rápido (3 minutos), não invasivo, não destrutivo, reproduzível, de baixo custo, portátil e principalmente as análises podem ser realizadas *in situ*.

6. Conclusão

Com a preocupação com o controle higiênico- sanitário das indústrias de alimentos e ambientes hospitalares vários métodos inovadores estão sendo desenvolvidos para a detecção de biofilmes em diversas superfícies. Os métodos chamados de convencionais estão perdendo espaço para os novos métodos, pois esses são mais rápidos, não destrutivos e não invasivos, e dentre os métodos já elucidados na literatura e que são utilizados rotineiramente surgiu a termografia ativa no infravermelho para ser um novo método portátil de análise *in situ*.

7. Referências

- ABBAN, S.; JAKOBSEN, M.; JESPERSEN, L. Assessment of interplay between UV wavelengths, material surfaces and food residues in open surface hygiene validation. **Journal Food Science Technology**. v.51, nº. 12, p. 3977-3983, 2014.
- ACHINAS, S., et al. A Technological Understanding of Biofilm Detection Techniques: A Review. **Materials**, v. 13, p. 3147, 2020.
- AKENS, M., et al. The impact of thermal cycling on *Staphylococcus aureus* biofilm growth on stainless steel and titanium orthopedic plates. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.19, p. 260, 2018.
- AKIYAMA, H., et al. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in mouse skin: does *S. aureus* generally produce a biofilm on damaged skin? **British Journal of Dermatology**, 2002. **147**(5): p. 879-85.
- AMODIO, E.; DINO, C. Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: A review of the published literature (1990—2012). **Journal of Infection and Public Health**, v. 7, p. 92-98, 2014.
- ANCUTA, P., et al. Bacterial monitoring of drinking water sources using immunofluorescence technique, image processing software and web-based data

visualization. **Control Engineering and Applied Informatics**. v. 21, p. 54–63, 2019.

ANDRADE, NÉLIO JOSÉ de. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. Ed. Varela, São Paulo, p.412, 2008.

AYCICEK, H., OGUZ, U., KARCI, K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.3, n. 209, p. 203–206, 2006.

AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, p. 313-351, 2017.

BAUTISTA D.A. et al. A sampling regime based on an ATP bioluminescence assay to assess the quality of poultry carcasses at critical control points during processing. **Food Research International**, v. 30, nº. 10, p. 803-809, 1997.

BIRARDA, G., et al. Multi-technique microscopy investigation on bacterial biofilm matrices: A study on *Klesbsiella pneumoniae* clinical strains. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 411, p. 7315–7325.2019.

BOGUSLAVSKY, Y., et al. Eliminating the need for biocidal agents in anti-biofouling polymers by applying grafted nanosilica instead. **ACS Omega**, v. 3, p.12437–12445, 2018.

BORDI, C.; S. de BENTZMANN, *Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge*. **Annals of Intensive Care**, v. 1, p. 19, 2011.

BOTT, T.R. Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. **Applied Thermal Engineering**, v.18, n.11, p. 1059-1066, 1998.

BOU, R., et al., *Nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa infections related to a flexible bronchoscope*. **Journal of Hospital Infection**, 2006. **64**(2): p. 129-135.

CHAE MS; SCHRAFT H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**. v. 18, p. 103-112, 2001.

CHATTERJEE, S., et al. Atomic force microscopy in biofilm study. **Microscopy**. v. 63, p. 269-278, 2014.

CHEN, D., et al. Characteristics and influencing factors of amyloid fibers in *S. mutans* biofilm. **AMB Express**, v. 9, p. 3, 2019.

CHEN, M.; Z. ZHANG; T. BOTT. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. **Biotechnology Techniques**, v.12, nº. 12, p. 875-880, 1998.

CISCHOSKI, A. J., *et al.*, Ultrasound-assisted post-packaging pasteurization of sausages. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.30, p.132–137, 2015.

CLAYBORN, J., *et al.* Assessment of *Salmonella* spp. Attachment to Reusable Plastic Containers Based on Scanning Electron Microscopy and BAX® PCR. **Journal of Food Research**, v. 4, p. 166, 2015.

CORTIZO, M.; M. FERNÁNDEZ, L. M. Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 805-810, 2003.

COSTA, P.D., *et al.* ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 345-349, 2006.

COSTERTON, J.W., Introduction to biofilm. **International journal of antimicrobial agents**, v.11, nº.3, p. 217-221, 1999.

CRUZEIRO, P.C.F., P.A.M. CAMARGOS, and M.E. MIRANDA, *Central venous catheter placement in children: a prospective study of complications in a Brazilian public hospital*. **Pediatric Surgery International**, 2006. **22**(6): p. 536-540.

CUCCURULLO, G. *et al.* Infrared thermography assisted control for apples microwave drying. **Journal of Food Engineering**, v.112, p.319–325, 2012.

DALTON, H.M.; P.E. MARCH. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, nº 3, p. 252-255, 1998.

DE CARVALHO, C.; DA FONSECA, M. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. **Biotechniques**, v. 42, p. 616–620. 2007.

DE OLIVEIRA, D. *et al.* Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, p. 478-483, 2014.

DENKHAUS, E., *et al.*, Chemical and physical methods for characterization of biofilms. **Microchimica Acta**, v. 158 nº 1-2, p. 1-27, 2007.

DOLL, K., *et al.* Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.130, p. 61-68, 2016.

DONLAN, R., *Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? In Bacterial biofilms*. p. 133-161, 2008.

DONLAN, R.M., *Biofilms and device-associated infections*. **Emerging infectious diseases**, v. 7(2): p. 277, 2001.

DOUCET, F.J.; LEAD, J.R.; MAGUIRE, L.; ACHTERBERG, E.P.; MILLWARD, G.E. Visualization of natural aquatic colloids and particles- A comparison of

conventional high vacuum and environmental scanning electron microscopy. **J. Environ. Monit.** v. 7, p. 115–121, 2005.

DOUGLAS, L.J., *Candida biofilms and their role in infection*. **Trends in Microbiology**, 2003. **11**(1): p. 30-36.

EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology**

FERNÁNDEZ, L. et al. Preliminary Assessment of Visible, Near-Infrared, and Short-Wavelength–Infrared Spectroscopy with a Portable Instrument for the Detection of 108 *Staphylococcus aureus* Biofilms on Surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 82, n^o. 8, p. 1314–1319, 2019.

FITO, P.J. et al. Control of citrus surface drying by image analysis of infrared thermography. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p.287–290, 2004.

FLEMMING, H. C.; J. WINGENDER. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n^o 9, p. 623-633, 2010.

Foodborne Disease. Part 6. Transmission and Survival of Pathogens in the Food Processing and Preparation Environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 202–219, 2009.

FOXMAN, B., *Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs*. **The American Journal of Medicine**, 2002. **113**(1): p. 5-13.

FRANCOLINI, I.; G. DONELLI. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **Fems Immunology and medical microbiology**, v. 59, n^o 3, p. 227-38, 2010.

FRÁNKOVÁ, M., *et al.* The low temperature method for environmental scanning electron microscopy - A new method for observation of diatom assemblages in vivo. **Diatom Res.** v. 33, p. 397–403, 2018.

GABRIELSON, J., *et al.* Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal Microbiological Methods**, v. 50, p. 63–73, 2002.

GHEORGHE, C.; DEAC, T.; FILIP, N. Image processing techniques used in soil moisture analysis. **INMATEH - Agricultural Engineering**, v. 58, 147–154, 2019.

GOLDBERG, J. Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. **Trends in Microbiology**, v. 10, n^o 6, p. 264, 2002.

GOWEN, A. A. *et al.* Applications of thermal imaging in food quality and safety assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n^o 4, p. 190-200, 2010.

GRIFFITHS M. V. Applications of Bioluminescence in the Dairy Industry. **Journal of Dairy Science**, v.76, nº. 10, p. 3118-3125, 1993.

GRISKIN, V.; IAKUSKIN, O.; STEPENKO, N. Biofouling detection based on image processing technique. In **Computer Science and Information Techniques (CSIT)**, pp. 158–161, 2017.

HAHN, F., *et al.* Escherichia coli detection using thermal images. **Le Génie Des Biosystèmes Au Canada**, v.48, p. 7–13, 2006.

HALABI, M., *et al.* Non-touch fittings in hospitals: a possible source of Pseudomonas aeruginosa and Legionella spp. **Journal of Hospital Infection**, v.49, nº 2, p. 117-121, 2001.

HALL-STOODLEY, L.; J.W. COSTERTON; P. STOODLEY. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, nº 2, p. 95-108, 2004.

HANNIG, C.; FOLLO, M.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, p. 1–7, 2010.

HUANG, H., *et al.* Microbial respiratory activity with phospholipid fatty acid of biofilm from full-scale bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 599–605, 2019.

IBARRA, J. G. *et al.* Combined IR imaging-neural network method for the estimation of internal temperature in cooked chicken meat. **Optical Engineering**, v.39, n.11, p.3032-3038, 2000.

JEONG, S.; KIM, J.; KIM, H.; CHUNG, K.; YOON, H. Identification of preponderant marine bacteria and their biofouling characteristics on adsorbents of different sizes and shapes in seawater. **Journal of Marine Science and Technology**. v. 26, p. 458–464, 2018.

KARUNAKARAN, E., *et al.* “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, nº 6, p. 1869-1881, 2011.

KHOURY, A.E., *et al.* Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. **Asaio journal**, v.38, nº 3, p. 174-178, 1992.

KINNER, N.E.; D.L. BALKWILL; P.L. BISHOP. Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v.45, nº 5, p. 1659-1669, 1983.

KOCH, B., *et al.* Carbon limitation induces ζ S-dependent gene expression in pseudomonas fluorescens in soil. **Applied and environmental microbiology**, 2001. v. 67, nº 8, p. 3363-3370, 2001.

KOKARE, C., *et al.*, *Biofilm: Importance and applications*. **Indian Journal of Biotechnology**. Vol 8, pp 159-168, 2009.

KOO O.K *et al.* Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surfaces. **Food Control**, v.30, p. 292-297, 2013.

KRAUSKO, J.; RUNSTUK, J.; NEDELA, V.; KLÁN, P.; HEGER, D. Observation of a brine layer on an ice surface with an environmental scanning electron microscope at high temperatures and pressures. **Langmuir**. v. 30, p. 5441–5447, 2014.

KUMAR, C.G.; S.K. ANAND. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, nº 1, p. 9-27, 1998.

LAZAROVA, V.; J. MANEM. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. **Water research**, v. 29, nº 10, p. 2227-2245, 1995.

LEON, M. B.; ALBRECHT, J. A. Comparison of adenosine triphosphate bioluminescence and aerobic plate counts on plastic cutting boards. **Journal of Foodservice**, v.18, p.145-152, 2007.

LISTER, P.D., D.J. WOLTER, and N.D. HANSON, *Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22(4), p. 582-610, 2009.

MANICKAVASAGAN, A., *et al.* Thermal imaging to detect infestation by *Cryptolestes ferrugineus* inside wheat kernels. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 186–192, 2008.

MARCOS-ZAMBRANO, L., *et al.* Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut- off- points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 1192–1198, 2014.

MAROTTA, M., *et al.* Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. **Process Biochemistry**, v. 38, nº 1, p. 101-108, 2002.

MERINO, L., *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v. 119, p. 530-540, 2019.

MOREIRA, J. M. R. Effect of surface conditioning with cellular extracts on *Escherichia coli* adhesion and initial biofilm formation. **Food and Bioproducts processing**, v. 104, p. 1-12 2017.

MURGA, R.; P.S. STEWART; D. DALY. Quantitative analysis of biofilm thickness variability. **Biotechnology and bioengineering**, v.45, nº 6, p. 503-510, 1995.

NEU, T.; LAWRENCE, J. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. **In Productive Biofilms**, p.1–51, 2014.

NGUYEN, T.; RODDICK, F.; FAN, L. Biofouling of water treatment membranes: A review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures. **Membranes**. v. 2, p. 804–840, 2012.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em

NORTON, T., *et al.* Using confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy and phase contrast light microscopy to examine marine biofilms. **Aquatic Microbial Ecology**. v. 16, 199–204, 1998.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, nº 5, p. 257-269, 2010.

NYDER, P.O. Foodservice HACCP. **Foodservice Research International**. v. 13, p. 227-267, 2003.

OJIMA, Y.; NUNOGAMI, S.; TAYA, M. Antibiofilm effect of warfarin on biofilm formation of *Escherichia coli* promoted by antimicrobial treatment. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.7, p. 102–105, 2016.

OKAMOTO K., *et al.* Flocked nylon swabs versus RODAC plates for detection of multidrug-resistant organisms on environmental surfaces in intensive care units. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, p.105-108, 2018.

ORTEGA, M. P. *et al.* Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p. 573-578, 2010.

OTTO, M., *Staphylococcus epidermidis*-The 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 2009. 7(8): p. 555-67.

OZKAN, A., *et al.* Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. **Micron**, v. 89, p. 60-76, 2016.

PALMER JR, R.; STERNBER, C. Modern microscopy in biofilm research: Confocal microscopy and other approaches. **Current Opinion in Biotechnology**. 1999, 10, 263–268.

PANDE, V., MCWHORTER, A., & CHOUSALKAR, K. *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. **Biofouling**, v. 32, p. 699-710, 2016.

PANTANELLA, F., *et al.* Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità**, v. 25, nº 1, p. 31-42, 2013.

PARIZZI, S. Q. F., *et al.* Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by

PARKER, C. C., *et al.* Geospatial Mapping of Early Cases in Multistate Foodborne Disease Outbreaks: A Strategy To Expedite Identification of

Contaminated Imported Produce, United States, 2006 to 2013. **Journal of food protection**. v. 80, nº. 11, p. 1821–1831, 2017.

PEETERS, E.; NELIS, H.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal Microbiological Methods**, v. 72, p. 157–165, 2008.

PENG, J. S., TSAI, W. C. & CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77. Cap. 1-2, p. 11-18, 2002.

PHINNEY D. M. Identification of residual nanoscale foulant material on stainless steel using atomic force microscopy after cleaning in place. **Journal of Food Engineering**, v.214, p. 236-244, 2017.

RAJAMANI, S., *et al.* Robust biofilm assay for quantification and high throughput screening applications. *Journal Microbiological Methods*, v. 159, p. 179–185 2019.

SENNI, L., *et al.* On-line automatic detection of foreign bodies in biscuits by infrared thermography and image processing. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 146–156, 2014.

SHAMA G.; MALIK D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v.216, p. 115–125, 2013.

SHAMS-NATERI, A.; PIRI, N.; MOKTHARI, J. A new approach to evaluate antibacterial activity of textile materials using image processing technique. **Indian Journal Fibre & Textile Research**. 2018, 43, 483–487.

SIHORKAR, V. and S.P. VYAS, *Biofilm Consortia on Biomedical and Biological Surfaces: Delivery and Targeting Strategies*. **Pharmaceutical Research**, v. 18(9), p. 1247-1254, 2001.

SRIVASTAVA, S. AND A. BHARGAVA, *Biofilms and human health*. **Biotechnology letters**, v. 38(1): p. 1-22, 2016.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STOICA, I.M., *et al.* Biofouling on RO-membranes used for water recovery in the dairy industry. **Journal of Water Process Engineering**. v. 24, p.1–10. 2018.

STOLL, M., SCHULTZ, H.R., BERKELMANN-LOEHNERTZ, B. Exploring the sensitivity of thermal imaging for *Plasmopara viticola* pathogen detection in grapevines under different water status. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 281–288., 2008.

superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. **Projeto de Pesquisa**.

SURMAN, S.B. et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. **Journal of Microbiology Methods**, v. 25, p. 57–70, 1996.

Technology. Mar. 2004, v.47, n.1, p.77-83, 2004.

TODD et al. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of

TRAFFANO-SCHIFFO, M. V. et al. Thermodynamic model of meat drying by infrared thermography. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 103–110, 2014.

USAMENTIAGA, R., et al. Infrared Thermography for Temperature Measurement and Non-Destructive Testing. **Sensors**, v. 14, p. 12305–12348, 2014.

VADIVAMBAL, R.; D. S. JAYAS. Applications of thermal imaging in agriculture and food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 186-199, 2011.

VAN DEN DRIESSE, F.; RIGOLE, P.; BRACKMAN, G.; COENYE, T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. **Journal Microbiological Methods**, v. 98, p. 31–34, 2014.

VAN LINDEN, V., et al. Detection technique for tomato bruise damage by thermal imaging. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 599, p. 389-394, 2003.

VARITH, J. et al. Non-contact bruise detection in apples by thermal imaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, p.211-218, 2003.

VERRAN J.; WHITEHEAD K. A. Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. **Food and Bioprocess Technology**. v. 84, p. 260-264, 2006.

VILAR, M.J., RODRÍGUEZ-OTERO, J.L., DIÉGUEZ, F.J., SANJUÁN, M.L., YUS, E. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. **International Journal of Food Microbiology** v.125, p. 357–361, 2008.

VOSS *et al.* Rapid, Noninvasive, and Nondestructive Method for Biofilm Imaging on Metallic Surfaces Using Active Thermography. **Analytical Chemistry**. V. 92, 8, p. 5682–5687, 2020.

WANG, J., *et al.* In situ monitoring of wastewater biofilm formation process via ultrasonic time domain reflectometry (UTDR). **Chemical Engineering Journal**. v. 334, p. 2134–2141, 2018.

WHITEHEAD K. A. *et al.* The use of physicochemical methods to detect organic food soils on stainless steel surface. **Biofouling**. v. 25, n^o. 8, p. 749–756. 2009.

WHITEHEAD K. A.; BENSON P.S.; VERRAN J. Developing application and detection methods for *Listeria monocytogenes* and fish extract on open surfaces in order to optimize cleaning protocols. **Food and Bioprocess Technology**. v. 93, p. 224-233, 2015.

WHITEHEAD K. A.; BENSON P.S.; VERRAN J. The detection of food soils on stainless steel using energy dispersive X-ray and Fourier transform infrared spectroscopy. **Biofiling**. v. 27, nº. 8, p. 907-917. 2011.

WHITEHEAD K. A.; SMITH L. A.; VERRAN J. The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence. **International Journal of Food Microbiology**. v. 127, p. 121–128, 2008.

WIRTANEN G.; MATILLA-SANDHOLM T. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surfaces. **Journal Food Protection**. v. 56, nº 8, p. 678-683, 1993.

WOLF, G., J.G. CRESPO; M.A. REIS. Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.1, n.3, p. 227-251 2002.

WU, Y., *et al.* Does history matter? Temperature effects on soil microbial biomass and community structure based on the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. **Journal Soils Sediments**, v. 10, p.223–230, 2010.

ZHANG, T.; H.H. FANG. Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. **Biotechnology Letters**, v. 23, n.5, p. 405-409 2001.

ZHIQIANG, S.; KEWU, H.; ZHANLING, D.; MENG DAN, Z.; YONGQIANG, Y.; JINMING, H. Visible-light-triggered self-reporting release of Nitric Oxide (NO) for bacterial biofilm dispersal. **Macromolecules**, 2019, 52, 7668–7677.

Autores

Mônica Voss¹, Sandra Kunde Schlesner², Salah Chaji¹

1. Department of Drug Science and Technology, Università Degli Studi di Torino, Via Pietro Giuria n 9, 10125, Turim, Itália.
2. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima n 1000, 97105-340, Santa Maria, Brasil.

* Autor para correspondência: monicavoss-tca@hotmail.com