

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**INFLUÊNCIA DE DETERGENTES E HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE
BIOFILMES DE *Yarrowia lipolytica* EM UTENSÍLIOS UTILIZADOS NA
PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE QUEIJO COLONIAL**

LILIANE ALVES DOS SANTOS WANDERLEY

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria

Colaboradora: Rose Maria de Oliveira Mendes

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**INFLUÊNCIA DE DETERGENTES E HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE
BIOFILMES DE *Yarrowia lipolytica* EM UTENSÍLIOS UTILIZADOS NA
PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE QUEIJO COLONIAL**

LILIANE ALVES DOS SANTOS WANDERLEY

Nutricionista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola
e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do grau de

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Julho de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Wanderley, Liliâne Alves dos Santos
Influência de detergentes e hipoclorito de sódio
sobre biofilmes de *Yarrowia lipolytica* em utensílios
utilizados na produção industrial de queijo colonial
/ Liliâne Alves dos Santos Wanderley. -- 2015.
82 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Queijo colonial. 2. *Yarrowia lipolytica*. 3.
Formação de biofilmes. 4. Higienização. I. Fuentefria,
Alexandre Meneghello , orient. II. Título.

***“O pensar é para o homem,
o que é voar para os pássaros.”
(Albert Einstein)***

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à memória do meu
inesquecível Pai Gerardo Magela Parente dos Santos
pelos ensinamentos e princípios.

AGRADECIMENTOS

Sonhos se realizam, e para a realização desse sonho pude contar com pessoas já especiais na minha vida e outras que conheci ao longo desses dois anos.

Ao meu esposo Sergio Tscha Wanderley, pelo incentivo, apoio e o amor incondicional em todos os momentos da minha vida;

Ao Professor Alexandre M. Fuentesfria, pela amizade, confiança, oportunidade e por acreditar sempre no meu trabalho desde como profissional, e agora como orientanda.

À Professora Rose Maria de O. Mendes, pela amizade, apoio e contribuição em todos os momentos ao longo da realização desse projeto.

À minha mãe Marilene Maria Alves dos Santos pelo apoio mesmo do outro lado do Brasil, sempre me escutando e me aconselhando nos momentos difíceis.

À Joana Focchezatto e Kassiano Matteussi, pela amizade de longa data, por me acolherem em Porto Alegre e pelos conselhos que foram fundamentais na realização desse sonho.

Às pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer, Gabriela da Rosa M. Machado, Vanessa Bergamo, Daiane Dalla Lana, Priscila Dallé da Rosa e Bruna Pippi, o meu muito obrigado, pelo acolhimento, conselhos, pelas orientações e pelo laço de amizade que foi construído no período desse mestrado.

À Professora Patricia Valente por ceder os isolados de *Yarrowia lipolytica* tornando possível a execução desse projeto.

Aos meus amigos verdadeiros que estão sempre presentes e torcendo pelas minhas realizações.

Por fim, agradeço à banca composta pelos professores Dr. Eduardo Tondo, Dra. Patricia Valente e Dra. Maria Assunta Busato por aceitarem o convite e contribuírem para o enriquecimento deste estudo.

INFLUÊNCIA DE DETERGENTES E HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE BIOFILMES DE *Yarrowia lipolytica* EM UTENSÍLIOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE QUEIJO COLONIAL.¹

Autora: Liliane Alves dos Santos Wanderley
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentesfria

RESUMO

Utensílios constituídos de material poroso são geralmente empregados na produção do queijo, sendo comum a formação de biofilmes microbianos. Com o intuito de evitar essa adesão microbiana, diferentes categorias de produtos químicos são comumente empregados. Entretanto, poucos estudos avaliam a eficácia de sua ação antibiofilme. A *Yarrowia lipolytica* é uma levedura constantemente relacionada com alimentos com elevadas proporções de gordura e proteína e já foi detectada em diferentes tipos de queijo, tanto na sua superfície como no seu interior, contribuindo para o processo de maturação do produto ou alterando as propriedades organolépticas. Todavia, há poucos estudos quanto à formação de seu biofilme no processo de produção do queijo, assim como quanto ao seu impacto na qualidade final do produto. Diante disto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a capacidade de formação e remoção do biofilme dos isolados de *Y. lipolytica* por meio do uso de detergentes e hipoclorito de sódio aplicados em diferentes utensílios e materiais utilizados no processo de fabricação de queijos do tipo colonial. Em todos os corpos de prova houve formação de biofilme pelos isolados de *Y. lipolytica* testados, com a contagem de células aderentes variando entre 3,95-6,20 log UFC/cm². Os utensílios e materiais foram submetidos a um processo de higienização, usando as soluções de detergente neutro (3%), detergente alcalino (6%, 8%) e hipoclorito de sódio (1% e 1,5%) no qual o corpo de prova “mangueira” (PVC espiral) foi o material que apresentou uma melhor redução dos isolados de *Y. lipolytica* com os detergentes e hipoclorito de sódio. No entanto, no corpo de prova “forma” (polipropileno) ocorreu uma menor redução de biofilme se comparamos aos demais corpos de prova. Destacando uma menor eficiência quando utilizado o detergente alcalino (6%) e (8%) nos isolados QU13, QU77 e QU22. Na curva de morte, observou-se que não houve inibição do crescimento em nenhum dos tempos testados para o detergente neutro a 3%. Houve significância nos resultados ($p < 0,05$) ao relacionar todos os ângulos de contato dos isolados estudados. Os índices de emulsificação (E24) variaram entre 49,7 - 88,3% nos isolados de *Y. lipolytica* demonstrando uma larga produção de bioemulsificante em todos os isolados testados. Os resultados obtidos neste trabalho pode alterar a qualidade do queijo colonial, afetando negativamente o sabor, textura, escurecimento da superfície e contribuir para formação de aminas biogênicas que atuam na decomposição do produto final.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (82p.) julho, 2015.

INFLUENCE OF DETERGENTS AND SODIUM HYPOCHLORITE ON BIOFILMS OF *Yarrowia lipolytica* IN UTENSILS USED IN INDUSTRIAL PRODUCTION OF COLONIAL CHEESE.²

Author: Liliane Alves dos Santos Wanderley
Supervisor: Alexandre Meneghello Fuentefria

ABSTRACT

Microbial biofilm formation on utensils made with porous material normally employed in cheese production is common. In order to avoid this microbial adhesion, different categories of chemical products are commonly employed. However, few studies evaluate the effectiveness of its antibiofilm activity. *Yarrowia lipolytica* is a yeast constantly related to food with high proportions of fat and protein and has been detected in different types of cheese, both on the surface and inside, contributing to the process of product maturation or changing its organoleptic properties. Nevertheless, there are few studies regarding its biofilm formation in cheese production process, as well as regarding its impact on final product quality. Faced with that, the general goal of this study was to evaluate the biofilm formation and removal capacity of isolates of *Y. lipolytica* using detergents and sodium hypochlorite applied in different utensils and materials used in the process of colonial cheese production. In all specimens there was biofilm formation by the tested isolates of *Y. lipolytica*, with adherent cell count ranging between 3.95 to 6.20 log UFC/cm². The utensils and materials were submitted to a sanitization process, using mild detergent (3%), alkaline detergent (6%, 8%) and sodium hypochlorite (1% and 1.5%) solutions, in which the specimen "hose" (PVC spiral) presented the best decrease of *Y. lipolytica* isolates with the detergents and sodium hypochlorite. However, on the specimen "mold" (Polypropylene) there was lower reduction of biofilm comparing to other specimens. Reduced efficiency when using the alkaline detergent (6%) and (8%) on QU13, QU77 and QU22 isolates can be highlighted. In the Time Kill Assay, no growth inhibition within none of the tested times was detected for the mild detergent (3%). There was significance level in the results ($p < 0.05$) when relating all contact angles of the studied isolates. The emulsification indexes (E24) in the *Y. lipolytica* isolates ranged between 49.7% and 88.3% demonstrating a large production of bioemulsificant in all tested isolates. The results found in this work may lead to changes in the quality of the colonial cheese, affecting negatively the taste, texture, darkening the surface and contribute to biogenic amine formation that act on end product decomposition.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (82p.) July, 2015.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Objetivo geral.....	03
1.2 Objetivos específicos.....	03
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1. Queijo Colonial.....	05
2.2 Utensílios e materiais utilizados na produção do queijo.....	08
2.3 Boas Práticas de Fabricação.....	11
2.4 Higienização e agentes detergentes e sanitizantes.....	12
2.5 Superfícies e biofilmes microbianos.....	14
2.6 Leveduras no queijo.....	19
2.7 <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
3 METODOLOGIA	26
3.1 Determinação dos utensílios e agentes higienizadores utilizados na produção de queijo.....	26
3.2 Locais da Realização da Pesquisa.....	28
3.3 Seleção dos isolados.....	29
3.4 Triagem dos isolados na formação do biofilme.....	29
3.5 Estoque e manutenção.....	31
3.6 Preparo dos corpos de prova.....	31
3.7 Ensaio da formação do biofilme nos corpos de prova.....	32
3.8 Ensaio da atividade antibiofilme com detergentes e hipoclorito de sódio.....	33
3.9 Avaliação da hidrofobicidade (Método da gota séssil).....	33
3.10 Determinação do índice de emulsificação (E24).....	35
3.11 Determinação da curva de morte (<i>Time-kill assay</i>).....	37
3.12 Análises estatísticas.....	38

4 RESULTADOS	38
4.1 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo Método Cristal Violeta em Microplacas	38
4.2 Formação do biofilme nos corpos de prova.....	40
4.3 Atividade antibiofilme com detergentes e hipocloritode sódio	41
4.4 Hidrofobicidade (Método da gota séssil)	45
4.5 Índice de emulsificação (E24)	46
4.6 Curva de morte (<i>Time-kill assay</i>).....	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS	58
8. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Principais materiais utilizados nas indústrias de alimentos e suas características.....	09
TABELA 2: Principais agentes sanificantes.	13
TABELA 3: Informações dos procedimentos de higienização dos materiais e utensílios na produção do queijo colonial em produtores de Chapecó e Região/SC.....	28
TABELA 4: Quantificação da absorbância para formação do biofilme de <i>Y. lipolytica</i>	30
TABELA 5: Formação do biofilme pelo método do cristal violeta de cepas <i>Y. lipolytica</i> proveniente de queijo colonial	38
TABELA 6: Contagens de células dos isolados de <i>Y. lipolytica</i> que aderiram aos corpos de prova durante o processo de formação de biofilme (média dos valores em \log_{10} UFC cm^{-2}) \pm desvio padrão	40
TABELA 7: Medidas dos ângulos em graus das gotas sésseis sobre os corpos de prova forma, mangueira, becker e embalagem utilizando-se água destilada e isolados de <i>Y. lipolytica</i> QU16, QU50, QU69, QU13, QU77, QU22 (média dos valores ($^{\circ}$) \pm desvio padrão)	45
TABELA 8. Valores do índice de emulsificação em percentual dos isolados de <i>Y. lipolytica</i> QU16, QU50, QU69, QU13, QU77, QU22 (média dos valores E24 (%) \pm desvio padrão DP)	47

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fluxograma produção queijo colonial 06
- FIGURA 2.** Etapas da formação do biofilme: após a fixação inicial, o desenvolvimento tridimensional começa com a construção de micro colônias - o passo seguinte, a maturação de biofilme, é dependente da produção de matriz o que assegura a coesão e a estrutura tridimensional de biofilmes maduros. 15
- FIGURA 3.** Sequência de eventos na formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos: as moléculas orgânicas de alimento são depositadas na superfície do material e formam uma película condicionada - os microrganismos biologicamente ativos são atraídos por moléculas orgânicas - as células microbianas persistentes permanecem após a limpeza e desinfecção e iniciam o crescimento - as formas de biofilmes com a expressão de genes celulares e *quorum sensing* 18
- FIGURA 4.** Microscopia eletrônica da *Yarrowia lipolytica* (A) blastosporos, (H) hifas 21
- FIGURA 5.** Materiais e Utensílios utilizados na produção do queijo colonial (a) mangueira (PVC espiral), (b) Becker (polipropileno), (c) forma do queijo (polipropileno), (d) embalagem (nylon/polietileno) 26
- FIGURA 6.** Materiais e Utensílios ilustrados no fluxo da produção do queijo (a) mangueira (transferência do leite); (b) Becker (transferência do coalho); (c) forma; (d) embalagem 27
- FIGURA 7.** Materiais e Utensílios cortados no tamanho 1x1cm (a) mangueira (PVC espiral); (b) forma (polipropileno) em exposição à radiação ultravioleta..31
- FIGURA 8.** Forma de uma pequena gota de uma superfície uniforme ideal, com uma superfície repelente de água média. 35
- FIGURA 9.** Redução dos isolados QU16, QU50, QU69, QU13, QU77 e QU22 de *Y. lipolytica* em % e log 10 UFC/cm² no corpo de prova “becker” (polipropileno) após a higienização com (DN3%) detergente neutro 3% - 05 minutos. 41
- FIGURA 10.** Redução dos isolados QU16, QU50, QU69, QU13, QU77 e QU22 de *Y. lipolytica* em % e log 10 UFC/cm² no corpo de prova “forma” (polipropileno) após a higienização com (DN3%) detergente neutro 3% - 05 minutos, (DA6%) e (DA8%) detergente alcalino 6% e 8% - 10 minutos, (HS1%) hipoclorito de sódio 1% - 10 e 20 minutos e (HS1,5%) hipoclorito de sódio 1,5% - 10 e 20 minutos. 42

FIGURA 11. Redução dos isolados QU16, QU50, QU69, QU13, QU77 e QU22 de <i>Y. lipolytica</i> em percentual (%) e log 10 UFC/cm ² no corpo de prova “mangueira” (PVC espiral) após a higienização com (DN3%) detergente neutro 3% - 05 minutos, (DA6%) e (DA8%) detergente alcalino 6% e 8% - 10 minutos, (HS1%) hipoclorito de sódio 1% - 10 e 20 minutos e (HS1,5%) hipoclorito de sódio 1,5% - 10 e 20 minutos.	43
FIGURA 12. Gota dos isolados de <i>Y. lipolytica</i> em caldo TBS nos materiais e utensílios cortados no tamanho 1x1cm para posterior medida dos ângulos.	46
FIGURA 13. Formação de emulsificação dos isolados de <i>Y. lipolytica</i> após 24 horas.	47
FIGURA 14. isolados de <i>Y. lipolytica</i> com o detergente neutro (3 %): QU16; QU50; QU69; QU77; QU22; QU13 com crescimento das colônias em 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: percentual
μL: microlitro
μm: micrômetro
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APACO: Associação dos Pequenos Agricultores do Oeste Catarinense
APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ASC: Agar Sabouraud com Cloranfenicol
BPF: Boas Práticas de Fabricação
cm: centímetro
DA6%: Detergente Alcalino 6%
DA8%: Detergente Alcalino 8%
DN3%: Detergente Neutro 3%
DNA: ácido desoxirribonucleico
DP: Desvio Padrão
EPS: Substâncias Poliméricas Extracelulares
IC: Intervalo de confiança
HCIO: Hipoclorito de sódio
HS1%: Hipoclorito de Sódio 1%
HS1,5%: Hipoclorito de Sódio 1,4%
IC: Intervalo de Confiança
KHz: quilohertz
Log: Logaritmo
mL: mililitro
MS: Ministério da Saúde
°C: graus Celsius
p: significância
pH: potencial Hidrogeniônico
POP: Procedimentos Operacionais Padrão
ppm: partes por milhão
PVC: Policloreto de Vinila
r: correlação
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RS: Rio Grande do Sul
SC: Santa Catarina
SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde
t: teste "t"
TBS: Caldo Triptose de Soja
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS
UNOCHAPECO: Universidade Comunitária da Região de Chapecó, SC
Θ: Ângulo

1 INTRODUÇÃO

Apontado como um produto popular na Região Sul do país, o queijo colonial é obtido pela coagulação enzimática do leite com coalho e outras enzimas coagulantes apropriadas, completada ou não com a ação de alguns micro-organismos lácteos específicos. Normalmente passa por um processo de maturação que pode levar no mínimo 30 dias, no entanto, não há padronização deste produto.

O principal grupo de micro-organismos geralmente associados com o queijo é composto por bactérias, embora, hoje em dia, é bem reconhecido que as leveduras isoladas de queijo podem ser detectadas em altas contagens. Espécies de leveduras podem aparecer por meio de toda a cadeia produtiva, desde a fazenda até o produto final. Como contaminantes naturais, elas são amplamente distribuídas no ambiente de laticínios e aparecem no leite cru e nos utensílios de leite.

A presença destes micro-organismos em produtos lácteos, como no queijo, é comum, visto que este produto apresenta várias propriedades que estimulam a sua proliferação. Em alguns queijos contribui para deterioração ou fazem uma contribuição positiva no processo de maturação.

A importância das leveduras como organismos deteriorantes está ligada às suas necessidades nutricionais e de crescimento em ambientes com baixa temperatura, valor de pH, atividade de água e alta concentração de sal. Portanto, a função deteriorante é reconhecida como um problema para os queijos, causando defeitos típicos como aumento da acidez, e ainda, alteração no sabor, textura e cor.

Atualmente, a *Yarrowia lipolytica* vem sendo uma das leveduras “não convencionais” mais estudadas por ser um micro-organismo aeróbio e capaz de produzir metabólitos importantes e ter uma forte atividade secretora de várias proteínas, o que justifica sua utilização nas indústrias.

Lanciotti et al. (2005), relatam que estudos específicos demonstram que *Yarrowia lipolytica* tem sido identificada com frequência em queijos. É de conhecimento que essa levedura se apresenta em várias etapas do processo de fabricação do queijo, através do efeito da seleção natural.

Os biofilmes são formados pela agregação de micro-organismos em estruturas multicelulares que aderem às superfícies. As células de leveduras possuem uma notável capacidade de aderir a superfície abiótica, celular e de tecidos. Estas propriedades de adesão são relevantes tanto para área médica como industrial. Este aspecto da adesão de fungos exemplifica a impressionante plasticidade fenotípica de leveduras, permitindo a adaptação rápida em ambientes estressantes.

Na cadeia de produção de alimentos há correlação positiva entre falhas nos procedimentos de higiene e formação de biofilmes microbianos. Desta forma, é de extrema importância a higienização dos equipamentos de processamento levando em consideração tanto a composição orgânica e inorgânica das incrustações como também a microbiota constitutiva da superfície. As boas práticas de fabricação e o cumprimento de procedimentos padronizados geram melhorias na limpeza e sanitização, ajudando a reduzir a persistência das bactérias.

Na indústria de alimentos, apesar da operação cuidadosa de higienização dos equipamentos e utensílios, a diversidade das comunidades de biofilme pode afetar a eficácia dos higienizadores químicos. Portanto, a seleção de soluções de detergentes e sanitizantes muito da eficácia na remoção do biofilme de uma grande variedade de micro-organismos.

Existem relativamente poucos estudos sobre a importância deste micro-organismo para a formação do biofilme. Alguns estudos têm relatado que cepas de *Yarrowia lipolytica* desenvolvem-se sobre a superfície do queijo ou a partir de ambientes do queijo (salmoura, prateleira de maturação e manipuladores), alterando as características organolépticas e promovendo crescimento de outros tipos de fungos em algumas variedades de queijos.

1.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de formação e remoção do biofilme da levedura *Yarrowia lipolytica* por meio do uso de detergentes e hipoclorito de sódio aplicados em diferentes materiais utilizados no processo industrial de fabricação de queijos do tipo colonial.

1.2 Objetivos específicos

a) selecionar os isolados de *Yarrowia lipolytica* do queijo formadores de biofilme pela técnica do cristal violeta em microplaca para posteriores ensaios de remoção e atividade antibiofilme com detergentes e hipoclorito de sódio;

b) realizar ensaios de produção de biofilme com isolados de *Yarrowia lipolytica* de queijos em corpos de prova representativos dos materiais a base de polipropileno, PVC e polietileno dos utensílios utilizados na produção de queijos;

c) avaliar a capacidade de remoção e inibição da formação do biofilme de *Yarrowia lipolytica* pelas soluções dos detergentes e sanitizante (detergentes neutro, alcalino e soluções de hipoclorito de sódio) utilizados na indústria de laticínios nos processos de higienização;

d) determinar a hidrofobicidade através da medida do ângulo de contato pelo método da gota séssil na superfície dos materiais à fim de determinar a influência do molhamento de uma superfície sobre adesão e crescimento celular microbiano;

e) avaliar o índice de emulsificação formado por *Yarrowia lipolytica* isoladas do queijo colonial com a finalidade de verificar a produção de biossurfactante;

f) ensaiar a curva de morte das células de biofilme após exposição aos detergentes e sanitizante para verificar a eficácia dos mesmos em função do tempo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Queijo Colonial

Compreende-se por produto colonial aquele com algum grau de processamento realizado no interior das propriedades rurais, geralmente pelo agricultor, através de um processo artesanal de produção (Fava et al., 2012). Estes produtos são de grande aceitação pela comunidade local, devido a seu caráter diferenciado do produto industrial e pela influência cultural fortemente inserida nas famílias vindas desde o período de colonização.

O queijo colonial, um dos produtos lácteos artesanais mais produzidos e consumidos no Brasil, tem sua maior produção nos estados do Sul do país. Este produto não possui nenhuma legislação específica nos âmbitos estadual e/ou federal e é uma importante fonte de renda para pequenos produtores rurais (Oliveira et al., 2010; Fava et al., 2012).

Este tipo de queijo é consumido em diversas regiões, apresenta sabor levemente picante e possui período de maturação de até 30 dias e validade de 120 dias. Com característica crua e formato cilíndrico, é originado a partir da coagulação enzimática ou por coalho, com sua massa consistente e de cor clara, envolta de uma casca fina e amarelada (Gracioli, 2013).

O queijo colonial segue o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, constante na Instrução Normativa nº 30 de 26/06/01 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a qual regulamenta queijos obtidos por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementados ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializados normalmente com até 10 (dez) dias de

fabricação.

O concentrado sólido do queijo contém coalho para obtenção da coagulação do queijo, fermentos bacterianos, acidificantes da coalhada, sal e cloreto de sódio. A composição nutricional pode variar de acordo com o tipo e a matéria-prima. O queijo colonial não possui um padrão estabelecido de composição, porém os valores médios encontrados para este produto são de: umidade 44% (20 – 60%), cloreto de sódio 1,7% (0,5 – 3,5%), gordura 22% (10 – 30%) e proteína 29% (20 – 35%) (Felipetto et al., 2014).

2.1.1. Etapas da produção do queijo colonial

A produção deste produto ocorre com as etapas do tratamento térmico do leite padronizado, homogeneização, adição do coalho, coagulação, corte do queijo, agitação, modelagem, prensagem, salga, cura e a maturação (Fracasso & Pfüller, 2014). A seguir, a figura 1 ilustra as principais etapas do processo de fabricação do queijo.

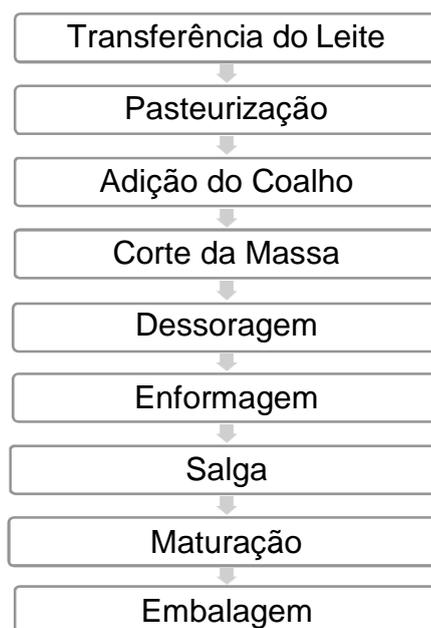


FIGURA 1: Fluxograma produção queijo colonial.

Na etapa de pasteurização ocorre com o aquecimento do leite a 62,8°C por 30 minutos – lenta, ou 71,7°C por 15 segundos – rápida. O tratamento térmico é uma exigência legal para o leite utilizado na produção de queijo, conforme o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (1980), para os casos em que a sua maturação seja menor que 60 dias, pois, nessa etapa ocorre a destruição dos micro-organismos patogênicos presentes no leite cru (Fracasso & Pfüller, 2014).

O coalho é o elemento fundamental na fabricação, que tem como função a precipitação da caseína, formando um coágulo firme. Para o queijo do tipo colonial o tempo médio é de 45 a 50 minutos. A coalhada passa pelo processo de corte para facilitar a transferência do soro (Gracioli et al., 2013; Dores & Ferreira, 2012).

A dessoragem do coágulo causa a diminuição da umidade pela liberação da água, lactose e sais solúveis na forma do soro do queijo. O soro então é gerado pela precipitação ácida da caseína ou pela coagulação enzimática através da enzima, sendo este último utilizado na fabricação do queijo (Bald et al., 2014).

A massa da coalhada é então colocada nas formas com panos e espremida lentamente para dar ao queijo uma superfície mais fina. Em seguida ocorre a prensagem intensa, seja por peso ou por uma ação pneumática, que tem como objetivo a melhora da consistência, da textura e a extração do soro excedente. A coalhada une-se fortemente resultando em uma massa bem firme (Gracioli et al., 2013; Dores & Ferreira, 2012).

Diversos métodos de salga são aplicados nos queijos, sendo que para o queijo colonial o processo utilizado é a salmoura. A salga do queijo é realizada quando este está totalmente livre do soro, sendo fundamental para dar sabor a massa e favorecer a formação da casca. O sal ainda exerce influência preponderante nos fenômenos físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem na etapa de maturação (Fracasso & Pfüller, 2014).

A maturação ocorre modificando as características físicas e químicas do queijo gerando substâncias responsáveis pelo sabor e aroma. Na maturação pode ocorrer ausência da gordura, o que provoca um aumento da umidade da massa ocorrendo o desenvolvimento de micro-organismos proteolíticos e anaeróbios. Estes são responsáveis pela putrefação pela ausência de ácidos graxos liberados durante esse processo (Fracasso & Pfüller, 2014).

O período de maturação para os queijos coloniais geralmente é curto, sendo que a recomendação técnica de produção deste queijo é de realizar este processo, bem como a armazenagem, sob baixas temperaturas (Fava et al., 2012).

2.2 Utensílios e materiais utilizados na produção do queijo

Materiais e utensílios à base de aço inoxidável, polipropileno e pano de algodão são os mais encontrados nas indústrias de laticínios, sendo estes componentes dos tanques de armazenagem, superfícies de manipulação (aço inoxidável), formas, espátulas, superfícies de corte (polipropileno), acessórios

(pano de algodão), constituintes de tubulações e revestimento de recipientes (vidro) e demais finalidades (Kasnowaki et al., 2010).

TABELA 1: Principais materiais utilizados nas indústrias de alimentos e suas características.

Material	Características
Metais	Corroído por detergentes ácidos ou a base de hipoclorito
Vidro	Suave e impermeável; pode ser atacado por detergentes alcalinos fortes
Borracha	Não deve ser porosa ou esponjosa. Não é afetada por detergente alcalino
Aço inoxidável	Resiste à corrosão, oxidação e altas temperaturas. Superfície suave, impermeável e de fácil limpeza
Polipropileno	Elevada resistência química e à solventes. Boa estabilidade térmica e de fácil limpeza
PVC	Atóxico, impermeável, estável e apresenta resistência à maioria dos agentes químicos e aos agentes oxidantes.

Fonte: ANDRADE (2008).

Com base na Portaria SVS/MS nº 326 de Julho de 1997, todos os equipamentos e utensílios que entram em contato com alimentos devem ser confeccionados com material que não transmitam substâncias tóxicas, odores e sabores. Também devem ser não absorventes e resistentes à corrosão. Devem estar isentos de rugosidades, frestas e outras imperfeições, ser de fácil limpeza e de composição à base de aço inoxidável ou plástico, devendo se evitar utensílios de madeira.

2.2.1 Características dos materiais à base de polímeros

As propriedades dos polímeros são diversas e os mesmos encontram-se agrupados em duas categorias: os termoplásticos e os

termoestáveis. Os mais utilizados são os termoplásticos, entre eles o polietileno, o polipropileno, o poli (cloreto de vinila) ou PVC, o acrílico e outros (Pitt et al, 2011).

O polipropileno é um dos materiais mais utilizados nas indústrias de alimentos e tem sido utilizado na fabricação de tanques, tubulações, acessórios e superfícies (Oulahal et al., 2008). Assim como o polipropileno, materiais compostos de polietileno também são muito utilizados por suas excelentes propriedades e por serem capazes de retardar, prevenir mudanças e a deterioração das influências externas em presença de oxigênio, luz e até mesmo micro-organismos (Ducan, 2011). Já o PVC é amplamente utilizado na produção de alimentos por ser um material atóxico, resistente à maioria dos reagentes químicos, apresentar-se como rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco favorecendo uma melhor qualidade quanto aos fatores sanitários (Singla et al., 2014; Barros et al., 2011).

Superfícies de utensílios e materiais que são utilizados na produção de alimentos, como por exemplo os polímeros, sofrem desgastes com o uso frequente, aumentando o acúmulo de sujeira e diminuindo o acesso à higienização (Machado, 2007). Estas superfícies devem ser inertes ao que se refere aos detergentes e sanitizantes sob condições normais de uso e com características que auxiliem na realização do procedimento de higienização (Andrade, 2008).

2.3 Boas Práticas de Fabricação

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) abrangem um conjunto de normas empregadas em produtos, processos, serviços e edificações visando a promoção e a certificação da qualidade e da segurança alimentar. No Brasil, as BPF são legalmente regidas pela Resolução – RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, ato normativo complementar da Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997 baseada do Codex Alimentarius.

Tanto as BPF quanto a APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle são estabelecidas para controlar a qualidade e segurança dos alimentos, principalmente os procedimentos de limpeza, que precisam ser satisfatoriamente empregados na linha de produção de laticínios. Uma vez que resíduos de alimentos permanecem nas superfícies dos equipamentos e utensílios mesmo após a limpeza com agentes químicos (Shi & Zhu, 2009).

Para indústrias que produzem laticínios as boas práticas de fabricação são regulamentadas pelas Portaria nº368, de 4/9/1997 e Resolução nº 10, de 22/5/2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a qual estabelece que toda unidade de produção deve possuir um manual de BPF, devendo este ser um documento personalizado da empresa contendo todas as informações sobre os procedimentos adotados pelas agroindústrias (Nassu et al., 2006).

2.4 Higienização e agentes detergentes e sanitizantes

A seleção dos detergentes e agentes sanitizantes na indústria de

alimentos depende da eficácia, do tipo de produto envolvido na produção e ainda do tipo dos materiais a serem higienizados. A higienização de equipamentos e utensílios durante o processamento dos alimentos é indispensável para assegurar o controle da contaminação cruzada em diferentes etapas da produção (Bayoumi et al., 2012).

Os métodos químicos de limpeza e desinfecção de superfícies geralmente envolvem a aplicação de lavagem mecânica com presença de detergente e sanitizantes, seguido da lavagem com água potável (Gil et al., 2009). Sendo assim, os produtos químicos normalmente utilizados na limpeza são os detergentes neutros ou alcalinos, que são aplicados para desprender ou dissolver resíduos alimentares através da tensão superficial, emulsificação das gorduras e desnaturação das proteínas. A vantagem desse processo é a remoção de até 90% dos micro-organismos, apesar de não ser um procedimento confiável para a sua eliminação (Gram et al., 2007).

O processo de desinfecção tem como objetivo reduzir a população de células viáveis restantes na superfície após a limpeza e evitar o crescimento microbiano nos equipamentos e utensílios. Porém, substâncias orgânicas, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, tempo e concentração do agente químico podem vir a interferir na eficácia da ação no contato com o sanitizante (Moretro et al., 2012).

Segundo o regulamento do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com publicação na RDC nº 14/2007 e 40/2007, detergentes e desinfetantes são chamados saneantes domissanitários, o qual se destinam para limpeza e higienização de ambientes

domésticos e coletivos, públicos ou privados, registrados em razão de sua aplicação ou finalidade como desinfetantes para indústria de alimentos e afins.

Os produtos químicos utilizados em processo de higienização nas indústrias de alimentos são compostos à base de ácido, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, iodo, fenólicos, ozônio e surfactantes (Srey et al., 2013).

A legislação brasileira que regulamenta a utilização dos sanitizantes determina que os princípios ativos dos produtos desinfetantes em uso nas indústrias de alimentos devem ser aqueles que constam na lista do “Code of Federal Regulation” nº 20, parágrafo 178.1010 e as da Diretiva nº 98/8/CE (BRASIL, 2007). A tabela 2 demonstra os principais agentes sanificantes com algumas de suas características.

TABELA 2: Principais agentes sanificantes.

Sanificantes	Concentração de uso	pH	Tempo de contato	Modo de ação sobre micro-organismos
Quaternário de amônio	> 300ppm	9,5 – 10,5	10 – 15min.	Age na membrana citoplasmática alterando a permeabilidade da célula
Compostos inorgânicos de cloro	100 – 400ppm	6,0 – 8,0	10 – 15min.	Inibe a glicólise
Iodoforo	25 – 100ppm (iodo ativo)	4,0 – 5,0	10 – 15min.	Penetra na parede celular destruindo a estrutura proteica
Ácido peracético	75 – 1000ppm	<8,0	10 – 15min.	Oxidação enérgica dos componentes celulares
Peróxido de hidrogênio	0,3 – 6%	2,0 – 6,0	5 – 20min.	Oxidação enérgica a componentes celulares

Fonte: BRASIL (2007); SEBRAE (2000)

O hipoclorito de sódio (HClO) é um dos composto clorado mais utilizados em indústrias de alimentos sendo eficaz no combate da maioria das bactérias, fungos e vírus (Byun et al., 2007). Produzido a partir do ácido hipocloroso, após dissolvido em água apresenta forte efeito oxidante no interior da parede celular microbiana, causando a perda da atividade enzimática ou danos no DNA (Elano et al., 2010).

É importante enfatizar que o processo de desinfecção pode ser ineficiente quando aplicado no controle do biofilme, tendo em vista que se uma população microbiana enfrentar altas concentrações de um produto pode vir a desenvolver um grau de resistência natural ou através de mutação ou troca genética. Esse mecanismo permite que os micro-organismos cresçam e sobrevivam à ação química dos sanitizantes (Simões et al., 2010).

2.5 Superfícies e biofilmes microbianos

Os biofilmes são montagens complexas de micro-organismos sobre uma superfície e interfaces bióticas ou abióticas, caracterizados por interações entre as populações microbianas, conforme mostra a figura 2. Com estruturas tridimensionais e de auto-organização, possuem formas e mecanismos, ecologia, heterogeneidade fisiológicas e genéticas e ainda resistências a desinfetantes (Jahid & Ha, 2012).

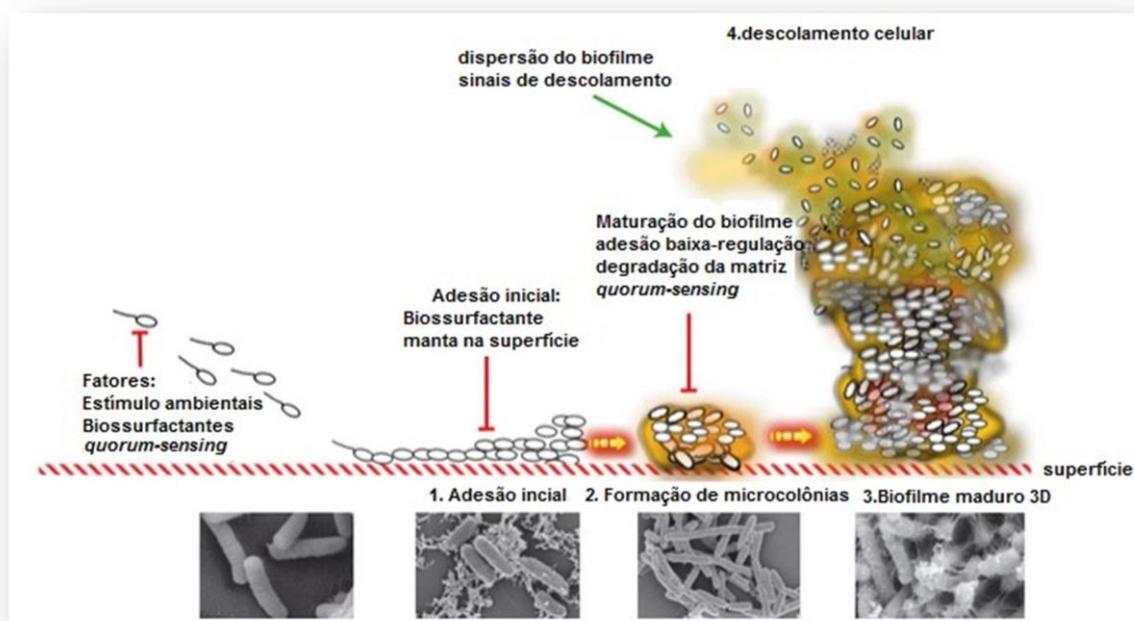


FIGURA 2: Etapas da formação do biofilme: após a fixação inicial, o desenvolvimento tridimensional começa com a construção de micro colônias - o passo seguinte, a maturação de biofilme, é dependente da produção de matriz o que assegura a coesão e a estrutura tridimensional de biofilmes maduros. Fonte: Renduels et al., 2012.

O biofilme microbiano está ligado à matriz, constituída de aglomerados de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que rodeiam comunidades de micro-organismos aderidos a uma superfície. Sendo que o papel dessa matriz é a sobrevivência de biofilmes em condições ambientais adversas, garantindo a coesão da estrutura dos mesmos e adsorção de vários tipos de compostos do ambiente (Azevedo & Cerca, 2012).

A fixação inicial dos micro-organismos pode ser ativa ou passiva e a adesão da célula durante o processo depende fortemente das propriedades físico-químicas da superfície celular. Na etapa reversível, as células inicialmente aderidas sobre a superfície do material possuem apenas uma pequena quantidade de substância polimérica extracelular (EPS) (Srey et al., 2013).

A mudança da etapa reversível para a irreversível ocorre a partir da interação microbiana com a superfície e a ligação permanente na presença de EPS. As microcolônias de acumulação e crescimento microbiano, associadas ao EPS ajudam a reforçar a ligação entre o substrato e os micro-organismos e a estabilizar-se sobre qualquer tensão ambiental (Simões et al., 2010).

A maturação do biofilme é a etapa em que se desenvolve uma estrutura organizada, podendo esta ser plana ou em forma de cogumelo dependendo de onde se localiza a fonte de nutrientes. Por último, ocorre a etapa de dispersão, onde permite que as células se reverta para sua forma planctônicas (Srey et al., 2013).

Os biofilmes formados por diversos micro-organismos podem ser deteriorantes ou patogênicos, dependendo do tipo de produto processado e em diferentes tipos de superfícies utilizados nos equipamentos industriais (Rossi & Porto, 2009).

As propriedades das superfícies desempenham um papel importante na aderência microbiana. No geral, toda superfície é vulnerável ao desenvolvimento do biofilme incluindo plásticos, vidros, metais, madeiras em contato com alimentos durante o processo produtivo em determinadas condições (Srey et al., 2013).

A formação e desenvolvimento do biofilme são afetados por vários fatores tais como as propriedades das superfícies dos materiais e parâmetros ambientais como pH, níveis de nutrientes e temperatura (Sokunrotanak et al., 2013).

As propriedades da superfície são fatores importantes que afetam e

determinam o potencial da formação do biofilme em conjunto com as células microbianas. Desta maneira, a escolha do material de contato direto no processamento de alimentos é de grande importância. Propriedades como rugosidade, capacidade de limpeza, molhamento e a vulnerabilidade influenciam a capacidade da aderência celular (Houdt & Michiels, 2010).

Estudos relatam que quanto maior a rugosidade de uma superfície maior será a adesão microbiana. Isto se explica pelo fato de que a presença de depressões na superfície funcionarem como locais favoráveis para a colonização, facilitando a adesão microbiana, a deposição do biofilme e o acúmulo de material. Por outro lado, outros resultados sugerem que a rugosidade da superfície não tem correlação com a capacidade de adesão (Sokunrotanak, 2013).

No molhamento, o ângulo de contato (θ) de um líquido com o substrato sólido é quantificado. Este ângulo é um parâmetro importante que determina a qualidade do umedecimento de um sólido por um líquido. Deste modo, uma característica importante sobre o molhamento é a existência da histerese do ângulo de contato e sua relação entre a energia, a rugosidade e a heterogeneidade das superfícies (Lima et al., 2011).

Pesquisas afirmam que o balanço da hidrofobicidade/hidrofilicidade tem a ver com a influência do molhamento de uma superfície sobre adesão e crescimento celular. Logo, a adesão microbiana deve ser maior em superfícies hidrofóbicas por estas facilitarem a aproximação estreita entre os microorganismos e os substratos sólidos, o que favorece a eliminação da água entre as interfaces das superfícies (Locatelli, 2004).

2.5.1 Remoções do biofilme

Os micro-organismos aderidos e constituídos em biofilme tem maior potencialidade de resistir aos tratamentos antimicrobianos usados na higienização de superfícies e equipamentos (Azevedo & Cerca, 2012). A formação do biofilme é um processo complexo e podem permanecer mesmo após a limpeza e desinfecção (Shi & Zhu, 2009). A figura 3 demonstra a resistência microbiana mesmo após o processo de higienização.

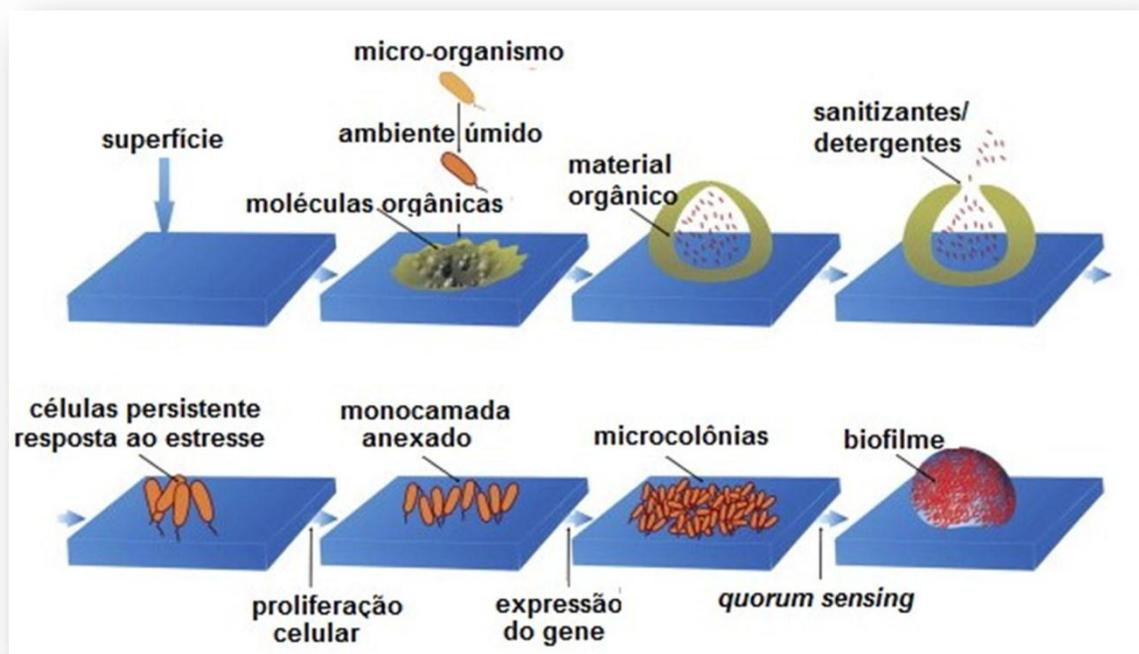


FIGURA 3: Sequência de eventos na formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos: as moléculas orgânicas de alimento são depositadas na superfície do material e formam uma película condicionada - os microrganismos biologicamente ativos são atraídos por moléculas orgânicas - as células microbianas persistentes permanecem após a limpeza e desinfecção e iniciam o crescimento - as formas de biofilmes com a expressão de genes celulares e *quorum sensing*.

Fonte: SHI & ZHU, 2009.

O processo de transporte do sanitizante para a superfície celular, adsorção, difusão, penetração e interação não é instantâneo. O tempo varia de sanitizante para sanitizante. Estas diferenças estão diretamente ligadas ao modo da ação, assim como os componentes químicos e as propriedades físico-químicas destes agentes (Azevedo & Cerca, 2012).

Os agentes químicos nos sanitizantes podem eliminar micro-organismos, mas muitas vezes não exterminam os esporos. Os mais utilizados reduzem micro-organismos por até 5 log na presença de uma carga orgânica. A eficácia depende do intervalo entre a contaminação e a aplicação do sanitizante, o tempo de contato, a temperatura, carga microbiana e a idade dos biofilmes produzidos (Jahid & Ha, 2012).

Assim sendo, torna-se difícil a remoção das células que estão na forma irreversível sem que seja aplicada uma intensa força mecânica ou a interrupção química da forma de aderência pela aplicação das enzimas detergentes surfactantes, desinfetantes ou por calor (Telles, 2011).

2.6 Leveduras no queijo

As leveduras podem ser parte da microbiota de diferentes queijos, em particular, sendo uma de suas principais funções contribuir no processo de maturação através do ácido láctico, que por sua vez aumenta o pH, favorecendo o crescimento bacteriano e iniciando a segunda fase de maturação do queijo. O papel da levedura depende do tipo do queijo e em algumas variedades são responsáveis pela deterioração causando alterações no sabor e nas características textuais (Suzzi et al., 2001).

Uma mistura não controlada destas cepas de leveduras que se desenvolvem durante a maturação pode ou não ser favorável sobre a qualidade do queijo. Isto ocorre devido aos mecanismos durante o crescimento destas leveduras e que estão associados à fermentação da lactose, aos ácidos lácticos e à função proteolítica e lipolítica. Na verdade, todos os componentes no processo da fabricação do queijo (o coalho, bactérias do leite, umidade) e sua interação com as leveduras podem vir a afetar as propriedades físico-químicas associadas à maturação do queijo (Guerzoni, 2001).

As leveduras apresentam um papel importante no processo do queijo, ajudando na regulação do nível de acidez, um pré-requisito para o desenvolvimento de bactérias sensíveis à ácidos na superfície do queijo. Isto provavelmente está relacionado com os aminoácidos e/ou catabolismo lácteos (Mansur et al., 2008).

Devido às características proteolíticas e lipolíticas, algumas espécies fúngicas tem um papel importante na produção do queijo, como precursores de aromas pelos aminoácidos, ácidos graxos e seus ésteres, além do estímulo no crescimento de outros micro-organismos através da excreção dos fatores de crescimento. A dinâmica da liberação dos ácidos graxos nos queijos depende em grande parte da gordura do leite, bem como da seletividade da lipase e atividade microbiana para determinar o sabor de muitos produtos lácteos (Suzzi, 2001).

2.7 *Yarrowia lipolytica*

A *Yarrowia lipolytica* tem micélio formado por uma hifa de 3 a 5 μm de largura e alguns micrômetros de comprimento. Suas células apicais podem exceder 100 μm de comprimento enquanto os segmentos podem ser de 50 a 70 μm . Há apenas um único núcleo por segmento (Flores et al., 2005). Os septos mostram um poro central incomum para outras leveduras, com o retículo endoplasmático estendendo-se de um segmento ao seguinte. A proporção morfológica encontrada na cultura depende da cepa utilizada. Certas condições são conhecidas por causar uma formação preferencial de células de levedura, ou induzir o desenvolvimento de micélios (Szabo & Stofanikova, 2002). A figura 4 mostra a microscopia eletrônica da *Y. lipolytica* e suas estruturas.

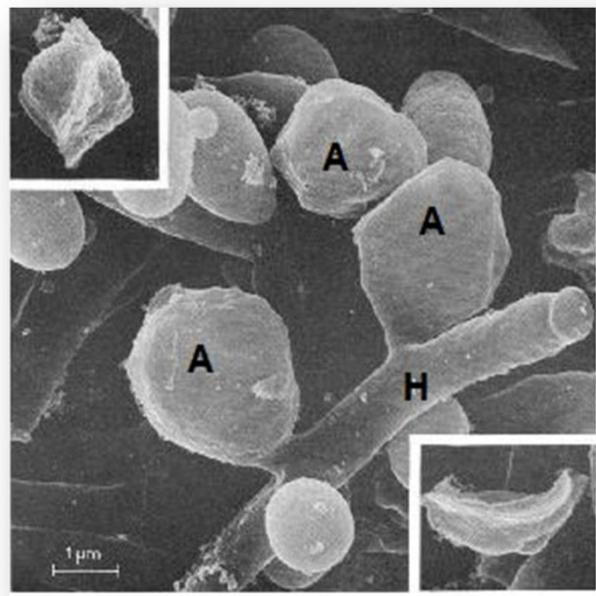


FIGURA 4: Microscopia eletrônica da *Yarrowia lipolytica* (A) blastosporos, (H) hifas.

Fonte: WEBER, 2015.

Y. lipolytica é um micro-organismo estritamente aeróbio, eucarioto do reino fungi. Esta levedura foi originalmente conhecida como *Candida lipolytica*, sendo esta, uma espécie não convencional considerada não patogênica (Nicaud, 2012). Com tolerância quanto aos parâmetros físicos tais como, presença de sal, baixas temperaturas, acidez e pH alcalino (Zinjarde, 2014). Além disso, tem como habitat substratos ricos em lipídeos e proteínas e, apesar de demonstrar um ótimo crescimento a 30°C, ainda são capazes de crescer em faixas de temperatura entre 5°C e 32°C (Nicaud, 2012).

A *Y. lipolytica* é produtora de enzimas extracelulares como as proteases, lipases, esterases, fosfatases e RNases que ajudam no seu crescimento sob condições adversas (Zinjarde, 2014). Além disso, é considerada como um modelo adequado para o estudo do dimorfismo em leveduras, na qual ocorre a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovoides e hifas bastante alongadas (Groenewald et al., 2014).

Quanto aos seus aspectos biológicos fundamentais, esta levedura tem sido proposta como um sistema modelo para o estudo do dimorfismo, do complexo mitocondrial, peroxissomas, acumulação de lipídeos, produção de lipases e como uma ferramenta genérica para a compreensão da evolução molecular de diferentes enzimas (Zinjarde, 2014).

Podem crescer em uma variedade de substrato hidrofóbico e acumular lipídeos intracelularmente em 40% do seu peso seco celular. A *Y. lipolytica* é frequentemente isolada de alimentos ricos em lipídeos, como por exemplo em produtos de origem animal (produtos lácteos e carnes). O contato

entre gotículas de óleo e a célula o mecanismo na qual a maior parte do substrato hidrófobo é transportado, vários outros mecanismos podem estar envolvidos neste processo, entre eles Lewis (ácido ou base), eletrostática ou Van der Waals (Coelho et al., 2010).

A *Y. lipolytica* tem sido utilizada nas biotransformações diversas de ácidos graxos, ácidos orgânicos e proteínas, na produção do bio-óleo, na indústria e em bio-refinarias (Zinjarde, 2014). As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para a produção de biossurfactantes são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultura. Sabe-se que a *Y. lipolytica* é capaz de produzir moléculas tensoativas, o que apresenta uma ampla diversidade nas fontes de carbono (Fontes et al., 2012).

Y. lipolytica tem vasta aplicação nas indústrias de alimentos e bebidas por seu poder emulsificante e tensoativo. Estas cepas estão presentes em diferentes tipos de alimentos devido a seus aspectos fisiológicos e sua versatilidade nutricional e são encontradas em produtos com carne, aves e em produtos lácteos, onde desempenha uma variedade de funções (Zinjarde, 2014).

A *Y. lipolytica* tem sido reconhecida como uma das espécies de leveduras associadas aos produtos lácteos pela presença da lipase, poder da atividade enzimática extracelular, alterações bioquímicas induzidas pela caseínas favorecendo assim a maturação em alguns tipos de queijos (Suzzi, 2001). No entanto, os ácidos graxos presentes nessa levedura podem ser transformados em compostos voláteis alterando o aroma característico do

queijo (Guerzoni, 2001). Os metabólitos secundários produzidos pela *Y. lipolytica* promovem também o crescimento de fungos em queijos curados induzindo a textura aberta (ranhuras) devido a produção de gás, desenvolvendo um sabor desagradável (Liua & Tsaob, 2009).

Cargas celulares elevadas de *Y. lipolytica* estão associadas também com a deterioração e descoloração de alimentos. Este último é uma falha observada nos queijos e ocorre por causa do catabolismo da tirosina que produz o pigmento castanho “melanina” (Zinjarde, 2014), um processo bioquímico de duas fases na qual o precursor é o primeiramente o pigmento acumulado fora das células, seguido da auto-oxidase e polimerase (Carreira et al., 2001).

As aminas biogênicas são o resultado de catabolismo de aminoácidos precursores na qual a descarboxilase remove o dióxido de carbono do grupo carbóximo dos aminoácidos liberando a amina correspondente. A tiramina, histamina putrescina, cadaverina, triptamina e β -feniletilamina são considerados as mais importantes aminas biogênicas ocorrentes nos queijos a partir de vários micro-organismos (Wyder et al., 1999).

A produção de aminas biogênicas é bastante incomum entre leveduras (Gardini et al., 2006). Entretanto, a alta produção proteolítica e lipolítica de *Y. lipolytica* está envolvida na ativação de genes possivelmente presentes em alguns isolados que expressam a produção de aminas biogênicas, além de influenciar na expressão de outros micro-organismos presentes na microbiota do queijo. O aroma de um queijo, independentemente

de sua classificação, está diretamente relacionado à produção de compostos voláteis e a textura ligada à formações biogênicas (Groenewald et al., 2013; Zinjarde, 2014).

Contudo, a *Y. lipolytica* não é adicionada no processo de produção do queijo, mas está entre as três principais ocorrências predominante no queijo. Ocasionalmente, esta levedura é encontrada tanto no interior como na superfície dos queijos. A espécie pode ser encontrada no leite, ou surgir da contaminação cruzada proveniente dos equipamentos, manipuladores e do ambiente (Groenewald, 2014). Alguns estudos relatam a presença de *Y. lipolytica* nos queijos tipo gouda, camembert, de pasta azul, cheedar, brie e algumas variedades do tipo feta (Zinjarde, 2014).

3 METODOLOGIA

3.1 Determinação dos utensílios e agentes higienizadores utilizados na produção de queijo

A partir do consentimento dos produtores foram visitadas algumas pequenas indústrias de produção do queijo colonial em Chapecó e região. Verificaram-se os utensílios e materiais utilizados no processo produtivo do queijo, sendo avaliados o tipo de material mais predominante e quais os mais propícios à formação do biofilme. As figuras 5 e 6 demonstram alguns dos utensílios e materiais utilizados na produção do queijo colonial.



FIGURA 5: Materiais e Utensílios utilizados na produção do queijo colonial (a) mangueira (PVC espiral), (b) Becker (polipropileno), (c) forma do queijo (polipropileno), (d) embalagem (nylon/polietileno).

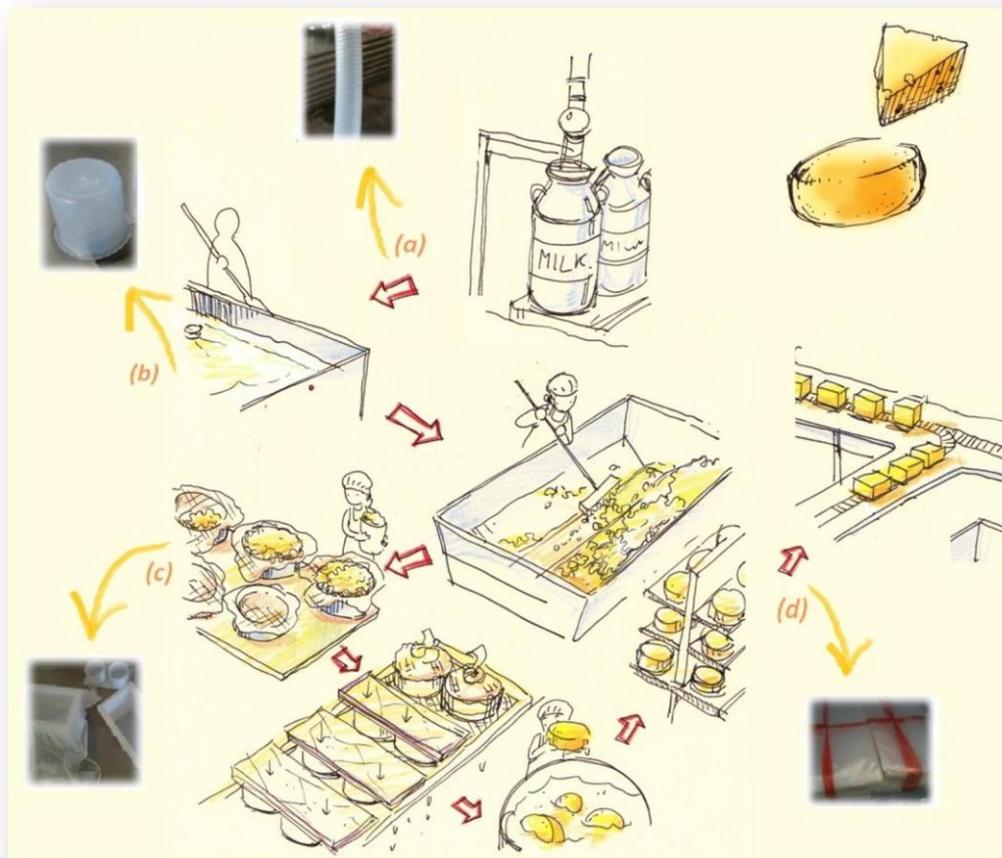


FIGURA 6: Materiais e Utensílios ilustrados no fluxo da produção do queijo (a) mangueira (transferência do leite); (b) Becker (transferência do coalho); (c) forma; (d) embalagem.
Fonte: Adaptado de DREAMSTIME (2015).

Os detergentes e sanitizantes utilizados na limpeza dos utensílios foram selecionados por meio dos procedimentos operacionais padronizados (POP) de higiene seguidos pelos fabricantes de queijo colonial. A tabela 3 descreve as informações obtidas:

Tabela 3: Informações dos procedimentos de higienização dos materiais e utensílios na produção do queijo colonial em produtores de Chapecó e Região/SC.

Materiais/Utensílios	Produtos químicos	Concentração	Tempo de contato
Estrados Plásticos	Detergente neutro	1 – 3%	05 minutos
	Hipoclorito de sódio	1%	10 – 15 minutos
Formas de queijo	Detergente neutro	3%	05 minutos
	Detergente alcalino	6 – 8%	10 minutos
	Hipoclorito de sódio	1% - 1,5%	10 – 20 minutos
Prateleiras	Detergente neutro	3%	05 minutos
	Detergente alcalino	6 – 8%	10 minutos
	Hipoclorito de sódio	1% - 1,5%	10 – 20 minutos
Becker/Colheres	Detergente neutro	3%	05 minutos
Espátulas Agitador de coelho Concha Peneiras Outros	Detergente neutro	3%	05 minutos
	Detergente alcalino	6 – 8%	10 minutos
	Hipoclorito de sódio	1% - 1,5%	10 – 20 minutos

Fonte: APACO (2014).

3.2 Locais da Realização da Pesquisa

Todos os ensaios de triagem para a formação do biofilme pelo método do cristal violeta em microplaca foram realizados nas dependências do Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade

Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os demais experimentos descritos na metodologia foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ, SC).

3.3 Seleção dos isolados

Foram escolhidos dezoito isolados provenientes do queijo de *Yarrowia lipolytica* (QU11, QU13, QU16, QU21, QU22, QU29, QU31, QU36, QU38, QU46, QU50, QU67, QU69, QU77, QU111, QU129, QU131, QU137) já com identificação molecular realizada por Mattanna et al. (2014), por meio de sequenciamento do domínio D1/D2 da grande subunidade (26S) do DNA ribossomal, utilizando iniciadores NL-1 NL-4, caracterizando estes isolados com 99% de identidade de sequência com cepas de *Y. lipolytica*.

As cepas foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com a colaboração da Dr.^a Patricia Valente.

3.4 Triagem dos isolados na formação do biofilme

A capacidade de produção do biofilme dos isolados selecionados de *Y. lipolytica* foi determinada de acordo com o método descrito por Stepanović et al. (2007) e Shin et al. (2002) com adaptações, realizado em triplicata. Inicialmente, as cepas foram cultivadas individualmente em ágar Sabouraud com Cloranfenicol – ASC (Himedia®, Índia) durante 24h a 32°C. A seguir inóculos de 10⁶ UFC/mL foram preparados conforme a escala 0,5 de

McFarland, e transferido 20 μL deste inóculo para microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo “U” contendo 180 μL de Caldo Triptose de Soja – TBS (Himedia®, Índia).

Após o período de incubação de 24h a 32°C, as células foram drenadas e os substratos foram lavados com água estéril, para a remoção das células não aderidas. Os poços foram preenchidos com (150 μL) de Metanol 99,9% permanecendo em contato por 20 minutos, em seguida, as microplacas foram invertidas para secagem no período de 30 minutos.

Para a coloração, os poços foram preenchidos com 150 μL de violeta de genciana a 0,5% (Newprov®, Brasil) por um período de 15 minutos, em seguida ocorreu a retirada e a lavagem das placas. Para finalizar, os poços foram preenchidos com etanol 100% e após 30 minutos as placas foram lidas por espectrofotometria a 450nm. A tabela 4 apresenta os critérios de classificação dos resultados quanto à classificação da formação do biofilme.

Tabela 4: Quantificação da absorvância para formação do biofilme de *Y. lipolytica*.

Formação do Biofilme	Faixa de Absorbância
Forte	> 0,280
Médio	0,170 – 0,279
Fraco	0,070 – 0,170
Não formador	< 0,070

Fonte: SHIN et al (2002).

3.5 Estoque e manutenção

Todos os isolados da *Y. lipolytica* utilizados no estudo foram mantidos à temperatura de -20°C, em Ágar Sabouraud com Cloranfenicol – ASC (Himedia®, Índia) acrescido de 20% de glicerol, com repiques periódicos sucessivos. Quando utilizadas, as cepas foram cultivadas em placas de ASC, incubadas a 32°C por 24 horas, para confirmação de viabilidade.

3.6 Preparo dos corpos de prova

Foram utilizados diferentes corpos de prova: forma de queijo (polipropileno), mangueira (PVC espiral), Becker (polipropileno) e embalagem (nylon/polietileno). Todos cortados no tamanho 1X1 cm (Figura 7). Antes do teste, os corpos de prova foram higienizados com detergente neutro a 3%, água destilada estéril e uma solução de etanol a 70% nesta ordem e logo após foram secados. O tratamento para esterilização foi realizado por exposição à radiação ultravioleta em Cabine de Segurança Biológica Classe II tipo A (Veco®, Brasil) pelo período de 1 hora.

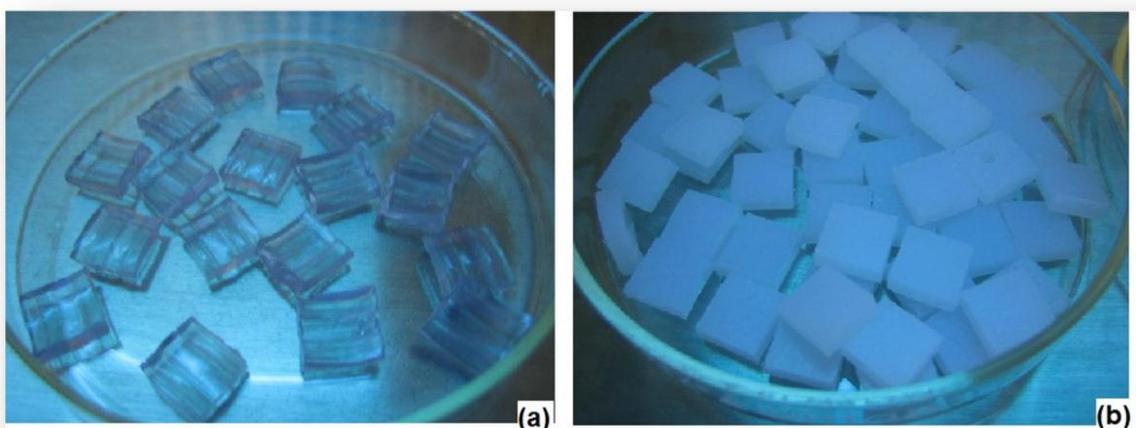


FIGURA 7: Materiais e Utensílios cortados no tamanho 1x1cm (a) mangueira (PVC espiral); (b) forma (polipropileno) em exposição à radiação ultravioleta.

3.7 Ensaio da formação do biofilme nos corpos de prova

O ensaio foi realizado conforme Souza et al. (2014), Flach, (2014) e Bergamo et al. (2014) com adaptações. Os isolados de *Y. lipolytica* foram cultivados em ágar sabouraud com cloranfenicol (Himedia®, India) durante 24 h a 32 °C. Culturas jovens foram adicionadas a 5 mL de Tryptone Soya Broth (Himedia®, Índia) dando origem a suspensão de 10^6 UFC/mL e em seguida incubados a 32 °C por 24 h. Aos corpos de prova utilizados no teste foram adicionados 1 mL do inóculo em TSB em 9 mL de água peptonada a 1% (Merck®, Germany) e incubados durante 96 h a 35 °C.

Após o período de incubação, os materiais foram lavados por três vezes com água peptonada a 1% (Merck®, Germany) para a remoção das células com fraca aderência. Em seguida, foram transferidos de forma asséptica para frascos contendo 50 mL de água peptonada a 1% e imediatamente submetidos a sonicação por 10 minutos para liberação das células aderidas nas superfícies dos materiais. Para este fim, utilizou-se um sonicador de banho ultracleaner 1400 com frequência de 40 KHz (Unique, Brasil). Em seguida, foi transferido 1 mL e realizado a diluição 1:10 em água peptonada a 1% (Merck®, Germany). Dando sequência foi retirado 0,1mL da alíquota e espalhada em ágar sabouraud com cloranfenicol (Himedia®, India). As placas foram incubados a 32 °C por 24 h e após esse período realizou-se a contagem das colônias no contador LS6000 (Logen®, Brasil).

3.8 Ensaio da atividade antibiofilme com detergentes e hipoclorito de sódio

Os corpos de prova foram higienizados conforme procedimentos realizados nas indústrias de produção de queijo colonial por meio das soluções detergente neutro 3% por 5 minutos, detergente alcalino 6% e 8% por 10 minutos, hipoclorito de sódio 1% e 1,5% por 10 e 20 minutos. À partir das culturas jovens de *Y. lipolytica* já cultivadas em ágar sabouraud com cloranfenicol (Himedia®, India), foram preparadas suspensões de 10^6 UFC/mL. Após a incubação por 24 h, foi adicionado 1 mL da suspensão nos corpos de prova em tubos de ensaios contendo 9mL de água peptonada a 1% (Merck®, Germany). Em seguida, os tubos foram incubados durante 96 h a 35 °C para posterior contagem microbiana, metodologia adaptada conforme já realizado por Bergamo et al. (2014).

3.9 Avaliação da hidrofobicidade (Método da gota séssil)

O ângulo de contato é definido pela interface líquido/vapor e a superfície do sólido onde a gota repousa. Isso depende de cada sistema e das interações entre as interfaces. A superfície dos sólidos pode apresentar alterações locais nas energias superficiais e valores do ângulo de contato diferentes daqueles obtidos sob uma condição equilibrada. A variação do molhamento é definida entre a diferença do maior e menor valor do ângulo (θ) nas condições experimentais. A rugosidade da superfície afasta ou retrocede o valor do ângulo em contato (Ziglio, 2010; Bachmann, 2000). Os líquidos apresentam-se de forma esférica. Uma menor área superficial para um

determinado volume, no entanto, outras forças atuam sobre uma gota, o que faz as esferas se achatarem (Brisolari, 2008).

Um líquido sofre a atuação de uma força de atração das moléculas que o compõe. Quanto maior for a proporção de grupos polares nas moléculas, maior será a atração entre elas. Líquidos com pequenas tensões superficiais formam filmes sobre superfícies sólidas. Quando uma gota de líquido é depositada sobre a superfície sólida, pode-se então se formar três tipos de superfície: (a) completamente molhada, quando o líquido se espalha totalmente sobre a superfície hidrofílica, formando um ângulo $< 30^\circ$. (b) parcialmente molhada, o ângulo formado entre o líquido e a superfície fica entre $30^\circ - 89^\circ$. (c) e não molhada, quando o ângulo é igual ou maior que 90° , resultando em uma superfície hidrofóbica (Ziglio, 2010).

A técnica foi utilizada com o objetivo de medir a hidrofobicidade dos corpos de prova, assim como a hidrofobicidade do inoculo de *Y. lipolytica*, através da medida do ângulo. Segundo o estudo de Locatelli (2004), uma gota com $20\mu\text{L}$ do meio de cultura caldo triptona de soja (Himedia®, Índia) com culturas em estudo na 10^6 UFC/mL foi cuidadosamente depositada sobre as superfícies dos corpos de prova para posterior avaliação do ângulo de contato da gota na superfície.

Foram fotografadas as gotas sobre as superfícies dos corpos de prova com o auxílio de uma câmera digital da marca Canon® Powershot modelo SD200 após 5 segundos para uma melhor estabilidade da gota na superfície. Em seguida, de acordo com Skodowska et al (1999) os valores do ângulo de

contato foram medidos (com o auxílio de um programa de computador Image J) através da inclinação da reta formada entre o raio da base de contato e a altura da gota a partir de três medidas consecutivas.

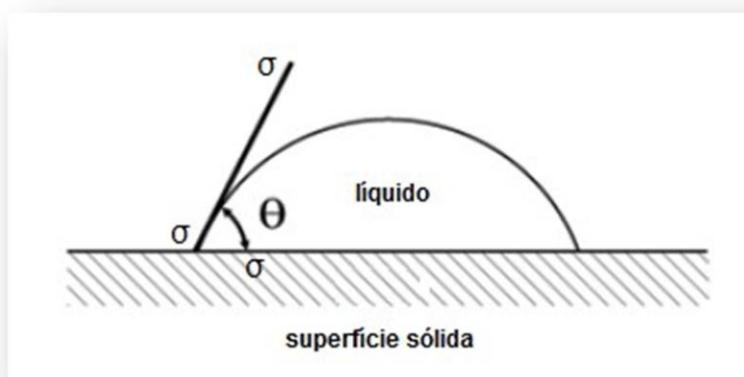


FIGURA 8: Forma de uma pequena gota de uma superfície uniforme ideal, com uma superfície repelente de água média.

Fonte: adaptação de Ziglio (2010).

3.10 Determinação do índice de emulsificação (E24)

Emulsões são sistemas heterogêneos formados por fases líquidas, uma em menor concentração denominada fase contínua e a outra descontínua. As duas fases podem ser água ou uma solução aquosa e algum hidrocarboneto. As emulsões são divididas em três fases: aquosa (hidrofílica), oleosa (lipofílica) e a emulgente (tensioativo-hidrofílico/lipofílico) (Coutinho, 2009).

Bactérias e fungos apresentam grande habilidade de degradar substâncias orgânicas. Além destes micro-organismos secretarem enzimas de

degradação de substâncias tóxicas, ainda tem propriedades surfactantes com alta capacidade de emulsificação (Bisognin, 2012). Biossurfactantes produzidos por vários micro-organismos têm diferentes propriedades tensoativas (Sarubbo, 2006).

Biossurfactantes são classificados como glicolipídios, lipolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos e partículas poliméricas. A porção hidrofóbica da molécula são os ácidos graxos de cadeia longa, ácidos graxos hidróxilos ou ácidos graxos a-alquil-b-hidróxil. Já porções hidrofílicas podem ser formadas por hidratos de carbono, aminoácidos fosfato, ácido carboxílico ou álcool (Khopade, 2012).

A produção de agentes emulsificantes de fontes de leveduras normalmente requer a presença de substratos que não se misturam com água, o que representa um desafio para o isolamento do biossurfactante produzido (Amaral et al., 2006).

A atividade de emulsificação foi medida utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987), em que 4 mL de xileno foram adicionados em caldo contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL dos micro-organismos em estudo. Logo após os tubos foram agitados por 2 minutos. A estabilidade foi determinada após 24h e o índice de emulsificação foi calculado dividindo a altura da camada de emulsão pela altura total da mistura e multiplicada por 100.

3.11 Determinação da curva de morte (*Time-kill assay*)

A determinação da curva de morte é bastante utilizada para avaliar a ação biocida sobre as células de biofilme utilizando os saneantes através das diluições. Apesar do método ser trabalhoso, esta técnica tem como vantagem uma imagem dinâmica da ação antimicrobiana e o seu tempo de interação (pela contagem de colônias). Porém, os resultados são essenciais para determinar as concentrações necessárias para inibir o crescimento microbiano (Petersen et al. 2006; Tong et al. 2006).

Conforme a metodologia apresentada por Abreu et al (2011) e Suganthini et al (2008) com adaptações, suspensões das cepas de *Y. lipolytica* na concentração de 10^6 UFC/mL e as soluções de detergente neutro 3%, detergente alcalino 6% e 8%, hipoclorito de sódio 1% e 1,5% foram preparadas. Em seguida foram adicionados em tubos de ensaios estéril 1,5 mL das soluções para 0,5mL do inóculo. O tempo de contato foi de 5, 10, 15, 20, 25 minutos. Em seguida foram transferidos 1 mL para tubos de ensaios contendo 9mL de Água peptonada a 1% (Merck®, Germany) e obtida a diluição 10^{-3} , e em seguida 0,1mL da alíquota foi espalhada em em ágar sabouraud com cloranfenicol (Himedia®, India) . As placas foram incubados a 32 °C por 24 h e após esse período realizou-se a contagem das colônias no contador LS6000 (Logen®, Brasil).

3.12 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância estatística dos dados foi estipulada em 5% ($< 0,05$). Nos grupos em que foram constatadas diferenças estatisticamente significativas foi utilizado o Teste t de Student e ANOVA. O teste de normalidade também foi aplicado usando o Kolmogorov-Smirnov (KS) para todos os resultados do estudo, na qual todas as variáveis apresentaram normalidade nas suas distribuições. Para análise dos dados foi utilizado o software comercial IBM SPSS Statistics version 22.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo Método Cristal Violeta em Microplacas

A capacidade de formação do biofilme para cada isolado de *Y. lipolytica* avaliado pelo método cristal violeta está demonstrada na tabela 5.

Tabela 5: Formação do biofilme pelo método do cristal violeta de cepas *Y. lipolytica* proveniente de queijo colonial.

Isolados	Absorbância*	Formação
QU11	0,022	Não formador
QU13	0,277	Médio
QU16	0,423	Forte
QU21	0,065	Não formador
QU22	0,247	Médio

QU29	0,066	Não formador
QU31	0,005	Não formador
QU36	0,112	Fraco
QU38	0,015	Não formador
QU46	0,144	Fraco
QU50	0,306	Forte
QU67	0,053	Não formador
QU69	0,381	Forte
QU77	0,242	Médio
QU111	0,037	Não formador
QU129	0,050	Não formador
QU131	0,157	Fraco
QU137	0,125	Fraco

* valor da média das absorvâncias em triplicata.

Após os ensaios, os isolados testados QU13, QU16, QU22, QU50, QU69 e QU77 foram selecionados por apresentarem uma melhor formação do biofilme, com faixa de leitura entre 0,112 a 0,423. Destaca-se que os isolados QU16, QU50, QU69 (fortes formadores de biofilme) ($> 0,280$) e QU13, QU22, QU77 (médios formadores de biofilme) (0,170 – 0,279).

4.2 Formação do biofilme nos corpos de prova

Conforme a tabela 6, em todos os corpos de prova houve formação do biofilme a partir dos isolados de *Y. lipolytica*. A contagem de células aderidas alternou entre 3,95 – 6,27 log UFC cm⁻².

Tabela 6: Contagens de células dos isolados de *Y. lipolytica* que aderiram aos corpos de prova durante o processo de formação de biofilme (média dos valores em log₁₀ UFC cm²) ± desvio padrão.

	QU16	QU50	QU69	QU77	QU22	QU13
Forma (polipropileno)	6,23±0,03	5,89±0,09	5,73±0,02	5,72±0,01	5,62±0,06	5,68±0,58
Mangueira (PVC espiral)	5,87±0,12	5,78±0,17	5,60±0,05	5,02±0,05	3,95±0,35	4,95±0,06
Becker (polipropileno)	5,83±0,06	5,48±0,14	5,60±0,06	5,71±0,07	5,27±0,09	5,73±0,09
Embalagem (polietileno)	5,30±0,18	6,27±0,02	5,11±0,06	5,20±0,04	5,53±0,14	5,45±0,02

Observa-se no corpo de prova “forma” obteve uma contagem de células maior com relação aos demais. No entanto, não houve diferença significativa (<0,05) entre os resultados se compararmos o corpo de prova “forma” e os demais materiais e utensílios.

Pode-se destacar ainda uma variância entre a contagem das colônias por material e utensílios, cujos os valores seguem: forma (0,028); mangueira (0,390); becker (0,042) e embalagem (0,179). Os valores para as cepas, independente do material e utensílios, foram os seguintes: QU16 (0,097); QU50 (0,111); QU69 (0,068); QU77 (0,125); QU22 (0,424); QU13 (0,198).

4.3 Atividade antibiofilme com detergentes e hipoclorito de sódio

As Figuras 9, 10 e 11 demonstram a sobrevivência de isolados de *Y. lipolytica* em todos os corpos de prova, comparado com a formação do biofilme no material sem o processo de higienização. Diferentes detergentes e sanitizantes utilizados na indústria de alimentos também são adotados nas pequenas agroindústrias da produção de queijo do tipo colonial. Nestes locais, a higienização ocorre com os produtos testados no experimento, variando apenas a concentração e o tempo. Após o procedimento de limpeza, foi avaliada a capacidade de adesão celular destes isolados e a sua resistência aos higienizadores.

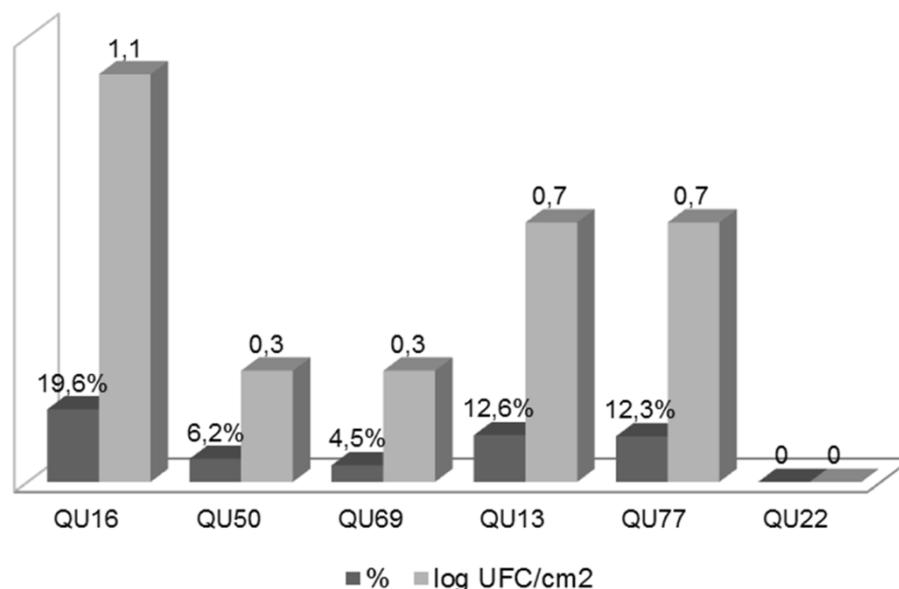


FIGURA 9: Redução dos isolados QU16, QU50, QU69, QU13, QU77 e QU22 de *Y. lipolytica* em % e log 10 UFC/cm² no corpo de prova “becker” (polipropileno) após a higienização com (DN3%) detergente neutro 3% - 05 minutos.

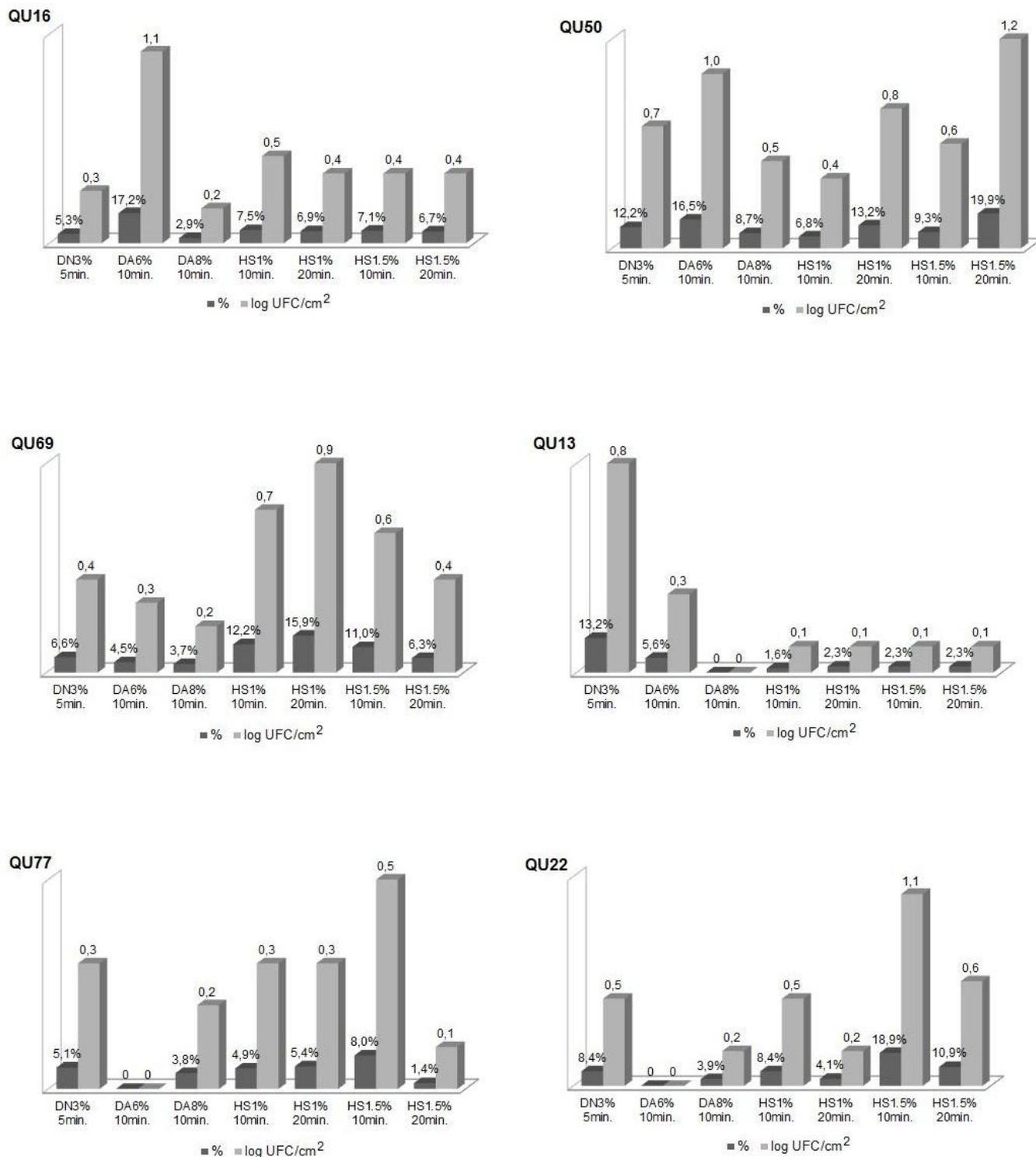


FIGURA 10: Redução dos isolados QU16, QU50, QU69, QU13, QU77 e QU22 de *Y. lipolytica* em % e log₁₀ UFC/cm² no corpo de prova “forma” (polipropileno) após a higienização com (DN3%) detergente neutro 3% - 05 minutos, (DA6%) e (DA8%) detergente alcalino 6% e 8% - 10 minutos, (HS1%) hipoclorito de sódio 1% - 10 e 20 minutos e (HS1,5%) hipoclorito de sódio 1,5% - 10 e 20 minutos.

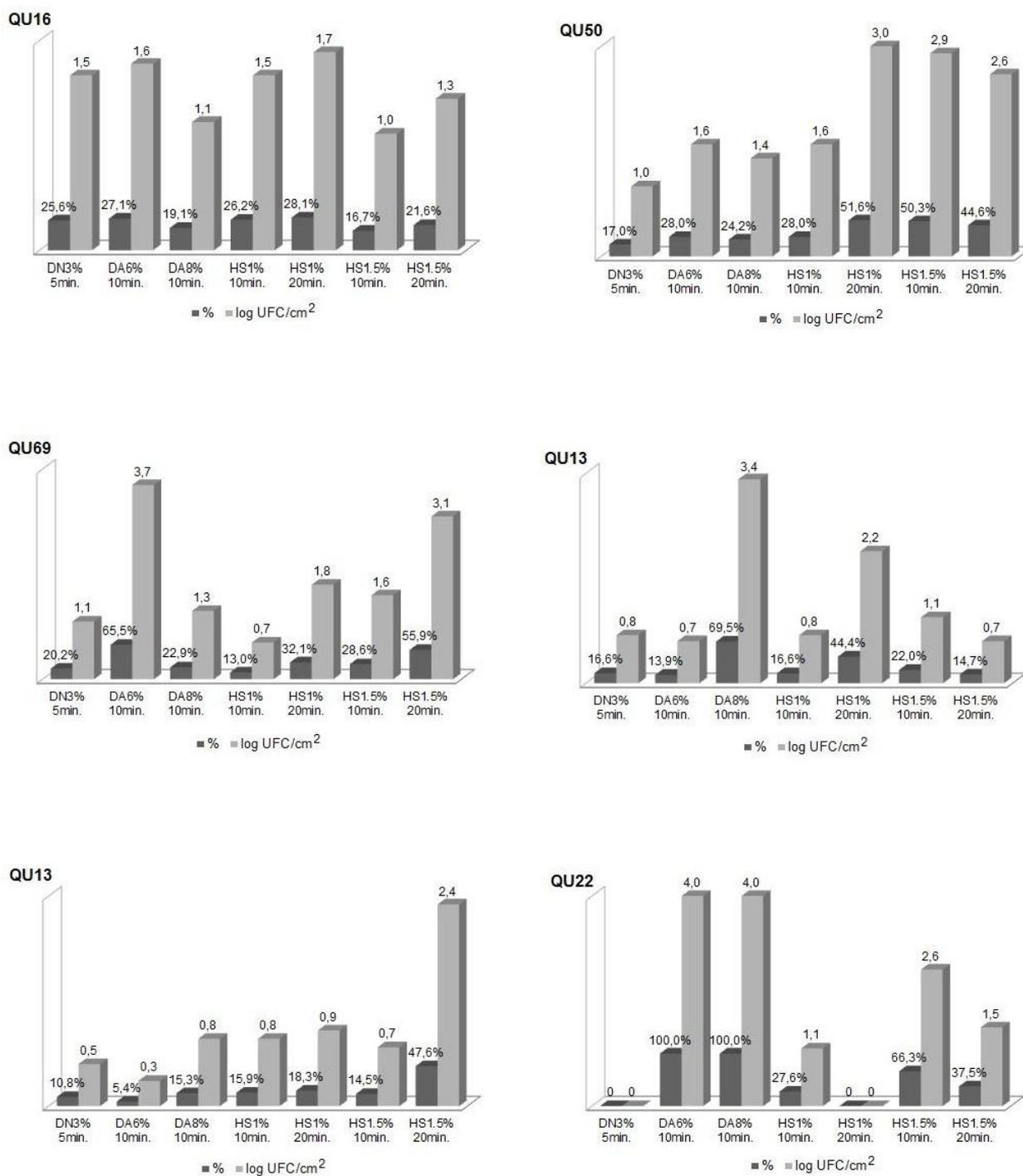


FIGURA 11. Redução dos isolados QU16, QU50, QU69, QU13, QU77 e QU22 de *Y. lipolytica* em percentual (%) e log₁₀ UFC/cm² no corpo de prova “mangueira” (PVC espiral) após a higienização com (DN3%) detergente neutro 3% - 05 minutos, (DA6%) e (DA8%) detergente alcalino 6% e 8% - 10 minutos, (HS1%) hipoclorito de sódio 1% - 10 e 20 minutos e (HS1,5%) hipoclorito de sódio 1,5% - 10 e 20 minutos.

Após aplicação do test “t” entre os tratamentos avaliados, os valores mostraram-se significativas ($<0,05$) com adequação forte tendo em vista a correlação. O corpo de prova “mangueira” (PVC espiral) apresentou o melhor resultado com o sanitizante hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos ($p=0,001$; $t=6,869$; $r=0,843$; IC=0,688, 1,512). O hipoclorito de sódio (1,5%) por 20 minutos apresentou resultados semelhantes ($p=0,004$; $t=5,188$; $r=0,418$; IC=0,974, 2,890). Na “forma” (polipropileno), podemos observar uma melhor significância ($<0,05$) com o resultado da utilização do detergente neutro (3%) ($p=0,002$; $t=6,022$; $r=0,813$; IC=0,281, 0,699) e hipoclorito de sódio (1%) por 10 minutos ($p=0,005$; $t=4,798$; $r=0,677$; IC=0,186, 0,617). O detergente alcalino (6%) foi o único que não apresentou significância ($<0,05$) nos resultados para este corpo de prova. O corpo de prova “becker” (polipropileno) foi analisado apenas com o detergente neutro (3%) por 5 minutos e apresentou uma menor significância ($<0,05$) nos valores comparados aos demais no estudo ($p=0,036$; $t=2,839$; $r= -0,808$; IC=0,047, 0,953).

Após a análise dos gráficos, pode-se observar que o corpo de prova “mangueira” (PVC espiral) foi o material que apresentou uma melhor redução dos isolados de *Y. lipolytica* com os detergentes e hipoclorito de sódio. Observa-se uma redução em 100% na utilização do detergente alcalino (figura 11) no corpo de prova “mangueira” com o isolado QU22. Já o efeito do sanitizante hipoclorito de sódio teve uma melhor redução de biofilme em concentração de (1%) por 20 minutos.

Na figura 10 podemos notar que para o corpo de prova “forma” (polipropileno) há uma menor redução de biofilme em comparação aos demais

corpos de prova, destacando uma menor eficiência ao se utilizar o detergente alcalino (6%) e (8%) nos isolados QU13, QU77 e QU22.

4.4 Hidrofobicidade (Método da gota séssil)

Os resultados das medidas dos ângulos das gotas sésseis indicam que o corpo de prova “mangueira” apresentou uma maior hidrofobicidade, uma vez que as gotas sobre a sua superfície apresentaram ângulos de inclinação maiores que nos demais corpos de prova em estudo (Tabela 7).

Tabela 7: Medidas dos ângulos em graus das gotas sésseis sobre os corpos de prova forma, mangueira, becker e embalagem utilizando-se água destilada e isolados de *Y. lipolytica* QU16, QU50, QU69, QU13, QU77, QU22 (média dos valores ($^{\circ}$) \pm desvio padrão).

	ÁGUA	Caldo TBS	QU16	QU50	QU69	QU77	QU22	QU13
Forma (polipropileno)	72,7 \pm 0,26	68,4 \pm 0,33	59,2 \pm 0,32	60,7 \pm 0,17	62,1 \pm 0,58	47,6 \pm 0,32	62,3 \pm 0,82	59,6 \pm 0,54
Mangueira (PVC espiral)	77,5 \pm 0,26	69,3 \pm 0,12	72,6 \pm 0,25	63,6 \pm 0,26	57,5 \pm 0,32	65,6 \pm 0,26	66,3 \pm 0,40	62,3 \pm 0,20
Becker (polipropileno)	60,9 \pm 0,04	61,2 \pm 0,77	49,5 \pm 0,14	48,7 \pm 0,30	52,8 \pm 0,04	34,4 \pm 0,42	34,9 \pm 0,23	52,5 \pm 0,31
Embalagem (polietileno)	62,8 \pm 0,18	64,8 \pm 0,82	58,6 \pm 0,18	61,8 \pm 0,18	57,7 \pm 0,06	67,4 \pm 0,04	59,1 \pm 0,14	59,8 \pm 0,02

A comparação entre os ângulos da gota da água e dos isolados não apresentou significância nos resultados ($>0,05$). Porém, houve diferença significativa ($<0,05$) entre os demais corpos de prova. Verificando-se os resultados apresentados das medidas do ângulo de contato, observou-se um valor maior do ângulo no corpo de prova “mangueira” com média geral de 65,2 $^{\circ}$

$\pm 6,5$ mostrando que sua superfície tem uma menor molhabilidade em comparação aos demais corpos de prova. Relacionando todos os ângulos de contatos das culturas em estudo, o corpo de prova “becker” apresentou uma significância nos resultados ($<0,05$) comparado a “forma”, “mangueira” e “embalagem”, apresentando assim uma melhor molhabilidade. Todos os ângulos das culturas nos materiais apresentaram significância nos resultados ($< 0,05$).

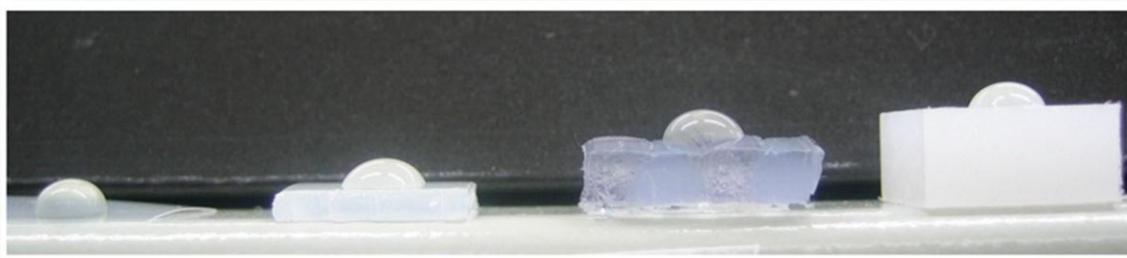


FIGURA 12: Gota dos isolados de *Y. lipolytica* em caldo TBS nos materiais e utensílios cortados no tamanho 1x1 cm para posterior medida dos ângulos.

4.5 Índice de emulsificação (E24)

Os índices de emulsificação (E24) variaram de 49,7% a 88,3% nos isolados de *Y. lipolytica* e podem ser visualizados na tabela 8, na qual demonstram a produção de bioemulsificante em todos os isolados. O isolado QU50 apresentou o menor resultado E24 de 49,7%. Conseqüentemente, obteve-se uma maior significância ($<0,05$) nos resultados comparados aos valores obtidos para os demais isolados (QU16 $p<0,000$; QU69 $p<0,000$; QU22 $p<0,000$; QU13 $p<0,001$ e QU77 $p<0,002$). Por meio da figura 13 visualiza-se a formação de emulsificação com os isolados em teste, mostrando uma

estabilidade.

Tabela 8: Valores do índice de emulsificação em percentual dos isolados de *Y. lipolytica* QU16, QU50, QU69, QU13, QU77, QU22 (média dos valores E_{24} (%) \pm desvio padrão DP).

Isolados	$E_{24} \pm DP$
QU16	88,3 \pm 3,05
QU50	49,7 \pm 1,53
QU69	83,0 \pm 4,58
QU77	72,3 \pm 2,89
QU22	86,3 \pm 1,79
QU13	74,7 \pm 3,20

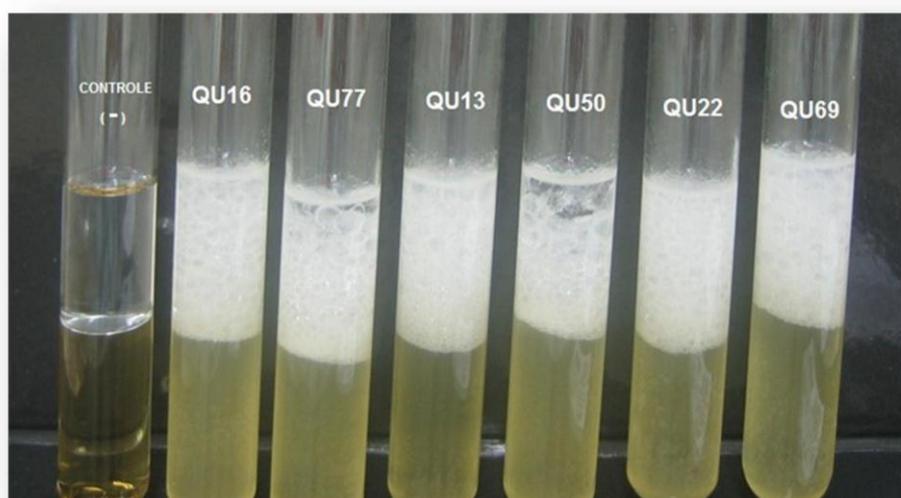


FIGURA 13: Formação de emulsificação dos isolados de *Y. lipolytica* após 24 horas.

4.6 Curva de morte (*Time-kill assay*)

O ensaio da curva de morte foi realizado para determinar o tempo de morte dos isolados de *Y. lipolytica* frente aos detergentes e hipoclorito de sódio. A figura 14 mostra o número de células para o experimento realizado com o detergente neutro (3%).

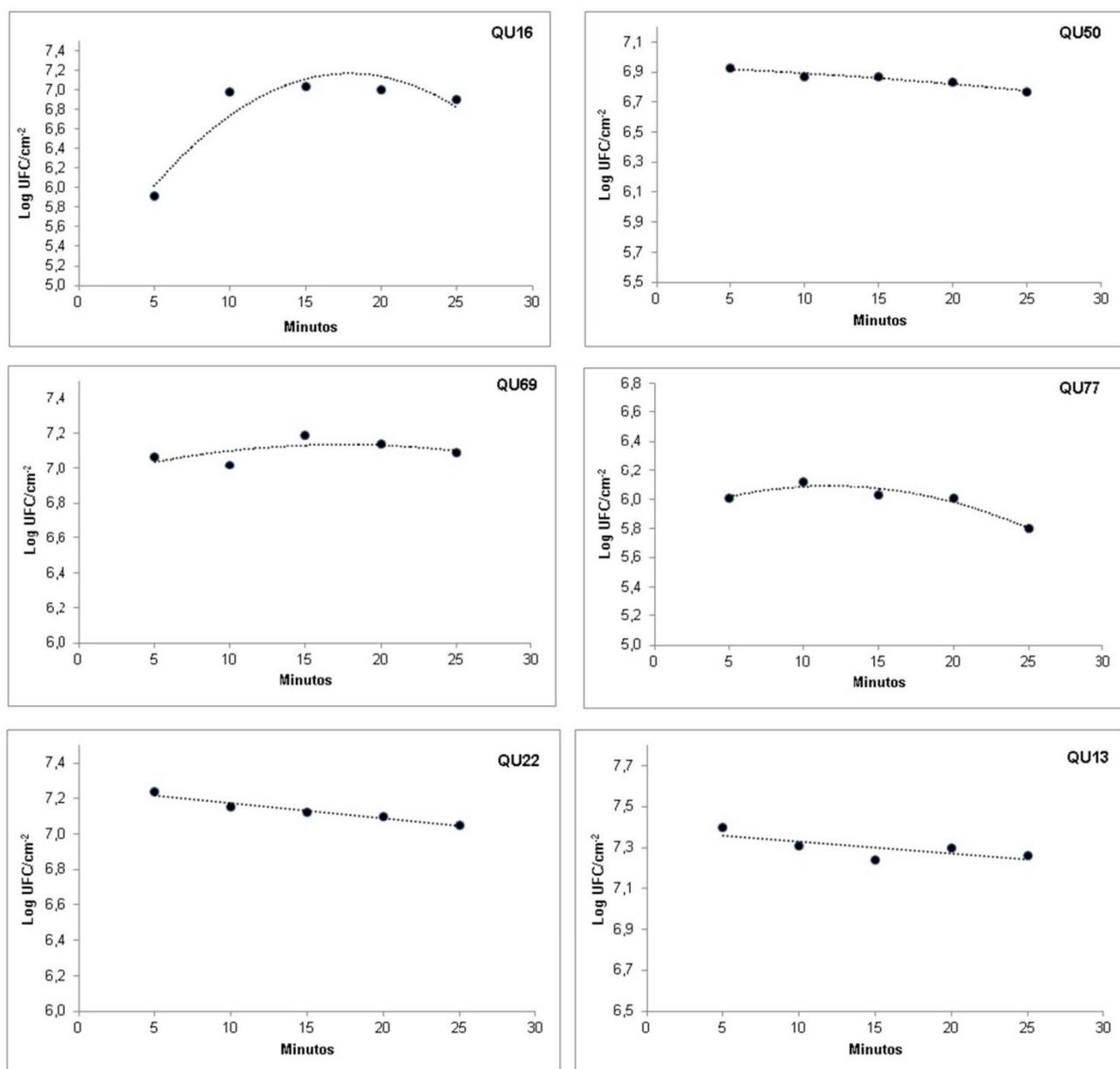


FIGURA 14: Isolados de *Y. lipolytica* com o detergente neutro (3 %): QU16; QU50; QU69; QU77; QU22; QU13 com crescimento das colônias em 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

Observou-se que não houve inibição de crescimento em nenhum dos tempos testados para todos os isolados (figura 14). Percebe-se ainda, pouca alteração no decorrer dos tempos. Logo, não houve significância ($<0,05$) nos resultados se comparados o tempo 5 minutos ao de 25 minutos ($p=0,650$; $t=0,483$; $r=0,650$; $IC= -0,622, 0,425$). Todavia, demais detergente alcalino nas concentrações 6%, 8% e o sanitizante hipoclorito de sódio 1%, 1,5% foram eficazes na inibição do crescimento em todos os tempos testados com as demais isolados de *Y. lipolytica*.

5 DISCUSSÃO

Biofilmes podem ser formados em materiais ao longo do processo produtivo na produção de laticínios, sobre aço inoxidável, borracha, silicone, vidro, plástico, superfícies de madeira e equipamentos de ordenhas. Bolores, leveduras e bactérias dominam na formação de biofilme neste segmento com formação estável e por um longo período (Montel et al., 2014). A formação do biofilme por leveduras pode atuar em queijos artesanais de três maneiras, causando a deterioração do produto, formando um sabor indesejável e descolorindo o produto final. Também pode causar o efeito benéfico através das enzimas proteolíticas e lipolíticas realçando o sabor durante a maturação (Galinari et al., 2014).

Conforme demonstrado na tabela 8, em todos os corpos de prova houve formação do biofilme a partir dos isolados de *Y. lipolytica*. Observando-

se o estudo de Dusane et al. (2012), a formação de biofilme também foi presente em lâminas de vidro com cepa de *Y. lipolytica* NCIM 3589. Sabe-se ainda que esta levedura forma biofilmes em superfícies diferentes na presença de uma variedade de substratos sob condições favoráveis. E associada à deterioração de alimentos, inclusive em variedades de queijos que desenvolvem o processo de catabolizar a tirosina, favorecendo a alteração na sua coloração (Zinjarde et al., 2014; Dusane et al., 2012).

Brugnioni et al. (2012) e Rosa et al. (2015), efetuaram contagem de células das leveduras *K. marxianus*, *C. krusei*, *Zygosaccharomyces* sp. e *R. mucilaginosa* com resultados maiores que $6,0 \log 10 \text{ UFC/cm}^2$ e $7,0 \log 10 \text{ UFC/cm}^2$ respectivamente e observaram valores semelhantes entre as contagens sem diferenças significativas ($p > 0,05$). Resultados que se assemelham, por exemplo, aos valores de 6,27 e 6,23 UFC/cm^2 obtidos neste trabalho quando avaliada a adesão da superfície dos corpos de prova.

Galinari et al. (2014), testaram a formação de biofilme em utensílios de madeira utilizados na produção queijo, sendo que os valores obtidos foram menores em comparação aos números obtidos no presente trabalho, com valores em $\log \text{ UFC/cm}^2$ foram de 1,03 para “forma”, 2,98 e 3,27 em “mesas” e 3,21 e 3,25 nas “prateleiras”.

Tem sido relatado em estudos a diversidade de micro-organismos capazes de formar biofilmes em vários segmentos da indústria alimentícia. Ao contrário do que foi apresentado neste trabalho, pode-se citar a aderência bacteriana com resultados significativos apresentada nos estudos de Beltrame et al. (2014) e Santos Júnior et al. (2014), em que foram observadas

contagens máximas de 6,92 log 10 UFC/cm² em corpos de prova à base de polietileno e 6,17 log UFC cm⁻² em superfícies sólidas de polipropileno. Sorovares de *Salmonella* não apresentaram diferenças significativas nos níveis de adesão quando expostos em aço inoxidável ou polietileno (Tondo et al., 2010). Cepas de *Staphylococcus aureus* demonstraram uma melhor adesão das células na superfície do aço inoxidável em 240h de incubação, em comparação com a superfície de polipropileno (Santos Junior et al., 2014).

Nos resultados obtidos por meio da metodologia que avaliou a formação do biofilme, observou-se que *Y. lipolytica* é uma forte formadora deste nos materiais à base de polipropileno, polietileno e PVC aspiral. Não há relatos de como esta levedura se comportaria se estivesse envolvida com outros micro-organismos que participam do processo produtivo do queijo colonial.

Na avaliação com detergentes e sanitizante (figuras 9, 10 e 11) observa-se que o corpo de prova “forma” (polipropileno) foi o material que mais favoreceu a adesão, seguido pelos corpos de prova “becker” (polipropileno) e “mangueira” (PVC espiral), respectivamente. Observou-se uma melhor eficiência na utilização do sanitizante detergente alcalino (figura 10) no corpo de prova “mangueira” no isolado QU22. Também neste mesmo corpo de prova o efeito do sanitizante hipoclorito de sódio promoveu uma melhor redução de biofilme. Os mesmos foram tratados em concentração de 1,0 e 1,5 % (figura 10) no tempo de 10 e 20 minutos. Os resultados foram significativos no estudo de Brugnoni et al. (2012), no qual o hipoclorito de sódio em concentrações de 0,02 %, 0,035 % e 0,05 % foi eficaz em todas as cepas testadas de levedura, com redução mínima de 4 log do biofilme.

De acordo com Houdt & Michiels (2009) e Mogotsi et al. (2014), entre os vários sanitizantes disponíveis, o cloro ativo é provavelmente o composto mais utilizado e o hipoclorito de sódio apresenta-se como um agente oxidante ativo que possui capacidade de destruir a atividade celular, e das proteínas. No entanto, sua penetração só ocorre por completo quando estes estão em um estado deionizado. Além disso, agentes de limpeza como detergentes são frequentemente combinados com solução à base de cloro para uma melhor desinfecção e eficácia.

Por outro lado, se compararmos a ação dos detergentes e sanitizantes sobre os isolados de *Y. lipolytica* não existem dados quanto à resistência de suas células aderidas. Ainda assim, há outros estudos que relatam a ação de desinfetantes com leveduras. O hipoclorito de sódio mais álcool 70% foram eficazes contra um mix de leveduras planctônicas (Théraud et al., 2004). Esta solução reduziu a adesão de todas as cepas de *C. albicans*. Para a maioria de outras espécies de *Candida* (não-*albicans*) o incremento da razão de blastosporos com relação às hifas em poliestireno não causou efeito sobre a produção ou atividade da enzima proteinase (Webb et al., 2007). Biofilmes formados por estirpes de *C. albicans* foram erradicados quando expostos ao hipoclorito de sódio por 30 min em concentrações de 1:32 ou mais forte (Dahlan et al., 2011). Ainda, Ilknur et al. (2012) demonstraram uma redução do biofilme em comparação ao grupo de controle em espécies de *Candida*. No entanto, nenhum desinfetante testado removeu completamente o biofilme.

Cabe destacar que a legislação autoriza o uso de sanificantes à

base de quaternário de amônio, iodoformo e peróxido de oxigênio, que podem - com seus mecanismos de ação - vir a inibir o crescimento das leveduras após o processo de higienização dos materiais.

O método de ângulo de contato da gota séssil foi utilizado para caracterizar a hidrofobicidade/hidrofilicidade das superfícies. A relação entre hidrofobicidade e formação do biofilme e a correlação entre eles são, na maioria das vezes, evidentes e a propriedade físico-química da superfície regulando a adesão inicial dos micro-organismos. Sendo assim, as características hidrofóbicas do biofilme fazem com que as suas propriedades adesivas se anexem facilmente às superfícies dos materiais, podendo a adesão ser reversível, dependendo da eletrostática inicial entre a célula e o substrato (Tarifa et al., 2013; Cappitelli et al., 2014). No entanto, a energia livre da superfície definida pela rugosidade dos materiais também pode influenciar na formação do biofilme (Flausino et al.; 2014).

Assim como neste estudo, outros resultados também foram favoráveis quanto às medidas dos ângulos com leveduras, favorecendo a adesão microbiana. Gole et al. (2002) observaram que regiões hidrofóbicas com ângulos de contato de gota mediram até 105 graus em células de *Y. lipolytica* na superfície do material em teste. O ângulo de contato também foi evidenciado no trabalho de Gallardo-Moreno et al., (2004) em cepas de *Candida parapsilosis* com medições entre 15 a 92 graus. As hidrofobicidades de cepas de leveduras foram positivamente relacionadas com a taxa de adesão dos materiais testados e com níveis diferentes de formação do biofilme, observado nos resultados de Tarifa et al. (2013).

Sinde & Carballo (2000), em sua pesquisa com bactérias, observaram também ângulos de contato com *Salmonella* que apresentaram significância nos valores obtidos comparados à cepas de *L. monocytogenes*. No entanto, não houve diferenças significativas ($<0,05$) entre os ângulos encontrados. Por este motivo, todos os materiais testados à base de borracha, polietileno e aço inoxidável utilizados na produção de leite foram classificados como hidrofóbicos.

Entende-se que superfícies hidrofóbicas - tais como aço a maioria dos polímeros - em contato com alimentos podem absorver proteínas através de interações proteína-superfície hidrofóbicas e as moléculas de proteínas adsorvidas podem sofrer alterações podendo conduzir incrustações irreversíveis de alimentos (Merian & Goddard, 2012). Isto pode ser atenuado através da adoção de utensílios que tenham incrustações ricas em proteínas provenientes dos produtos lácteos associados à contaminação por *Y. lipolytica*.

Estudos têm demonstrado a formação de emulsificação por microorganismos. Fontes et al. (2012), relataram que cepas de *Y. lipolytica* apresentaram índices de emulsificação máxima de 68,0 e 70,2%. Souza et al., (2012) também obtiveram uma boa produção de emulsificante em seus resultados com *Y. lipolytica* em presença de água do mar. No sentido de melhorar a produção de biossurfactantes, Fontes et al. (2010) alcançaram o melhor resultado de índice de emulsificação (67,7%) em um meio composto com sulfato de amônio e extrato de levedura. Também foi detectada atividade emulsificante com *Y. lipolytica* em meio de cultura específico na presença de glucose como fonte de carbono no estudo de Amaral et al. (2006).

Sabe-se que a maioria dos micro-organismos que degradam hidrocarbonetos emulsionados produz biossurfactantes. A hidrofobicidade da superfície celular também é um aspecto importante na adesão celular microbiana às superfícies. Logo, existe uma correlação direta entre a hidrofobia, produção de biossurfactante e aderência microbiana (Youssef et al., 2004; Coimbra et al., 2009).

Em geral, as concentrações às quais os sanitizantes exercem o efeito antimicrobiano indicam a possibilidade de sua utilização para higienização dos materiais, utensílios e equipamentos no processo da cadeia produtiva dos alimentos, em que redução dos micro-organismos é eficaz. No entanto, para alcançar este objetivo é necessário utilizar-se do tempo de exposição adequado para alcançar uma desinfecção completa ou estabilização microbiana. Por isso, foi realizado o ensaio da curva de morte com os detergentes e o hipoclorito de sódio em uso para validar sua eficácia frente aos isolados de *Y. lipolytica*.

Diante dos resultados encontrados neste estudo, percebeu-se que não houve crescimento dos isolados de *Y. lipolytica* em todos os tempos no teste da curva de morte realizada com o sanitizante à base de cloro e detergente com hidróxido de sódio. Ainda assim, para o detergente neutro não houve uma inatividade dos isolados.

A curva de morte no presente estudo demonstra resultados semelhantes com o apresentado por Brugnoli et al. (2012) utilizando o sanitizante hipoclorito de sódio em cepas de leveduras *C. krusei*, *Zygosaccharomyces sp.*, *K. marxianus* e *R. mucilaginosa*. Os autores

observaram também que para as células planctônicas a redução ocorreu com uma concentração mais baixa de hipoclorito de sódio (0,02%) em todas as cepas testadas.

No entanto, em estudos realizados com bactérias gram negativas percebe-se uma menor eficácia se compararmos aos obtidos com os isolados de *Y. lipolytica* no presente estudo utilizando-se sanitizante a base de cloro, onde a curva de morte com hipoclorito de sódio (0,02%) demonstrou ser necessário em média 83 minutos para ser eficaz (Sukplang & Thongmee, 2014) e 60 minutos se for empregado o hipoclorito de sódio (0,05%) (Mazolla et al., 2006). Para Machado (2007), os resultados obtidos na concentração de 1% de hipoclorito de sódio com cepas de *Salmonella enteritidis* constatou sobrevivência em até 15 minutos de contato com o sanitizante, enquanto que os demais sobreviveram por apenas 5 minutos.

Utilizando igualmente o hipoclorito de sódio a 200ppm com cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, os resultados apresentados por Sukplang & Thongmee (2014) demonstraram que o tempo de morte para esse micro-organismo foi mais longo, ou seja, foram necessários 58 minutos a mais que nos demais sanitizantes testados.

Groenewald et al (2014) relatam que, devido as suas atividades lipolíticas e proteolíticas, a *Y. lipolytica* tem sido amplamente utilizado na maturação ou contribuindo para as características organolépticas. Mas também promove a deterioração em alguns tipos de queijos. Estes efeitos de alteração na qualidade envolvem o sabor fora do padrão, textura indesejável, escurecimento na superfície do queijo e a contribuição da formação de aminas

biogênicas que decompõem o produto final.

6. CONCLUSÕES

- Os seis isolados de *Y. lipolytica* de queijo do tipo colonial testados neste estudo demonstraram resultados significativos em relação à capacidade de aderência aos materiais compostos de polipropileno;

- Os detergentes neutro e alcalino e o hipoclorito de sódio em testes com concentrações indicadas nos POP das indústrias do queijo colonial não foram capazes de inativar todas as células aderidas dos isolados de *Y. lipolytica*;

- Nas condições avaliadas, o corpo de prova “forma” composto de polipropileno foi mais resistente para o isolado QU16;

- Os isolados de *Y. lipolítica* trabalhados neste estudo demonstraram capacidade hidrofílica e de produzir bioemulsificantes;

- Os resultados obtidos neste estudo podem impactar na produção do queijo tipo colonial, alterando suas propriedades organolépticas ou melhorando o seu tempo de maturação, sendo estas alterações já identificados com outros tipos de queijos.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, a espécie *Y. lipolytica* precisa ser investigada através de um estudo mais detalhado relacionado com a produção do queijo colonial, seja na área de *shelf-life* quanto na qualidade assegurada do produto final. Para esta finalidade sugerem-se as seguintes ações:

Testar a formação de biofilmes nas superfícies de outros tipos de materiais utilizados na produção do queijo colonial como aço inoxidável, borracha, etc;

Realizar teste de formação de biofilme com cepas de *Y. lipolytica*, juntamente com mistura dos micro-organismos já identificados na produção de queijo colonial para avaliar se ocorre alteração do nível da formação de biofilme, forte, média ou fraca nos utensílios e materiais;

Avaliar o seu mecanismo de resistência aos sanitizantes quaternário de amônio, iodoformo e ácido peracético permitidos pela legislação e utilizados em indústria de alimentos;

Avaliar a ocorrência de alterações organolépticas nos queijos tipo colonial, tendo em vista que outros estudos demonstraram alterações favoráveis ou desfavoráveis em outros tipos de queijo.

8. REFERÊNCIAS

ABREU, C. S.; Lourenço, F. R. and Pinto, T. J. A. (2011) The efficacy and stability of five sanitizing agents challenged with reference microorganisms and clean area isolates. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. v.32, p. 201 – 209, 2011.

AMARAL, P. F. F.; Silva, J. M.; Lehocky, M.; Barros-Timmons, A. M. V.; Coelho, M. A. Z.; Marrucho, I. M. and Coutinho, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**. v. 41, p.1894 – 1898, 2006.

ANDRADE, Nélio José de. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.

APACO - Associação dos Pequenos Agricultores do Oeste Catarinense. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DE HIGIENIZAÇÃO [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por apaco@yahoo.com.br em 26 jun. 2014.

AZEVEDO, Nuno F.; CERCA, Nuno. **Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria**. Porto: Publindústria, 2012. 398p.

BACHMANN, Joerg et al. Development and application of a new sessile drop contact angle method to assess soil water repellency. **Journal of Hydrology, Hannover**. v. 231-232, p. 66 – 75, 2000.

BALD, Júlio André; VICENZI, Angélica; GERMANI, Adriano; LEHN, Daniel Neutzing; SOUZA, Claucia Fernanda Volken de. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzida no Vale do Taquari, RS. **Revista Jovens Pesquisadores**. v. 4, p. 90 – 99, 2014.

BARROS, Hilda Duval; ZAMITH, Helena Pereira da Silva; BAZILIO, Fábio Silvestre; CARVALHO, Lucia Jaeger; ABRANTES, Shirley de Mello Pereira. Identification of fatty foods with contamination possibilities by plasticizers when stored in PVC film packaging. **Food Science and Technology**. v. 31, p.547-552, 2011.

BAYOUMI, M. A.; KAMAL, R. M.; ABD, El Aal SF.; Awad, EL. Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. **International Journal Food Microbiology**. v. 158, p.225-231, 2012.

BELTRAME, Cezar A.; Martelo, Eduarda B.; Mesquita, Juliana Barbosa; Steffens, Clarice; Toniazzo, Geciane; Valduga, Eunice and Casian, Rogério L. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to cutting board surfaces and removal by different sanitizers. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**. v.10, p.41 – 47, 2014.

BERGAMO, V. Z. Donato D. K.; Dalla Lana, D. F.; Ortega, G. G.; Schrekker, H. S. and Fuentefria A. M. Imidazolium salt as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology** . v.60, p. 66 – 71, 2014.

BISOGNIN, Ramiro Pereira. **Análises do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Programa de pós-graduação em tecnologia ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, 2012. Disponível em: <http://www.unisc.br/portal/upload/com_arquivo/dissertacao_final_ramiro.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2015.

BRASIL. Instrução Normativa n. 30 de 26 Junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: [Brasília], [2001]. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2194>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Brasília, 1980. 116 p. Disponível: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2015.

BRASIL. Portaria n. 326, de 30 Julho de 1997. Aprovar o Regulamento Técnico; “Condições Higiênicos-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde: [Brasília], [1997]. Disponível em: <<http://www.mds.gov.br/acesso-a-informacao/legislacao/segurancaalimentar/portarias/1997/Portaria,P20Anvisa,P20no,P20326.97.pdf.pagespeed.ce.g4auS5a1uL.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

BRASIL. Resolução – RDC n. 14, de 28 fevereiro de 2007. Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana: âmbito do MERCOSUL através da Resolução GMC nº 50/06, que consta no anexo à presente Resolução. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária: [Brasília], [2007]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fdded>>

4db/RDC+14_2007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 mai. 2015.

BRISOLARI, André. **Estudo da molhabilidade em madeiras tropicais ou de reflorestamento por medidas de ângulo de contato e de permeabilidade**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais) – Instituto de Física de São Carlos/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-17062009-145256/pt-br.php>>. Acesso em 18 mar. 2015.

BRUGNONI, Lorena Inés; Lozano, Jorge Enrique and Cubitto, Maria Amelia. Efficacy of sodium hypochlorite and quaternary ammonium compounds on Yeasts isolated from apple juice. **Journal of Food Process Engineering**. v. 35, p. 104 – 119, 2012.

BYUN, Myung Woo; KIM, Jang Ho; KIM, Dong Ho; KIM, Hyun Ju; JO, Cheorun. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. **Food Microbiology**. v.24, p.544-548, 2007.

CAPPITELLI, F.; Polo, A.; Villa F. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. **Food Engineering Reviews**. v.6, p.29 – 42, 2014.

CARREIRA, Alexandra; Ferreira, Luisa, M.; Loureiro, Virgilio. Brown Pigments Produced by *Yarrowia lipolytica* Result from Extracellular Accumulation of Homogentisic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p. 3463-3468, 2001.

CHEESE factory illustration. Dreamstime. 2015. Disponível em:<<http://www.dreamstime.com/stock-images-cheese-factory-illustration-image28552374>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

COELHO, M.A.Z.; AMARAL, P.F.F; BELO, I. *Yarrowia lipolytica* an industrial workhorse. Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas. (Ed.), **Formatex**, 2010.

COIMBRA, C. D.; Rufino, R. D.; Tuna, J. M. and Sarubbo L. A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**. v.58, p.245 – 251, 2009.

COUTINHO, Joana Oliveira Pinto Azeredo. **Seleção de bactérias com o potencial de de-emulsificação de efluentes industriais emulsionados**. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009. Disponível em: <

http://150.164.26.190/diss_defesas_detalhes.php?tipo=eg&aluno=513>.

Acesso em: 15 mar. 2015.

DAHLAN, A. A.; Haveman C. W.; Ramage G.; Lopez-Ribot, J. L. and Redding S. W. Sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate, and commercial denture cleansers as disinfecting agents against *Candida albicans*: An in vitro comparison study. **General Dentistry**. v.59, p.224 – 229, 2011.

DORES, Milene Therezinha das; FERREIRA, Célia Lucia de Luces Fortes. **Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios**. Revista Brasileira de Agropécuaia Sustentável. v.2, p.26-34, 2012.

DUCAN, Timothy V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.363, p.1-24, 2011.

DUSANE, Devendra H.; Dam, Sushovan; Nancharaiah; Yarlagaadda V.; Kumar, Ameeta Ravi; Venugopalan, Vayalam P.; and Zinjar, Smita S. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. **Aquatic Biosystems**. v.8, p.1 – 17, 2012.

ELANO, Rachel Raios; KITAGAWA, T.; BARI, M.L.; KAWASAKI, S.; INATSU, Y. Comparison of the effectiveness of acidified sodium chlorite and sodium hypochlorite in reducing *Escherichia coli*. **FoodBorne Pathogens and Disease**. v.7, p.1481-1489, 2010.

FAVA, L. W.; HERNANDES, J. F.; PINTO, A. T. and SCHMIDT, V. Characteristics of colonial hand-made cheese sold in an agricultural show. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.40, p. 1084, 2012.

FELIPETTO, Claudia Kozen; FIGUEIREDO, Jussara Elaine Sabado; VALLANDRO, Marcelo Jostmeier; BRITTO, Maria José; ALMEIDA, Susete Lobo Saarde. **Queijo Colonial**. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/file/Cap12_Queijo_Colonial_Rio_Grande_do_Sul_Guias_para_gerenciamento_riscos_sanitarios_em_alimentos.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2014.

FLACH, Juliana; Grzybowski, Valeska; Toniazzi, Geciane and Corção, Gertrudes. (2014) Adhesion and production of degrading enzyme by bacterial isolated from biofilm in raw milk cooling tanks. **Food Science and Technology**. v. p.34, 571 – 576, 2014.

FLAUSINO, Juliana Silvério; Soares, Priscilla Barbosa Ferreira; Carvalho, Valessa Florindo; Magalhães, Denildo; Silva, Washington Martins da; Costa, Henara Lillian; Soares, Carlos José. Biofilm formation on different materials for tooth restoration: analysis of surface characteristics. **Journal of Materials Science**. v.49, p.6820-6829, 2014.

FLORES, C.L.; MARTINEZ-COSTA, O.H.; SÁNCHEZ, V.; GANCEDO, C. ARAGÓN, J.J. The dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* possesses an atypical phosphofructokinase: characterization of the enzyme and its encoding gene. **Microbiology**. v.151, p.1465-1474, 2005.

FONTES, G. C.; Ramos, N. M.; Amaral, P. F. F.; Nele, M. and Coelho, M. A. Z. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.29, p.483 – 493, 2012.

FONTES, G.C.; RAMOS, N.M.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Engineering**. v29, p.438-449, 2012.

FRACASSO, Roberto; PFÜLLER, Ernane Ervino. **Processamento do leite para a fabricação do queijo na indústria de laticínios Camozzato Ltda, Sananduva-RS**. RAMVI, Getúlio Vargas. v.1, 2014. Disponível em: <http://www.ideau.com.br/getulio/restrito/upload/revistasartigos/217_1.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2014.

GALINARI, E.; da Nobrega, J. E.; de Andrade, N. J. and de Lucas Fortes Ferreira, C. L. Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.45, p.713 – 720, 2014.

GALLARDO-MORENO A.M., Gonzalez-Martin M.L., Perez-Giraldo C., Bruque J.M., Gomez-Garcia A.C. The measurement temperature: An important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. **J Colloid Interface Sci**. v. 271, p.351 – 358, 2004.

GARDINI, F.; Tofalo, R.; Belletti, N.; Lucci, L.; Suzzi, G.; Torriani, S.; Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. **Food Microbiology**, v. 23, p.641-648, 2006.

GIL, Maria J.; SELMA, Maria V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, Francisco; ALLENDE, Ana. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal Food Microbiology**. v.134, p.37-45, 2009.

GOLE, Anand; Dixit, Vaishali; Lala, Neeta; Sainkar, S. R.; Panti, Aditi; Sastry, Murali. Patterned assembly of *Yarrowia lipolytica* yeast cells onto thermally evaporated octadecylamine films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 25, p.363 – 368, 2002.

GOODMANN, D. The “Turn Quality” and Alternative Food Practices: Reflections and Agenda. **Journal of Rural Studies**, v. 19, p.1 – 7, 2003.

GRACIOLI, Felipe; LEHN, Daniel Neutzling; SOUZA, Cláudia Fernanda Volken. Análise comparativa de custo e rendimento da fabricação de queijo tipo camembert e queijo colonial de pequena escala. **Revista Destaque Acadêmicos**. v.5 – Cetec/Univates, 2013.

GRAM, Lone; BAGGE-RAVN, Dorthe; WG, Yin Youce; GYMOESE, Pernilli; VOGEL, Birte Fonnesbech. Influence of food sailing matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attired *Listeria monocytogenes*. **Food Control**. v.18, p.1165-1171, 2007.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; VAN-DIJCK, P.W.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Review Microbiology**. v.40, p.187-206, 2013.

GROENEWALD, Marizeth; BOEKHOUT, Teun; NEUVÉGLISE, Celice; GAILLARDIN, Claude; DIJCK, Piet W. M. Van; WYSS, Markes. *Yarrowia lipolytica*: safety anessment of oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews in Microbiology**. v.40, p.187 – 206, 2014.

HOUDT, R. Van and Michiels C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**. v.109, p.1117 – 1131, 2009.

IKNUR, Dag; Yasemin, Oz and Nuri, Kiraz. Effect of disinfectants on biofilm development by five species of *Candida*. **African Journal of Microbiology Research**. v.6, p.2380 – 2386, 2012.

JAGTAP, Tushar U.; MANDAVE, Hemant A. Machining of Plastics: A Review. **International Journal of Engineering Research and General Science**. v.3, p.577-581, 2015.

KASNOWSKI, Maria Carmela; MATILHA, Sanira Pirola Santos; OLIVEIRA, Luiz Antônio Trindade; FRANCO, Robson Maia. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. p. 1-23, 2010.

KHOPADE, Abhijit et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardopsis* sp. B4. **Desalination**. v. 285, p.198 – 204, 2012.

LANCIOTTI, Rosalba, VANNINI, Lucia; LOPEZ, Clemencia Chaves; GOBBETTI, Marco; GUERZONI, Elisabetta. Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. **International Journal of Dairy Technology**. v.58, p. 89 – 99, 2005.

LIMA, J.C; ANDRADE, N. J.; SOARES, N.F.F; FERREIRA, S.O.; FERNANDES, P.E.; CARVALHO, C.C.P.; LOPES, J.P.; MARTINS, J.F.L. The hydrophobicity and roughness of a nasoenteral tube surface influences the adhesion of a multi-drug resistant strain of *Staphylococcus Aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**.v.42, P.489-498, 2011.

LIUA, Shao-Quan; Tsaob, Marlene. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 131, p. 280-282, 2009.

LOCATELLI, Claudete Inês et al. Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. Porto Alegre, v.67, p.241 – 248, 2004.

MACHADO, Tais Raquel Marcon. **Avaliação da aderência ao aço inoxidável e ao polietileno por três sorovares de *Salmonella* e da capacidade de desinfecção dessas superfícies**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/32453>>. Acesso em: 25 mai. 2015.

MANSOUR, S.; BECKERINCH, J.M.; BONNARME, P. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, p.6505-6512, 2008.

MATTANNA, Paula; Rosa, Priscila Dallé; Poli, Jandora; Richards, Neila S. P.; Deboit, Tatiane Caroline; Scrofemeker, Maria Lúcia; Pastore, Ana Paula W.; Corção, Gertrudes; Bertoldi, Fabiano C; Deschamps, Francisco C.; Valente, Patricia. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. **Revista Brasileira de Biociências**. v.12, p.121 – 126, 2014.

MAZOLLA, Priscila G.; Martins, Alzira M. S. and Penna, Thereza C. V. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. **BMC Infectious Diseases**. v.131, p.1 – 11, 2006.

MERINA, Tiphaine; Goddard, Julie M. Advances in Nonfouling Materials: Perspectives for the Food Industry. **Journal of Agricultura Food Chemistry**. v.60, p. 2943 – 2957, 2012.

MOGOTSI, Lerato; Smidt, Olga de; Venter, Pierre and Groenewald, Willem. Influence of sanitizer on the lipopolysaccharide toxicity of *Escherichia coli* strains cultivated in the presence of *Zygosaccharomyces bailii*. **The Scientific World Journal**. p.1 – 6, 2014.

MONTEL, Marie-Christine; Buchin, Solange; Mallet, Adrien; Delbes-Paus, Céline; Vuitton, Dominique A.; Desmasures, Nathaline and Berthier, Françoise. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**. v.117, p.136 – 154, 2014.

MORETRO, Trond; HEIR, Even; NESSE, Live L.; VESTBY, Lene K.; LANGSRUD, Solveig. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**. v.45, p.532-544, 2012.

NASSU, Renata Tieko; MACEDO, Benemária Araújo; LIMA, Márcia Helena Portela. **Queijo de coalho**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11883/2/00077390.pdf>>. Acesso: 14 nov. 2014.

NICAUD, Jean-Marc. *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**. v.29, p.409-418, 2012.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; BADARO, A. C. L.; TONIAL, I. B. Análise da composição Físico-Química, conteúdo lipídico e qualidade higiênico-sanitária de queijos coloniais. In: **CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, 27, 2010, Juiz de Fora. Anais do XXVII Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2010.

OULAHAL, Nadia; BRICE, Wilfried; MARTIAL, Adele; DEGRAEVE, Pascal. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**. v.19, p. 178-185, 2008.

PATAMAPORN, Sukplang; Acharawan, Thongmee. In vitro kill-time test of disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* recovered from water associated with hemodialysis applications. **Rangsit Journal of Arts and Sciences**. v. 4, p. 39 – 45, 2014.

PETERSEN, P.J.; Labthavikul, P.; Jones, C. H.; Bradford, P. A. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal Antimicrobial Chemother**. v.57, p. 573 – 576, 2006.

PITT, Fernando Darci; Boing, Denis; Barros, Antônio André Chivanga. Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renonáveis. **Revista Unifebe**. v.9, p. 1-18, 2011.

QUEIROZ, V.M.; ANDRADE, H.V. Importância das ferramentas de qualidade BPF/APPCC no controle dos perigos nos alimentos em laticínios. V.1, p.1-7, 2010.

RASBAND, Wayne. **IMAGE J** versão 1.49m (Java 1.60_24). National Institutes of Health, USA. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij> . Acesso em: 21 jan. 2015.

RENDUELS, Olaya; GHIGO, Jean-Marc. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **Microbiology reviews**. v.36, p.972-989, 2012.

ROSA, Hemerson Silva da; Camargo, Vanessa Brum de; Camargo, Graziela; Garcia, Cássia V.; Fuentefria, Alexandre M.; Mendez, Andreas S.L. (2015) Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R.E. Fries (Malvaceae): Chemical composition by LC–ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity. **Food Chemistry**.

v.182, p.193 – 199, 2015.

ROSSI, Ana Claudia Ribeiro; PORTO, Ernani. **A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilme.** Artigo técnico. SBCC. 2009. Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/revistas_pdf/ed39/39-Import_Higieniz.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2015.

SANTOS JUNIOR, Alexandre C.; Salimena, Alessandra P. Sant'Anna; Cardoso, Maria das Graças; Alves, Eduardo and Piccoli, Roberta H. Action of sanitizers on *Staphylococcus aureus* biofilm on stainless steel and polypropylene surfaces. **African Journal Microbiology Research**. v. 36, p. 3347 – 3353, 2014.

SARUBBO, Leonie Asfora. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.9, p. 400 – 4006, 2006.

SHI, Xianming; Zhu, Xinna. Biofilm formation and a food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**. v.20, p.407-413, 2009.

SHIN, J. H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J Clin Microbiol**, v.40, p. 1244-1248, 2002.

SIMÕES, Manuel; SIMÕES, Lucia C.; VIEIRA, Maria J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**. v.43, p.573-583, 2010.

SINDE, E.; Carballo, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**. v. 17, p. 439 – 447, 2000.

SINGLA, Richu; GOEL, Honey; GANGULI, Abhijit. Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.118, p. 34-40, 2014.

SKODOWSKA, Aleksandra et al. The method of contact angle measurements and estimation of work adhesion in bioleaching of metals. **Biological Procedures Online**. v.1, p. 114 – 121, 1999.

SOKUNROTANAK, Srey; IQBAL, Kabir Jahid; SANG-DO, Há. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**. v.31, p. 572 – 585, 2013.

SOUZA, F. A. S. D.; Salgueiro, A. A. and Albuquerque C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 29, p. 61 – 67, 2014.

SREY, Sokunrotanak; JAHID, Iqbal Kabir; HA, Sang-Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**. v.31, p.572-585, 2013.

STATISTIC SPSS 22.0 for Windows 2006, version 22: **SPSS Statistics software**. [S.I.]: comercial IMB 2014. Conjunto de programas. 1 CD-ROM.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891-899, 2007.

SUGANTHINI, S. K.; Chandrasekar, P.H.; Alangaden, G. J.; Manavathu, E. K. Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against *Aspergillus fumigatus* in vitro. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. v.60, p. 369 – 373, 2008.

SUKPLANG, Patamaporn and Thongmee, Acharawan. In vitro kill-time test of disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* recovered from water associated with hemodialysis applications. **Rangsit Journal of Arts and Sciences**. v.4, p.39 – 45, 2014.

SUZZI, G; LANORTE, M. T.; GALGANO, F.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LANCIOTTI, R. GUERZONI, M. E. Proteolytic, lipolytica and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v.69, p. 69 – 77, 2001.

SZABO, Roman; STOFANIKOVÁ, Veronika. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Letters**. v.206, p.45-50, 2002.

TARIFA, M. C.; Brugnoli, L. I.; Lozano, J.E. Role of hydrophobicity in adhesion of wild yeast isolated from the ultrafiltration membranes of an apple juice processing plant. **Biofouling**. v. 29, p. 841 – 853, 2013.

TELLES, Estela Maraschini. **A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão**. 2011. Monografia (Especialização em Produção, Tecnologia, e Higiene de Alimentos de Origem Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/49297>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

THÉRAUD, M.; Bédouin Y.; Guiguen C. and Gangneux, J. P. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **Journal of Medical Microbiology**. v.53, p.1013 – 1018, 2004.

TONDO, E. C.; Machado T. R.; Malheiros, P. da S.; Padrão, D. K.; Carvalho, A. L. de and Brandelli A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p. 1027 – 1037, 2010.

TONG, W.; Wang, R.; Chai, D.; Li, Z.; Pei, F. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **International Journal Antimicrobial Agents**. v.28, p. 454 – 456, 2006.

WEBB, B. C.; Willcox, M. D.; Thomas, C. J.; Harty D. W. and Knox K. W. The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. **Oral Microbiology and Immunology**. v.53, p.1013 – 1018, 2007.

WEBER, H. *Yarrowia lipolytica*. The fungal genomics resource. Disponível em: <<http://genome.jgi.doe.gov/Yarli1/Yarli1.home.html>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

YOUSSEF, Noha H.; Duncan, Kathleen E.; Nagle, David P.; Savage, Kristen N.; Knapp, Roy M. and McInerney, Michael J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. v.56, p.339 – 347, 2004.

ZIGLIO, Analine Crespo. **Uso da capsaicina como preservante de madeiras ao ataque de fungo apodrecedor**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-16082010-143912/pt-br.php>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

ZINJARDE, Smita S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. **Food Chemistry**. v.152, p. 1 – 10, 2014.

Wyder, Marie-Therese; Bachmann, Hans-Peter; Puhán, Zdenko. Role of selected Yeast in Cheese Ripening: na evaluation in foil wrapped raclette cheese. **LWT- Food Science and Technology**. v. 32, p.333-343, 1999.