

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Jaqueline da Silva Rumão

**Modelagem da multiplicação de *Staphylococcus aureus* nas fases
planctônica e séssil em diferentes superfícies de contato**

Passo Fundo
2021

Jaqueline da Silva Rumão
(Tecnóloga em Alimentos)

**Modelagem da multiplicação de *Staphylococcus aureus* nas fases
planctônica e séssil em diferentes superfícies de contato**

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de Mestra em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientador: Christian Oliveira Reinehr
Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades
funcionais de alimentos

Passo Fundo

2021

CIP – Catalogação na Publicação

R936m Rumão, Jaqueline da Silva
Modelagem da multiplicação de *Staphylococcus aureus*
nas fases planctônica e sésil em diferentes superfícies de
contato / Jaqueline da Silva Rumão. – 2021.
58 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Christian Oliveira Reinehr.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Alimentos –
Contaminação. 3. Microbiologia industrial. I. Reinehr,
Christian Oliveira, orientador. II. Título.

CDU: 664

Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

“Modelagem da multiplicação de *Staphylococcus aureus* nas fases planctônica e séssil em diferentes superfícies de contato”

Elaborada por
Jaqueline da Silva Rumão

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

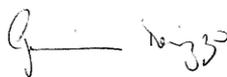
Comissão Examinadora



**Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**



Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF



Geciane Toniazco Backes, Dra., URI

**Passo Fundo, RS, Brasil
2021**

Dedico este trabalho para a minha família e meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da minha vida e por me fazer nunca desanimar e sempre acreditar que é necessário dar sempre o primeiro passo com fé acreditando na Sua bondade e misericórdia divina.

Aos meus pais amados Ana Helena e Manoel, por sempre acreditarem em mim e por serem os principais motivos para a minha motivação diária na busca e realização dos meus sonhos. Mamãe e papai, sem vocês eu não conseguiria ter chegado tão longe na minha carreira profissional, obrigada por terem me formado, educado e me trazerem tanta paz, calma, serenidade, confiança e o principal, por terem me ensinado o caminho da fé e da perseverança. Amo vocês mais que tudo!

Aos meus maninhos Ana Caroline e Mateus, por me amarem e cuidarem tão bem de mim mesmo de tão longe. Obrigada por sempre estarem disponíveis e presentes, vocês são meus tesouros preciosos.

Ao meu grande amor Matheus Ferreira, que acreditou em mim desde o primeiro encontro, me apoiando e torcendo para que eu alcançasse esse grande sonho. Obrigada por ser meu companheiro, amigo, incentivador, cúmplice e por me fazer tão feliz. Amo você!

Ao meu querido amigo Marcelo pelas suas orações e por sempre estar disponível a me ouvir. Aos meus amigos que o mestrado me deu a graça de poderem habitar meus dias e me acolherem com tanto carinho, Franciele Gotardo, Caroline Vicenzi, Ana Paula Silva, Stéfani Werlang e aos demais amigos do PPGCTA por quem eu tenho tanto afeto e carinho.

À minha amiga Thanise Dias, por ter me acolhido em sua vida e tornado meus dias mais alegres e cheios de luz. Por ter me ajudado em tantos momentos difíceis e por ter sido a minha amiga de todos os momentos durante esses dois anos que passamos no mestrado.

À coordenação do PPGCTA e todos os professores que tanto contribuíram no meu aprendizado. Ao meu orientador Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr, por confiar no meu trabalho, pela orientação e por todos os ensinamentos. Agradeço por sua total disponibilidade de sempre responder às minhas dúvidas.

À Universidade de Passo Fundo pela oportunidade de realizar meu mestrado e por ser essa referência em ensino e aprendizagem.

À CAPES pela concessão da bolsa Capes I, que me possibilitou a realização desse sonho de continuar na vida acadêmica durante esses dois anos de mestrado.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.

Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King

RESUMO

A qualidade e segurança dos alimentos são fatores importantes que precisam ser assegurados durante todas as etapas de produção alimentícia. O grande desafio no setor alimentício é o controle da multiplicação microbiana, pois os microrganismos buscam cada vez mais estratégias de sobrevivência aos diferentes agentes antimicrobianos presentes no ambiente. O *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos mais envolvidos em casos de contaminação nos alimentos, além disso, possui capacidade de se aderir aos equipamentos e superfícies industriais e formar biofilmes. Devido a essa preocupação, novas estratégias são tomadas para entender a dinâmica da multiplicação microbiana, e a microbiologia preditiva ganha cada vez mais espaço no ramo da microbiologia de alimentos. Diante disso, o objetivo do trabalho foi aplicar a microbiologia preditiva na multiplicação de *S. aureus* nas fases planctônica e séssil em diferentes superfícies de contato com alimentos. Para tanto, neste estudo foi usada a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 e as superfícies de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade utilizadas como corpo de prova. Para verificar a curva de multiplicação do *S. aureus* nas fases planctônica e séssil, foi usada uma temperatura de 15° C nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h. Em seguida, ocorreu a quantificação dos microrganismos nas formas planctônica e séssil. De acordo com os resultados, houve multiplicação de *S. aureus* na fase planctônica assim como a formação de biofilme em todas as superfícies de contato avaliadas, portanto, as curvas realizadas no ComBase por meio do DMFit mostram que houve um bom ajuste do modelo com relação a predição das células livres e de células aderidas aos substratos. As superfícies de polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade propiciaram uma adesão imediata do microrganismo aos substratos logo no tempo 0, enquanto nas superfícies de vidro e aço inoxidável essa adesão apenas teve início depois das 24 horas de adaptação. A microscopia eletrônica de varredura apresentou as arquiteturas estruturais do biofilme maduro, e confirmou a fixação bacteriana em todas as superfícies com o desenvolvimento do biofilme evidente em todas as esferas avaliadas no tempo de 168 horas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância obtendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre todas as superfícies estudadas. Diante disso, conclui-se que as predições realizadas no ComBase Predictor por meio do DMFit foram satisfatórias tanto para as células planctônicas como para as séssis, e de todas as superfícies as que apresentaram rápida adesão do *S. aureus* foram os polímeros. Portanto, o uso da microbiologia preditiva é uma estratégia no controle da multiplicação microbiana e formação do biofilme em superfícies da indústria de alimentos.

Palavras-chave: Curvas de crescimento. Planctônica. Séssil. *Staphylococcus aureus*. Superfícies. MEV.

ABSTRACT

Food quality and safety are important factors that need to be ensured during all stages of food production. The great challenge in the food sector is the control of microbial multiplication, as microorganisms increasingly seek survival strategies from the different antimicrobial agents present in the environment. *Staphylococcus aureus* is one of the microorganisms most involved in cases of food contamination, in addition, it can adhere to equipment and industrial surfaces and form biofilms. Due to this concern, new strategies are taken to understand the dynamics of microbial growth, and predictive microbiology is gaining more and more space in the field of food microbiology. Therefore, the aim of this work was to apply predictive microbiology in the growth of *S. aureus* in planktonic and sessile phases on different food contact surfaces. Therefore, in this study, the strain of *S. aureus* ATCC 25923 was used, and the surfaces of glass, stainless steel, polypropylene, high-density polyethylene, and low-density polyethylene were used as specimens. To verify the growth curve of *S. aureus* in the planktonic and sessile phases, a temperature of 15° C was used at times 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h and 168 h. Then, there was the quantification of microorganisms in planktonic and sessile forms. According to the results, there was growth of *S. aureus* in the planktonic phase as well as the formation of biofilm on all contact surfaces evaluated, therefore, the curves performed in ComBase by means of DMFit show that there was a good fit of the model with respect to the prediction of free cells and cells adhered to substrates. The surfaces of polypropylene, high density polyethylene and low-density polyethylene provided an immediate adhesion of the microorganism to the substrates at time 0, while on the glass and stainless-steel surfaces this adhesion only started after 24 hours of adaptation. Scanning electron microscopy showed the structural architectures of the mature biofilm and confirmed bacterial fixation on all surfaces with biofilm development evident on all spheres evaluated at a time of 168 hours. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% significance, obtaining a significant difference ($P < 0.05$) between all surfaces studied. Therefore, it is concluded that the predictions performed in the ComBase Predictor by means of DMFit were satisfactory for both planktonic and sessile cells, and from all surfaces that showed fast adhesion of *S. aureus* were the polymers. Therefore, the use of predictive microbiology is a strategy to control microbial multiplication and biofilm formation on surfaces in the food industry.

Keywords: Growth curves. Planktonic. Sessile. *Staphylococcus aureus*. Surfaces. SEM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios do desenvolvimento de biofilmes microbianos.....	16
Figura 2: Predição da multiplicação de <i>S. aureus</i> em células sésseis em superfície de vidro..	35
Figura 3: Predição da multiplicação de <i>S. aureus</i> em células sésseis em superfície de aço	36
Figura 4: Predição da multiplicação de <i>S. aureus</i> em células sésseis em superfície de polipropileno.....	36
Figura 5: Predição da multiplicação de <i>S. aureus</i> em células sésseis em superfície de polietileno de alta densidade.....	37
Figura 6: Predição da multiplicação de <i>S. aureus</i> em células sésseis em superfície de polietileno de baixa densidade.....	37
Figura 7: Predição da multiplicação de <i>S. aureus</i> em células planctônicas	38
Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por cepa padrão de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 a 15°C em superfícies de vidro limpo (A) e vidro com biofilme (B), aço inoxidável limpo (C) e aço inoxidável com biofilme (D). Ampliação 20.000 x.	42
Figura 9: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por cepa padrão de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 a 15°C em superfícies de polipropileno limpo (E) e PP com biofilme (F), polietileno de alta densidade limpo (G) e PAD com biofilme (H) e polietileno de baixa densidade limpo (I) e PBD com biofilme (J). Ampliação 20.000 x.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Predição da multiplicação em log do <i>S. aureus</i> ATCC 25923 em células planctônicas e em células sésseis nas superfícies de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade.	34
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 BIOFILMES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	16
2.1.1 Implicações da presença de biofilmes na indústria de alimentos.....	17
2.1.2 Adesão microbiana em superfícies de contato com alimentos.....	18
2.2 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	21
2.2.1 Biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.3 PREDIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA	23
2.3.1 Modelos preditivos.....	24
2.4 PREDIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	25
3 ARTIGO EXPERIMENTAL	27
MODELAGEM DA MULTIPLICAÇÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> NAS FASES PLANCTÔNICA E SÉSSIL EM DIFERENTES SUPERFÍCIES DE CONTATO	27
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1 Preparo do inóculo	29
3.2.2 Preparo dos corpos de provas.....	29
3.2.3 Multiplicação do <i>S. aureus</i>	29
3.2.4 Quantificação dos microrganismos nas formas planctônica e séssil.....	30
3.2.5 Caracterização das superfícies de contato	30
3.2.5.1 Determinação do diâmetro das esferas.....	30
3.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
3.2.6 Predição do crescimento microbiano	31
3.2.7 Tratamento dos dados.....	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.3.1 Multiplicação e quantificação dos microrganismos nas formas planctônica e séssil	
31	
3.3.2 Análise da microscopia eletrônica de varredura do biofilme de <i>S. aureus</i>	41
3.4 CONCLUSÃO	46

4 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE A – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SÉSSIL EM SUPERFÍCIES DE VIDRO, AÇO INOXIDÁVEL, POLIPROPILENO, POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE E POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE.....	56
APÊNDICE B - ARTIGO DE REVISÃO.....	57
 UMA ABORDAGEM DO USO DE MICROBIOLOGIA PREDITIVA PARA FORMAÇÃO DE BIOFILMES	57

1 INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos torna-se cada dia uma das principais preocupações dos setores alimentícios. Sua relevância é atribuída devido à busca constante dos consumidores por produtos de qualidade livres de contaminantes físicos, químicos e biológicos. Em meio a essa problemática, o principal foco da indústria e dos pesquisadores é o controle da disseminação microbiana, que são os tipos de contaminantes que causam mais danos na saúde pública em todo o mundo.

Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil entre os anos de 2009 e 2018 ocorreram 6.809 casos de surtos, 634.568 expostos, 120.584 doentes, 16.632 hospitalizações e 99 óbitos por doenças veiculadas por alimentos (DVA) (BRASIL, 2018). Dessas DVAs destaca-se as toxinfecções causadas pelo patógeno *Staphylococcus aureus*, o terceiro colocado na distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos notificados nesse período.

Os alimentos podem ser expostos a contaminação em todas as etapas do processo, desde a produção até o consumo final (OMS, 2019). E o *S. aureus* é um dos principais contaminantes na indústria de alimentos em decorrência da facilidade de adaptação às diversas condições ambientais que envolvem fatores intrínsecos e extrínsecos. Esse patógeno possui a capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas da indústria como uma forma de sobrevivência aos ataques ambientais (BRIDIER et al., 2015). As principais superfícies estudadas na adesão microbiana são polietileno, aço inoxidável, vidro e polipropileno, pois os patógenos alimentares interagem com essas superfícies iniciando o crescimento celular e posteriormente levando à formação do biofilme (CHA; SON; RYU, 2019).

A contaminação por células sésseis tem chamado a atenção como uma das principais preocupações nas indústrias produtoras de alimentos (XU et al., 2019), devido ao difícil controle dessas células aderidas quando comparadas às células planctônicas. Devido essa preocupação, novas abordagens são tomadas para entender a dinâmica da formação dessas comunidades organizadas, e o estudo da predição microbiana ganha cada vez mais espaço no ramo da microbiologia preditiva de alimentos.

A microbiologia preditiva é uma subárea da microbiologia tradicional que utiliza modelagens matemáticas que descrevem a dinâmica da multiplicação e inativação dos microrganismos, além da formação de biofilme. Embora existam vários modelos preditivos que são usados para diversos microrganismos na sua forma livre, ainda são poucos os estudos que apontam esses modelos preditivos para a formação do biofilme. Tendo em vista esse desafio na busca de novas abordagens para a prevenção da contaminação microbiana e melhoria na segurança

e qualidade dos alimentos, o objetivo do estudo foi aplicar a microbiologia preditiva na multiplicação de *S. aureus* em superfícies de contato com alimentos.

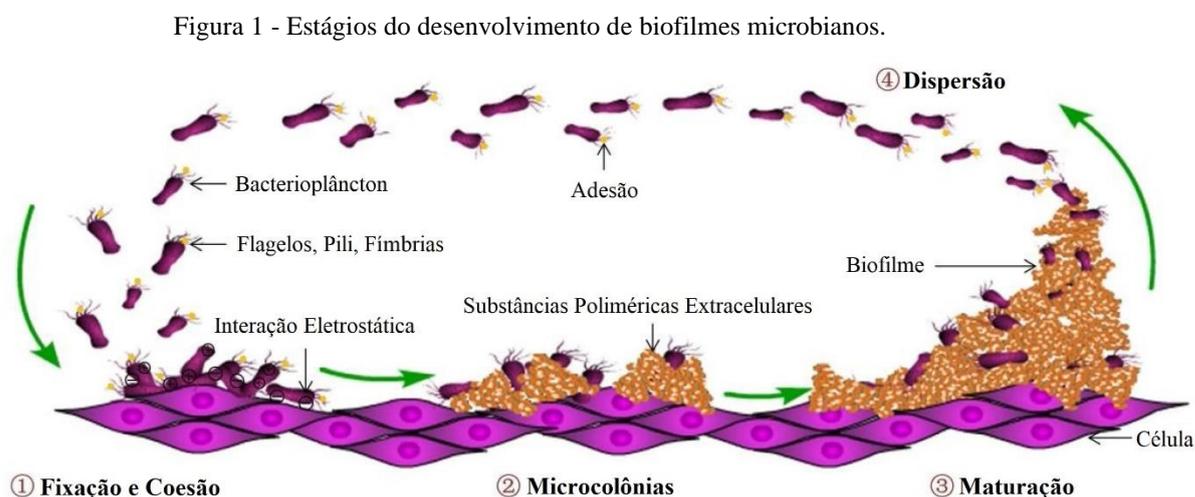
O estudo está inserido na linha de pesquisa “Qualidade e propriedades funcionais de alimentos” e no projeto de pesquisa “Avaliação e controle de qualidade de alimentos” do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOFILMES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Os biofilmes são definidos como uma comunidade sésil de microrganismos que possuem uma tendência natural de se fixarem em superfícies úmidas, de se multiplicarem e de serem envolvidos a uma matriz extracelular de substâncias poliméricas extracelulares (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). A matriz extracelular é composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que são compostos essenciais para a união das bactérias e formação de um microambiente capaz de proteger esses seres dos ataques antimicrobianos e ambientais (GUTIÉRREZ, 2016).

A formação de biofilme é um processo dinâmico e complexo que de acordo com diferentes pesquisadores consiste em algumas etapas como: contato inicial, fixação à superfície e logo seguindo com a formação da microcolônia, desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme, maturação e dispersão de acordo com a Figura 1. Após essa fixação bem-sucedida, as bactérias começam a proliferação e construção da matriz extracelular que serve de proteção contra os agentes antimicrobianos presentes no ambiente (JAMAL et al., 2018; IÑIGUEZ-MORENO, 2019).



Fonte: Zhang et al. (2020)

As comunidades sésseis possuem um modelo de vida que se beneficiam de uma série de vantagens em relação às planctônicas. Devido a capacidade da matriz extracelular em concentrar nutrientes do ambiente, eles possuem mais resistência, e o uso de antimicrobianos pode ser ineficaz para eliminar essas células bacterianas das superfícies industriais devido a presença de substâncias poliméricas presentes na matriz extracelular do biofilme (ARCHER et al., 2011).

Estudos apontam que a formação do biofilme contribui para a sobrevivência dos microrganismos presentes nas superfícies de processamento de alimentos, causando uma grande preocupação para a indústria devido aos problemas sanitários e tecnológicos (ORHAN-YANIKAN, 2019).

Os microrganismos formadores de biofilme chegam à indústria de alimentos através de várias fontes, como ar, água, alimentos crus e até mesmo através dos manipuladores que são fontes de contaminação, especialmente de *S. aureus* que tem como capacidade a adesão em superfícies e equipamentos industriais, obstruindo filtros, bloqueando instalações e conseqüentemente ocasionando a formação das comunidades sob diferentes condições ambientais presentes nas indústrias de processamento de alimentos (GUTIÉRREZ, 2016). Essas comunidades de biofilmes contaminam alimentos durante todas as etapas de manipulação, assim, causam um problema na indústria por serem considerados uma fonte de contaminação cruzada de bactérias.

A indústria de alimentos passa por graves problemas em relação a rápida deterioração de alimentos ocasionada por contaminação microbiana. Embora várias técnicas venham sendo implantadas para a redução desse problema, as perdas por deterioração ainda são de difícil controle, pois os microrganismos estão cada vez mais resistentes aos tratamentos empregados para a inativação, devido a rápida mutação genética e formação do biofilme (AL-SHABIB, 2017).

A indústria de processamento de alimentos apresenta ambiente favorável para a formação de comunidades de biofilmes devido às condições ideais presentes nas superfícies e equipamentos. O alimento pode ser contaminado em qualquer estágio do processo de produção até o consumo (OMS, 2019), e várias bactérias deteriorantes e patogênicas estão envolvidas nesse processo, causando surtos de origem alimentar como infecções e intoxicações e, conseqüentemente tornando uma implicação para a indústria.

2.1.1 Implicações da presença de biofilmes na indústria de alimentos

As falhas durante os processos de higienização permitem que resíduos que se encontram aderidos às superfícies e equipamentos industriais contribuam como um potencial fonte de contaminação. Essa contaminação ocorre a partir da formação de comunidades de biofilmes durante o processo de produção dos alimentos, implicando diretamente na qualidade dos produtos devido a rápida degradação. A degradação dos alimentos por biofilme causa implicações notáveis para a indústria, resultando em perdas econômicas além da própria segurança dos alimentos. Portanto, a principal prioridade das indústrias diante desse cenário é controlar essa disseminação durante os processos tecnológicos (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010).

A formação de biofilme em indústrias processadoras de alimentos é um assunto bem documentado (CARPENTIER; CERF, 1993; MOORMEIER; BAYLES, 2017; LEROY et al.,

2020; BAI et al., 2021), e a grande maioria dos problemas que preocupa a indústria é que essas comunidades causam contaminação bacteriana devido às diversas condições ambientais existentes durante a produção dos alimentos. Na indústria de laticínios por exemplo, a formação de biofilme muitas vezes pode ser atribuída às falhas nos processos de higiene das superfícies e equipamentos, tanto durante a ordenha como no beneficiamento dos produtos lácteos (LATORRE et al., 2010). E os principais fatores que influenciam a multiplicação microbiana e posteriormente a formação do biofilme no leite é devido ao seu pH neutro e os muitos nutrientes existentes na sua composição (MOGHA et al., 2014).

A multiplicação de agentes microbianos em superfícies e equipamentos industriais é a principal causa de contaminação seguida de perdas de produtos tanto in natura como processados. No caso do leite, no processo de pasteurização ocorre a eliminação da maioria dos microrganismos deteriorantes e patogênicos, no entanto, o produto pode ser recontaminado por bactérias que se aderem aos equipamentos de processamento sob diversas condições nas etapas do processo (FRATAMICO et al., 2009).

A capacidade das bactérias patogênicas de se fixarem nas superfícies de contato com os alimentos torna um potencial risco para a saúde humana, pelo fato desses agentes serem os principais causadores de surtos de origem alimentar como as infecções e toxifecções alimentares. Existem muitos patógenos envolvidos em casos de surtos alimentares, e grande número de mortalidade em todo o mundo envolve esses agentes. Esses patógenos são potenciais formadores de biofilmes, o que tem despertado o interesse de muitos pesquisadores responsáveis pela segurança dos alimentos, assim como das indústrias de alimentos (ZHAO et al., 2017).

Para a indústria, é importante a identificação dos fatores envolvidos na formação do biofilme por microrganismos patogênicos, para assim ser tomado o devido controle para combater a multiplicação e posteriormente formação dessas comunidades que são mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que a bactéria na sua forma planctônica (CICCIO et al., 2015).

A fixação microbiana nas superfícies de contato com alimentos é um processo dinâmico que envolve vários fatores importantes no processo de formação do biofilme, esses fatores incluem as etapas de adesão que serão influenciadas pelas características e propriedades de cada superfície avaliada.

2.1.2 Adesão microbiana em superfícies de contato com alimentos

A capacidade de formação do biofilme durante a produção de alimentos depende de muitas condições e de diferentes tipos de substratos como vidro, aço inoxidável, polipropileno e polietileno que são frequentemente utilizados como meio de fixação pelos microrganismos. A

adesão microbiana nessas superfícies acontece como um passo inicial a partir da colonização da bactéria até a etapa de formação da estrutura das células sésseis. Além disso, interações polares entre as duas superfícies, tanto a superfície dos microrganismos como a superfície do substrato são elementos que irão influenciar diretamente na adesão microbiana (KOUBALI et al., 2021).

Além das interações polares existem outros mecanismos de adesão celular, sendo eles classificados como complexos, pois cada superfície celular e superfície do substrato age de forma diferente de acordo com as diversas condições físico-químicas de cada superfície. Esses mecanismos desempenham um papel importante no fenômeno de adesão microbiana, pois eles se relacionam com a estabilidade do biofilme que ocorre por meio das interações Lifshitz-van der Waals, eletrostáticas e ácido-base de Lewis que existem para explicar que cada superfície e material aderente tem características de carga elétrica, hidrofobicidade e condições ambientais diferentes. Portanto, a influência de vários fatores que envolvem a composição química, carga eletrostática, propriedades mecânicas e topografia causam interações entre as superfícies e as bactérias envolvidas (ARAÚJO et al, 2010; GRAHAM; CADY, 2014).

É importante ressaltar também que as bactérias possuem capacidade de modificar a composição de sua superfície celular durante o processo de multiplicação de acordo com a composição presente no meio em que elas se encontram, causando assim mais um mecanismo que influenciará na aderência dos substratos. Outro aspecto importante que deve ser levado em consideração durante o fenômeno de adesão celular é a classificação das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, onde a principal diferença entre elas está relacionada com a parede celular. A arquitetura da parede celular das Gram-positivas é constituída por uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto nas Gram-negativas essa camada de peptidoglicano é mais fina. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) nas Gram-negativas pode influenciar na hidrofobicidade das células bacterianas, pois a presença de LPS pode tornar a célula da bactéria mais hidrofílica enquanto a perda de LPS pode deixar a célula mais hidrofóbica (ARAÚJO et al, 2010). Portanto, são muitos os fatores e mudanças ambientais que contribuem para que ocorra mudanças nas propriedades de cada célula bacteriana que influenciará diretamente na adesão microbiana aos diferentes substratos.

O vidro é um material amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, sendo reconhecido como um dos materiais para embalagens mais seguros e confiáveis na proteção dos produtos alimentícios (MAHINKA; MILLER; VAUGHN, 2013). Além da utilização nas embalagens, o vidro também é usado em utensílios industriais de processamento de alimentos, e por ser um material caracterizado como hidrofílico apresenta propriedades físico-químicas que podem influenciar na adesão das células à superfície.

O aço inoxidável é o material mais utilizado nas indústrias de alimentos, sua utilização é influenciada pelo grau que essa superfície possui, tendo em vista que, entre os mais utilizados estão os chamados grupo 18-8 que apresentam na composição 18% de cromo e 8% de níquel. Para a indústria de alimentos o grau mais utilizado é o 304 com polimento 4, o que contribui com as características de ser resistente ao processo de corrosão causado por muitos tipos de alimentos, detergentes e sanitizantes, além de ser impermeável, conter presença de superfícies lisas, ser resistente a altas temperaturas e de fácil higienização. Essa resistência do aço inoxidável se relaciona com uma película de proteção composto por cromo que é formada quando o material entra em contato com o oxigênio (ANDRADE, 2008; AZEVEDO; CERCA, 2012). Pelo fato dessa grande utilização do aço inoxidável na indústria, uma variedade de estudos apresentou a capacidade de formação de biofilme nesse tipo de superfície (ABEYSUNDARA et al., 2018; MORAES et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; SOUZA et al., 2014). O aço inoxidável é amplamente utilizado em superfícies de dispositivos da indústria alimentícia devido à sua estabilidade físico-química e alta resistência à corrosão. No entanto, esse material possui alta energia de superfície livre, resultando em propriedades hidrofílicas que geralmente favorecem a fixação de células bacterianas e a formação de biofilme (ENGEL et al., 2017). Outro fator importante é a rugosidade da superfície, pois uma superfície rugosa fornece locais mais favoráveis para que ocorra a colonização, contribuindo assim no processo de adesão celular aos substratos (BARBOSA et al., 2016).

Em relação aos polímeros, eles também são materiais amplamente usados na indústria de alimentos, por possuírem ótimas propriedades em sua composição, eles são capazes de retardar e prevenir qualquer tipo de alteração e deterioração no material da embalagem através de influências da luz, oxigênio e microrganismos presentes. A classe dos polímeros é dividida em termoplásticos e termoestáveis, sendo que os mais utilizados na indústria de alimentos são o polipropileno e polietileno que estão na categoria dos termoplásticos (ARAÚJO et al, 2010; ANDRADE, 2008).

O polipropileno se caracteriza como um material leve, que apresenta baixo custo e uma alta hidrofobicidade em relação ao vidro, contribuindo assim na facilidade da adesão bacteriana (MORAES et al., 2019). O polietileno está presente nos principais utensílios utilizados como placas de corte, e essas placas apresentam superfícies irregulares facilitando a deposição do material orgânico, com isso, as células bacterianas se aderem com mais facilidade e assim, dificultando a ação dos agentes antimicrobianos como por exemplo os desinfetantes (SINDE; CARBALLO, 2000).

Essas superfícies utilizadas na produção dos alimentos não podem apresentar componentes tóxicos, nem facilitar a migração e absorção dos alimentos, devem apresentar uma estrutura lisa,

sem deformações e fissuras, para assim serem utilizadas nos processos alimentícios e evitar o processo de adesão microbiana.

A maioria dos patógenos causadores de doenças veiculadas por alimentos são capazes de formar biofilme nesses tipos de superfícies na indústria de alimentos, causando contaminação cruzada durante todas as etapas de produção, e o *Staphylococcus aureus* é um patógeno capaz de formar comunidade de biofilme e conseqüentemente causar problemas de segurança alimentar (TANGO et al., 2018; BRIDIER et al., 2015).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem a família *Staphylococcaceae* e são definidas como cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e não esporogênico. Por pertencerem ao grupo dos microrganismos mesófilos apresentam capacidade de multiplicação sob condições de 7°C a 47,8 °C, pH na faixa de 4 a 9,8, atividade de água entre 0,83 a 0,99 e tolerantes a concentrações de sal entre 10% a 20%, além de apresentarem catalase positiva e oxidase negativa (FRANCO; LANDGRAF, 2008; LEROY et al., 2020).

O gênero *Staphylococcus* possui 54 espécies e 28 subespécies, sendo divididas em coagulase positiva que inclui os sorovares patogênicos considerados mais sérios como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi*, e coagulase negativa que inclui alguns sorovares como *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. haemolyticus* entre outros (<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>). A espécie mais estudada é o *S. aureus* por estar diretamente envolvido em casos de surtos alimentares. Esse patógeno tem a capacidade de produzir toxina em diversas condições ambientais e contaminar alimentos causando intoxicação alimentar estafilocócica (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2009).

Os surtos de intoxicação causados a partir da bactéria *S. aureus* normalmente ocorrem após a ingestão de alimentos contaminados através do manuseio impróprio, além de decorrentes fatores como, o intervalo de temperatura em que o alimento fica exposto. Quanto menor for a temperatura de incubação, maior será o tempo que o microrganismo terá para a formação da enterotoxina (FRANCO; LANDGRAF, 2008; FETSCH et al., 2014).

Esse patógeno é oportunista e bem adaptado ao ambiente, podendo ser encontrado na pele, mucosas de humanos e animais além de possuir uma capacidade de resistir a diversas condições. Os manipuladores de alimentos que são portadores desse microrganismo são potenciais fontes de contaminação durante as etapas nos processos de alimentos, e a alta resistência desse patógeno contribui para sua sobrevivência durante longos períodos em superfícies e equipamentos, o que torna mais difícil o controle (BAPTISTA et al., 2016).

2.2.1 Biofilmes de *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é um dos agentes bacterianos com mais importância em casos de doenças veiculadas por alimentos, com capacidade de causar intoxicação alimentar devido à sua toxina estafilocócica liberada ao alimento. É relatado que esse patógeno está presente no ambiente e pode chegar ao alimento através do transporte via humanos e animais. Essa contaminação ocorre durante o processo de manipulação dos alimentos que pode ser ocasionada pela falta de higiene eficaz em todas as superfícies e equipamentos de processamento. Dentre os principais microrganismos envolvidos na formação de biofilmes, o *S. aureus* apresenta facilidade de adesão em superfícies industriais de processamento de alimentos sendo frequentemente encontrados em indústrias processadoras de carnes, aves, laticínios, frutas e legumes (XU et al., 2019).

A capacidade do *S. aureus* em produzir biofilmes torna esse microrganismo tolerante aos vários processos de destruição e inativação que inclui o uso de antimicrobianos. No entanto, as células sésseis têm capacidade de sobreviver ao estresse do meio ambiente em que o biofilme se encontra aderido, devido a matriz extracelular que serve de proteção aos ataques ambientais, causando um problema persistente na indústria de alimentos (KANG et al., 2019). Além disso, algumas cepas de *S. aureus* capazes de formar biofilme também podem apresentar resistência a antibióticos, essas cepas são bastante encontradas em ambientes hospitalares, mas também podem ser detectadas em alimentos. Portanto, toda a cadeia de processamento de alimentos serve de veículo transmissor de cepas de *S. aureus* resistentes e causadores de infecções aos seres humanos (BRAJĚK et al., 2019).

A contaminação de biofilmes por *S. aureus* na indústria de alimentos pode ser influenciada por diferentes fatores, como as etapas de processamento, temperatura de armazenamento, pH, rugosidade da superfície, atividade de água e nutrientes do ambiente de produção. Essas condições facilitam a sobrevivência e formação de comunidades de biofilmes e os tornam resistentes em comparação com a células na sua forma livre. Um estudo relatou a importância desses fatores na formação do biofilme, onde foi determinada a capacidade de formação de biofilme em superfícies de contato sob duas condições, tempo e temperatura. A conclusão do estudo mostrou que é importante analisar o controle da temperatura para evitar a formação de comunidades de biofilmes em ambientes de processamento de alimentos (CRUZADO-BRAVO et al., 2019).

Devido essa preocupação na indústria de alimentos, torna-se necessário encontrar estratégias que possam solucionar e prevenir a multiplicação de microrganismos e formação de comunidade de biofilmes. O uso de tecnologias inovadoras assim como a utilização de ferramentas de predição podem ser soluções de controle e combate aos biofilmes formados por *S. aureus* em

todas as etapas da cadeia alimentar. Além disso, essas ferramentas podem servir para auxiliar no tipo de tecnologias de barreira que será usada na predição da formação do biofilme.

2.3 PREDIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA

A predição microbiana é um tipo de tecnologia inovadora que utiliza modelos preditivos na prevenção da multiplicação de microrganismos. Os microrganismos possuem uma capacidade de rápida mutação e aquisição de novos genes ao longo dos processos de produção de alimentos, contribuindo assim na contaminação cruzada e conseqüentemente na redução da qualidade do produto. Tendo em vista esse problema, a segurança dos alimentos pode ser melhorada ao avaliar os mecanismos de defesa e prevenção do comportamento microbiano em relação aos fatores intrínsecos e extrínsecos que darão respostas a todas as etapas de produção e segurança dos alimentos. Os vários modelos preditivos utilizados na microbiologia preditiva irão servir para descrever o comportamento dos agentes contaminantes em diferentes condições físico-químicas, permitindo a previsão do desenvolvimento microbiano nas fases lag, exponencial e de declínio ou morte (AKKERMANS; IMPE, 2018).

A predição da multiplicação microbiana é descrita principalmente para a bactéria na forma livre, todavia, novas abordagens surgem com o intuito de descrever a prevenção na formação de biofilmes, que envolve fenômenos do ambiente em que os microrganismos então presentes, assim como suas condições bioquímicas. Essas novas abordagens na microbiologia preditiva descrevem a utilização de substratos que contribuem na dinâmica de formação e estrutura do biofilme. Em relação a esses aspectos, surgem cada vez mais estudos que descrevem condições adequadas para a formação de biofilme sob vários fatores ambientais (TANGO et al., 2018).

A indústria de produtos cárneos é um ambiente adequado onde as bactérias encontram condições satisfatórias para adesão nas superfícies de processamento dos produtos e formação de biofilmes. Além disso, o risco de contaminação cruzada durante as etapas é de grande preocupação, pois as células bacterianas se desprendem do biofilme e contaminam o alimento quando entra em contato com esses equipamentos e superfícies contaminados (GIAOURIS et al., 2014).

Por esse motivo, o uso de agentes antimicrobianos é aplicado na destruição dessas comunidades formadas por microrganismos patogênicos e deteriorantes, embora o uso desses agentes seja eficaz na célula na forma planctônica, ainda existe resistência quando se trata de células sésseis. Diante disso, o uso de modelagens de predição microbiana é importante na descoberta de fatores que possam contribuir para a prevenção da multiplicação de microrganismos e conseqüentemente a formação de biofilmes.

2.3.1 Modelos preditivos

A microbiologia preditiva é uma ciência que estuda a aplicação de modelos matemáticos para descrever a dinâmica do desenvolvimento dos microrganismos em diferentes ambientes em que o alimento está exposto. O uso da microbiologia preditiva na quantificação dos riscos associados aos produtos alimentícios, se dá pelo uso de ferramentas como software e plataformas on-line que visam prever as condições ideais no desenvolvimento, inativação e sobrevivência dos microrganismos. Essa área da microbiologia fornece informações quantitativas na análise de risco e a probabilidade de um perigo ocorrer, todavia, esse estudo é usado como alternativa para as análises microbiológicas convencionais, através de uma abordagem mais detalhada sobre o comportamento microbiano e as possíveis maneiras de inativação (GONZÁLEZ et al., 2019).

As várias ferramentas para a segurança dos alimentos disponíveis em plataformas on-line são classificadas em modelagem matemática primária, secundária e terciária. Os modelos de primeiro nível estão relacionados com as mudanças na quantidade de microrganismos em relação ao tempo sob um único conjunto de condições, já os modelos secundários descrevem como os parâmetros primários variam em relação às condições ambientais, e os modelos terciários utilizam os modelos primários e secundários para a construção de softwares de computador ou sistemas especialistas que calculam o comportamento dos microrganismos sob várias condições ambientais (BARANYI; ROBERTS, 1995; FORSYTHE, 2013; HUANG, 2014).

A maioria dos modelos atuais utilizados no ramo da microbiologia preditiva, são os modelos contínuos, que descrevem a população microbiana com a utilização de equações capazes de observar e avaliar a segurança na garantia da qualidade de um produto ou processo tecnológico na indústria de alimentos. Existem algumas plataformas on-line que disponibilizam de bancos de dados como o *ComBase* e programas como o Pathogen Modeling Program (PMP), essas ferramentas podem ser usadas com facilidade e eficiência e não necessitam de muita habilidade matemática para o seu uso (FERRER et al., 2009).

Os modelos preditivos são diversos e foram desenvolvidos por pesquisadores envolvidos na modelagem matemática juntamente com microbiologistas para antever as necessidades da indústria de alimentos e fornecer respostas às variadas perguntas sobre a vida útil dos alimentos em relação ao acelerado desenvolvimento microbiano durante toda a cadeia produtiva (GUILLIER, 2016). Esses modelos servem de respostas para as hipóteses estudadas em determinado campo de pesquisa sob um conjunto de circunstâncias com capacidade de prever, controlar ou melhorar de maneira mais inteligente o desempenho do funcionamento de um determinado sistema (MCMEEKIN et al., 2008).

2.4 PREDIÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Modelos preditivos para avaliar a multiplicação de patógenos transmitidos por alimentos são desenvolvidos e aplicados para um melhor entendimento sobre as condições ideais de crescimento desses agentes contaminantes. Além disso, são importantes na avaliação de riscos, pois determinam os pontos críticos de controle em toda a cadeia de produção alimentar. Alguns modelos de predição são usados para prever a taxa de multiplicação do *S. aureus* e outros microrganismos, como o estudo realizado para avaliar a dinâmica de crescimento e inativação de *Salmonella Typhimurium* e *S. aureus*, onde Baka et al. (2017) usaram o banco de dados *ComBase* que é um modelo terciário que serviu para investigar as temperaturas de armazenamento de produtos de peixe. No estudo de Diallo e Bogaerts (2016), também foi utilizado o *ComBase* para modelar a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em camarões cozidos e salgados sob diferentes temperaturas, com o objetivo de prever a vida útil desse alimento.

Modelos primários e secundários foram comparados por Lee et al. (2015) para desenvolver modelos preditivos que descrevessem o comportamento de *S. aureus* isolado de carne suína crua a partir das variáveis tempo e temperatura durante o armazenamento. Esses modelos foram avaliados e comparados usando uma ferramenta de nova geração IPMP 2013 que serviu para desenvolver os principais modelos preditivos, mas conclui que, o desenvolvimento de um modelo secundário utilizando outros fatores intrínsecos e extrínsecos era impossível.

Além da preocupação em desenvolver modelos que descrevem a multiplicação do *S. aureus*, é relevante estudar a formação da enterotoxina estafilocócica durante a produção alimentar. De acordo com essa questão, um modelo preditivo dinâmico foi desenvolvido por Gunvig et al. (2018) para prever a formação de enterotoxinas por *S. aureus* durante o tratamento térmico e fermentação de produtos à base de carne, analisando as variáveis temperatura, pH, conteúdo de nitrito e sódio. Em conclusão, os autores afirmam que os modelos são relevantes para a predição do aumento de *S. aureus* e servem para avaliar se é possível a produção de enterotoxinas durante as etapas de processamento de produtos cárneos.

A aplicação de ferramentas preditivas para prever a formação do biofilme também é de grande interesse para a indústria de processamento de alimentos, por esse motivo, vários estudos relatam sobre o uso de ferramentas preditivas na formação de biofilmes por vários microrganismos. Em um estudo realizado por Moraes et al. (2018), foi analisado a capacidade de formação de biofilme por *Salmonella enterica* em superfícies de aço inoxidável em função do pH, temperatura e concentração de NaCl utilizando modelos preditivos. A conclusão foi que os modelos mostraram um bom ajuste aos dados experimentais e as equações construídas mostraram

desempenho adequado para prever os limites de adesão e formação de biofilme. Dimakopoulou-Papazoglou et al. (2016) também avaliaram a formação de biofilme por *S. enterica* a partir do desenvolvimento de modelos preditivos sob condições de pH e atividade de água, e concluem que os modelos constituem uma boa relevância para quantificação das interações dos fatores ambientais no crescimento de biofilme.

Em relação a predição da formação de biofilmes por *S. aureus*, ainda são poucos os estudos que usam modelagens matemáticas para prever essa formação de comunidades sésseis. Um estudo mais recente foi o de Tango et al. (2018) que modelou a formação de biofilme por *S. aureus* em relação a diferentes faixas de pH, atividade de água e concentração de etanol, a partir do desenvolvimento e validação de um modelo preditivo que descreveu os efeitos desses fatores ambientais na formação do biofilme. Concluiu que esse modelo foi capaz de avaliar a taxa ideal de formação de biofilme de *S. aureus*, além de contribuir na avaliação de riscos em matrizes reais de alimentos, contribuindo assim para a segurança nas indústrias alimentares.

Os modelos preditivos existentes fornecem informações úteis no controle de biofilme durante a produção de alimentos. Todavia, há uma necessidade de desenvolver mais estudos que possam avaliar se esses modelos atuais são adequados para modelar a formação do biofilme por *S. aureus* sob diferentes fatores ambientais, além dos já existentes, ou se será necessário o desenvolvimento de novos modelos.

3 ARTIGO EXPERIMENTAL

MODELAGEM DA MULTIPLICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NAS FASES PLANCTÔNICA E SÉSSIL EM DIFERENTES SUPERFÍCIES DE CONTATO

3.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos buscam cada vez mais maneiras de aderir às superfícies e formar comunidades organizadas classificadas como biofilmes. A formação de biofilmes microbianos torna-se um problema de grande importância para a indústria de alimentos por representarem uma fonte de persistência da contaminação microbiana. Na matriz do biofilme pode conter um número considerável de microrganismos deteriorantes e patogênicos, e a presença dessas comunidades estruturadas de células microbianas em superfícies de contato com alimentos é considerada um perigo para a saúde pública, além de causar grandes problemas nas indústrias alimentícias que resultam em perdas econômicas, todavia, a prevenção dessa contaminação tornou-se uma prioridade diária no mercado global (IÑIGUEZ-MORENO et al., 2018).

Na indústria de alimentos, são muitos os fatores que contribuem para a multiplicação microbiana, dessa forma, os alimentos podem ser expostos a contaminação em todas as etapas do processo, desde a produção até o consumo final (OMS, 2019). E o *S. aureus* é um dos principais contaminantes na indústria de alimentos em decorrência da facilidade de adaptação às diversas condições ambientais como temperatura, atividade de água, pH etc., que são fatores que irão contribuir para a multiplicação dessa bactéria. Esse patógeno possui a capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas da indústria como forma de proteção aos ataques ambientais (BRIDIER et al., 2015). As principais superfícies abióticas estudadas na adesão microbiana são vidro, aço inoxidável, polipropileno e polietileno, pois os patógenos alimentares interagem com esses substratos iniciando o crescimento celular e posteriormente levando à formação do biofilme (CHA; SON; RYU, 2019). As diferentes características de cada superfície utilizada em indústrias de alimentos têm a capacidade de suportar o crescimento do biofilme, tendo em vista que, a adesão celular é o resultado de muitas interações como as características físico-químicas tanto dos substratos como dos microrganismos.

A contaminação por células sésseis tem chamado a atenção como uma das principais preocupações nas indústrias produtoras de alimentos (XU et al., 2019), devido ao difícil controle dessas células aderidas quando comparadas às células planctônicas. Devido essa preocupação, novas abordagens são tomadas para entender a dinâmica da formação dessas comunidades

organizadas, e o estudo da predição microbiana ganha cada vez mais espaço no ramo da microbiologia preditiva de alimentos.

A microbiologia preditiva trata-se de uma ciência dentro da microbiologia tradicional de alimentos que utiliza modelagens matemáticas para descrever o comportamento microbiano durante todas as etapas de multiplicação e inativação. Modelos matemáticos foram desenvolvidos com o objetivo de prever os estágios da multiplicação de microrganismos patogênicos de origem alimentar em diversas condições ambientais. Muitos desses modelos foram desenvolvidos para avaliar a multiplicação microbiana em caldo, embora já exista pesquisas que buscam prever essa dinâmica microbiana em matrizes alimentares (NYHAN et al., 2018). Embora exista várias modelagens preditivas disponíveis para acesso livre que são utilizadas para modelar a multiplicação de células planctônicas como o *S. aureus*, ainda são poucos os estudos que abordam modelagens para a formação do biofilme em diferentes superfícies da indústria de alimentos.

Dessa forma, sabendo que os biofilmes têm a capacidade de atuar como uma fonte crônica de contaminação e comprometer a qualidade do alimento além de representar um risco para a saúde do consumidor, é necessária uma melhor compreensão sobre as interações entre os microrganismos e as superfícies de contato com alimentos com base no fatores ambientais e os diferentes estágios de formação do biofilme (BARNES et al., 1999; ZHAO et al., 2017). Além disso, é de grande importância criar ambientes favoráveis para a multiplicação microbiana e formação de biofilmes em laboratórios de pesquisas, com o objetivo de imitar os cenários reais da indústria de alimentos a partir do uso de superfícies utilizadas no processamento dos alimentos, para assim entender sobre a dinâmica dos fatores e das condições ambientais envolvidas no processo de contaminação microbiana e formação de biofilme.

Tendo em vista esse desafio na busca de novas abordagens para a prevenção da contaminação microbiana e melhoria na segurança e qualidade dos alimentos, o objetivo do estudo foi aplicar a microbiologia preditiva na multiplicação de *S. aureus* em diferentes superfícies de contato com alimentos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa avaliou a dinâmica da multiplicação do *S. aureus* nas formas planctônica e séssil em diferentes superfícies de contato com alimentos a partir da cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923. A cepa foi usada no preparo do inóculo e as esferas de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade foram preparados para a realização da multiplicação das células. A quantificação dos microrganismos nas formas planctônica e séssil foram realizadas, e os dados obtidos foram comparados com um modelo

existente de microbiologia preditiva de acordo com o Modelo Completo de Baranyi e Roberts, seguindo do tratamento dos dados.

As análises para a avaliação da formação de biofilme foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo - UPF.

3.2.1 Preparo do inóculo

Os microrganismos previamente isolados em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol sob congelamento foram reativados utilizando novamente caldo BHI, onde 2 alçadas da cultura foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubado a 35° C por 24 horas. Em seguida, uma alçada da cultura foi semeada em um meio de enriquecimento não seletivo Plate Count Agar (PCA) e incubados a 35° C por 24 horas. Posteriormente, as colônias positivas para *S. aureus* foram estocadas em Ágar Nutriente inclinado.

O inóculo inicial foi preparado a partir das cepas de *S. aureus* estocadas em tubos inclinados contendo Ágar Nutriente. Em seguida, uma colônia isolada da amostra de *S. aureus* foi inoculada individualmente em Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 35° C por 1 hora (tempo para a obtenção da transmitância de 95,0%). Posteriormente, foi acompanhado a multiplicação das células através da transmitância de 600 nm até um valor de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. A partir desse valor de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL foi padronizada uma concentração inicial de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL e inoculada nos tubos contendo o meio líquido utilizado para a multiplicação das células planctônica e sésil.

3.2.2 Preparo dos corpos de provas

Foram usadas esferas comerciais como corpos de provas com diâmetro médio de 4 mm e com espessuras de 1,26 na superfície de vidro, 1,25 no aço inoxidável, 1,01 no polipropileno, 0,7 no polietileno de alta densidade e 0,84 no polietileno de baixa densidade que foram limpos e esterilizados. Todos os materiais foram submetidos a limpeza manual com a utilização de água e detergente neutro líquido, foram lavados com água destilada seguindo da imersão em álcool etílico 70% por 1 hora. Apenas as esferas de vidro e aço inoxidável foram autoclavados a uma temperatura de 121°C por 15 minutos, enquanto os polímeros foram submetidos à esterilização em luz UV por 20 minutos.

3.2.3 Multiplicação do *S. aureus*

Para a construção das curvas de multiplicação das cepas de *S. aureus* tanto para células planctônicas como sésseis, foi utilizado o meio de cultura Skim Milk com pH de 6,8 e A_w de 0,90 em uma temperatura de 15°C. Após o preparo do inóculo, um volume inicial padronizado de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL da cultura fisiologicamente ativa foi inoculado em tubo contendo 5 mL do caldo Skim Milk em triplicata e adicionada as superfícies em cada tubo para a análise de células planctônicas e sésseis. Os tubos foram incubados na temperatura de 15°C e retirados nos diferentes tempos (0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168h). Posteriormente, as esferas foram retiradas do meio de cultivo Skim Milk com o auxílio de uma alça de níquel cromo e imersos em tubo contendo 5 mL de Água Salina a 0,85% e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (frequência 40 kHz e potência de 200 W; ECO-SONICS Modelo 5.9/40A) para ocorrer a desadesão de células sésseis (SCHERBA et al., 1991; WEBBER et al., 2015). Após o período de incubação em estufa a 15°C, o tubo contendo caldo Skim Milk sem as esferas foi usado para avaliar a multiplicação das células planctônicas. Diluições apropriadas foram realizadas até 10^{-7} para a contagem tanto de células planctônicas como sésseis, em seguida foram transferidos 0,05 ml de cada diluição para placas de Petri contendo ágar PCA, em triplicata, pelo método drop plate.

3.2.4 Quantificação dos microrganismos nas formas planctônica e séssil

Para cada situação de coleta em função do tempo houve duas amostras, onde uma delas é o tubo original contendo a cultura planctônica em caldo Skim Milk e a outra é o tubo contendo a cultura séssil que sofreu desadesão por ultrassom em Água Salina a 0,85%.

Em seguida, diluições apropriadas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar PCA para contagem total de microrganismos utilizando o método de contagem em gota (Drop plate) inoculando cinco gotas de 10 μ L de cada diluição, incubadas a 37° C e após 24 horas foi realizada a leitura. A quantidade de microrganismos foi calculada através da unidade da área de cada superfície.

3.2.5 Caracterização das superfícies de contato

3.2.5.1 Determinação do diâmetro das esferas

A determinação do diâmetro de cada esfera de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta e baixa densidade foram realizadas através da medição das dimensões das partículas com o uso de um paquímetro.

3.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As esferas utilizadas no estudo foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (VEGA 3LM, Tescan Orsay Holding), a fim de monitorar a morfologia e observar as estruturas das superfícies tanto nas esferas limpas como nas esferas com a formação do biofilme. Previamente para as análises de microscopia, as esferas foram então depositadas em um disco de aço inox sobre uma fita dupla face de carbono, sendo submetidas a um revestimento com um filme de ouro (300 Å) a 30 mA por 4 minutos utilizando um metalizador (Q150R-ES, Quorum Technologies Ltd.). Foi realizada a microscopia de varredura tanto nas superfícies limpas como nas superfícies com a formação do biofilme.

3.2.6 Predição do crescimento microbiano

As curvas de multiplicação do *S. aureus* foram construídas no programa ComBase Predictor onde os dados de crescimento foram ajustados no modelo de Baranyi e Roberts (1994) por meio do DMFit, um suplemento do Microsoft Excel desenvolvido no Institute of Food Research. A partir de cada curva de crescimento foram estimados parâmetros cinéticos em relação a concentração inicial (log UFC/ml), fase de adaptação (h), velocidade específica máxima de crescimento ($\log \cdot h^{-1}$), concentração final (log UFC/ml) e coeficiente de determinação do modelo (r^2). O tempo médio de geração e a velocidade específica de crescimento foram realizadas a partir dos dados do experimento.

3.2.7 Tratamento dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância entre os valores tempo de geração e velocidade máxima de crescimento em função das variáveis estudadas no planejamento fatorial para a cepa de *S. aureus* e para cada superfície. E, posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Multiplicação e quantificação dos microrganismos nas formas planctônica e séssil

Os resultados para as células planctônicas (Tabela 1) mostraram uma adequada modelagem preditiva de acordo com o modelo utilizado, com uma concentração inicial de células

de $3,381 \pm 0,17$ log UFC/ml levando a uma fase de adaptação T(h) de 21,137 horas. A concentração final de células planctônicas foi de $7,263 \pm 0,111$ log UFC/ml após as 168 horas de experimento, e o coeficiente de determinação do modelo (r^2) foi de 0,94 mostrando adequação do modelo.

As cinco superfícies de contato com alimentos avaliadas no experimento apresentaram adesão microbiana a partir da cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) submetido a uma temperatura de 15°C sob diferentes tempos de multiplicação. Ao analisar cada superfície em seus diferentes tempos, foi percebido que as células bacterianas presentes no caldo Skim Milk tiveram o contato inicial com as superfícies de vidro e aço inoxidável somente após às 48 horas de incubação, com valores iniciais de 2 log UFC/cm² e atingindo valores superiores após os 7 dias (168h) de incubação. Na superfície de vidro, entre os tempos 0 e 24 horas não houve diferença significativa, da mesma maneira que não houve essa diferença nos tempos 0 e 24 horas para a superfície de aço inoxidável. Essa diferença também não foi significativa nas 48 horas para ambas as superfícies, período em que o biofilme começou seu processo de formação, dessa forma, observamos que entre as duas superfícies vidro e aço inoxidável, a quantidade de células aderidas foram praticamente as mesmas quando comparado os tempos entre elas.

Em relação a superfície de polipropileno, a contagem inicial de células começou a partir do tempo 0 horas com 1 log UFC/cm² e atingiu valores superiores a partir das 72 horas. Entre os tempos 0, 24 e 48 horas não houve diferença significativa para essa superfície, assim como nos tempos 72 e 96 horas, porém diferenças foram observadas nos tempos 120 e 144 horas, mas o tempo 120 não diferiu do tempo 168 horas. Isso mostra que a multiplicação microbiana atingiu seu máximo no período de 144 horas e, aparentemente, a fase de declínio do microrganismo teve início nas 168 horas.

A aderência nas superfícies de polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade atingiram valores de 2 log UFC/cm² logo nas 0 horas do experimento e valores superiores foram encontrados até as 168 horas. Entre essas duas superfícies não ocorreu diferença significativa nas 0 horas, porém houve diferença significativa entre elas nos demais tempos.

Entre as cinco superfícies estudadas, as que tiveram uma adesão microbiana em menos tempo foram o polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade, as demais superfícies de vidro e aço inoxidável demoram mais tempo para que os microrganismos iniciassem seu processo de adesão celular. No entanto, mesmo com essa diferença entre as superfícies, a dinâmica de fixação das células sésseis em cada superfície de contato atingiram números que variaram entre 4 log UFC/cm² a 5 log UFC/cm².

Os dados apresentados mostram que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) para todas as superfícies avaliadas no experimento, porém essas diferenças variaram de acordo com cada tempo usado no experimento.

A Tabela 1 apresenta os resultados da concentração inicial, fase de adaptação, velocidade específica máxima de crescimento e concentração final da multiplicação do *S. aureus* em células sésseis e planctônicas. Observamos que na modelagem para células sésseis, a curva de formação do biofilme por *S. aureus* a 15°C no vidro apresenta fase de adaptação T(h) de 22,01 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\log \cdot h^{-1}$) de 0,064 log/h. No aço inoxidável essa fase de adaptação T(h) foi de 21,36 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\log \cdot h^{-1}$) de 0,061 log/h. A superfície de polipropileno foi a que obteve uma maior fase de adaptação T(h) 63,26 horas, porém a velocidade específica máxima de crescimento ($\log \cdot h^{-1}$) foi igual ao aço inoxidável de 0,061 log/h. As demais superfícies de polietileno de alta e baixa densidade tiveram resultados de fase de adaptação T(h) de 19,34 e 29,46 horas e velocidade específica máxima de crescimento ($\log \cdot h^{-1}$) de 0,064 e 0,051 log/h respectivamente.

Esses resultados apontam que a adesão microbiana e a formação do biofilme nos diferentes substratos estudados ocorrem em velocidade lenta nas primeiras horas, porém, essa velocidade pode ser acelerada de acordo com o tipo de material aderente, pois foi observado que em algumas superfícies as células bacterianas tiveram um contato inicial mais rápido, enquanto em outras superfícies esse contato foi mais lento. Além disso, é importante ressaltar também que as células planctônicas apresentaram uma concentração inicial de células maior do que as sésseis, isso explica que a adesão microbiana nos substratos ocorre de maneira mais lenta quando comparada com bactérias na sua forma livre, devido os estágios e formação do biofilme depender de muitos fatores ambientais (ZHAO et al., 2017).

Tabela 1: Predição da multiplicação em log do *S. aureus* ATCC 25923 em células planctônicas e em células sésseis nas superfícies de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade.

	Concentração inicial	Fase de adaptação	Velocidade específica máxima de crescimento	Concentração final	Coefficiente de determinação do modelo
	log UFC/ml	T (h)	log.h ⁻¹	log UFC/ml	r ²
Células Planctônicas					
	3,381 ± 0,17	21,137 ± 8,00577	0,0468 ± 0,00585	7,263 ± 0,111	0,94
Superfícies Células Sésseis					
Vidro	0,592 ± 0,551	22,0129 ± 18,154	0,0646 ± 0,0207	5,353 ± 0,337	0,921
Aço	0,455 ± 0,331	21,361 ± 11,0154	0,0618 ± 0,0114	5,192 ± 0,206	0,97
Polipropileno	1,353 ± 0,433	63,262 ± 19,507	0,0616 ± 0,0245	5,81 ± 0,593	0,886
Polietileno Alta Densidade	2,426 ± 0,809	19,348 ± 27,768	0,0642 ± 0,0358	6,559 ± 0,437	0,798
Polietileno Baixa Densidade	2,213 ± 0,223	29,468 ± 9,804	0,0513 ± 0,00926	5,854 ± 0,152	0,975

Fonte: elaborado pelo Autor (2021)

De acordo com a predição realizada foi possível prever que as superfícies de polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade propiciaram uma adesão imediata do microrganismo aos substratos logo no tempo 0, enquanto nas superfícies de vidro e aço inoxidável essa adesão apenas teve início depois das 24 horas de adaptação. Em nosso estudo, a concentração final de mais de 7,0 log UFC/ml de células planctônicas e mais de 5,0 log UFC/cm² de células aderidas nas superfícies estudadas indicaram um alto potencial de contaminação microbiana. As células planctônicas causam um grande risco microbiano para a indústria de alimentos, no entanto, o biofilme formado a partir dessas células livres tem gerado ainda mais preocupação para o setor de alimentos por se tratar de uma estrutura microbiana difícil de ser eliminada durante os processos de sanitização. Essa alta presença bacteriana em superfície de contato com alimentos também foi encontrada em um estudo que quantificou a presença de biofilme formado por *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável para verificar o tempo de maturação do biofilme em um período de incubação de 6 dias. E de acordo com os resultados, ao decorrer dos primeiros 4 dias de experimento, aumentos claros no número de células foram observados com o aumento do tempo de incubação (SHAO et al., 2020).

Esses resultados corroboram com os achados no presente estudo, que avaliou a maturação do biofilme formado por *S. aureus* em um período de 7 dias, e aumentos significativos também foram observados logo após os 4 dias de incubação.

Esses resultados estão apresentados nas figuras a seguir que mostram as previsões matemáticas realizadas pelo programa ComBase por meio do DMFit a partir do Modelo Completo de Baranyi e Roberts (1994) para célula sésil em superfícies de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade e célula planctônica em diferentes tempos na temperatura de 15°C respectivamente.

Figura 2: Predição da multiplicação de *S. aureus* em células sésseis em superfície de vidro

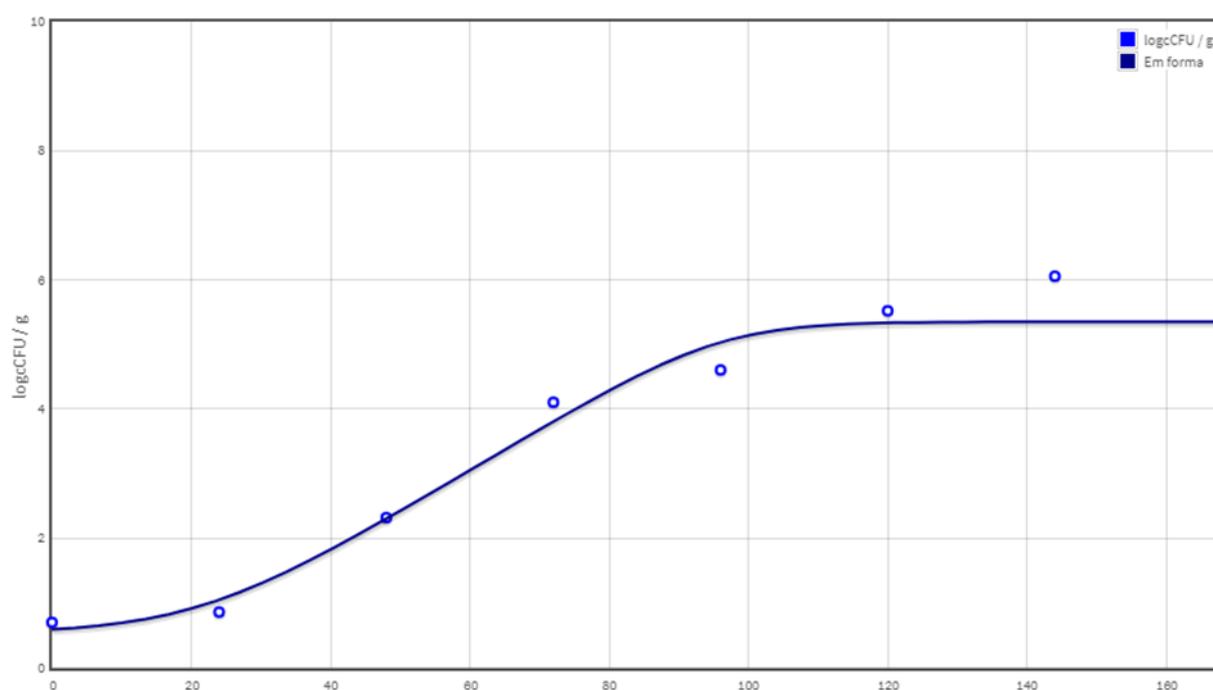


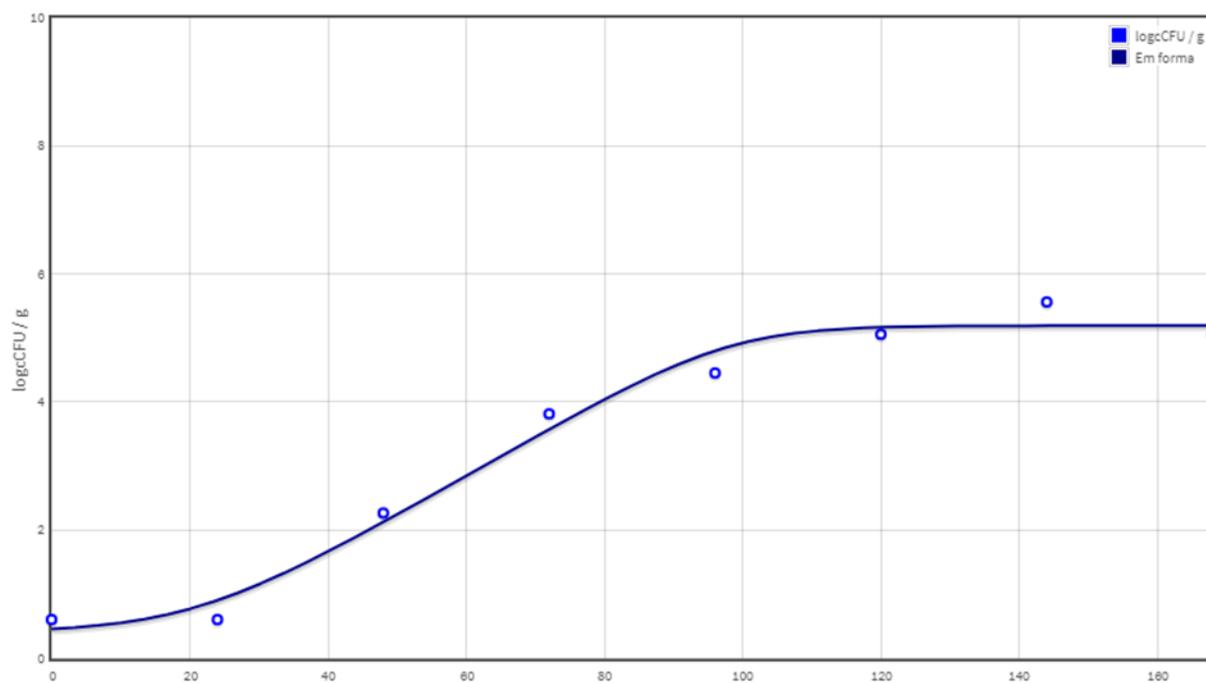
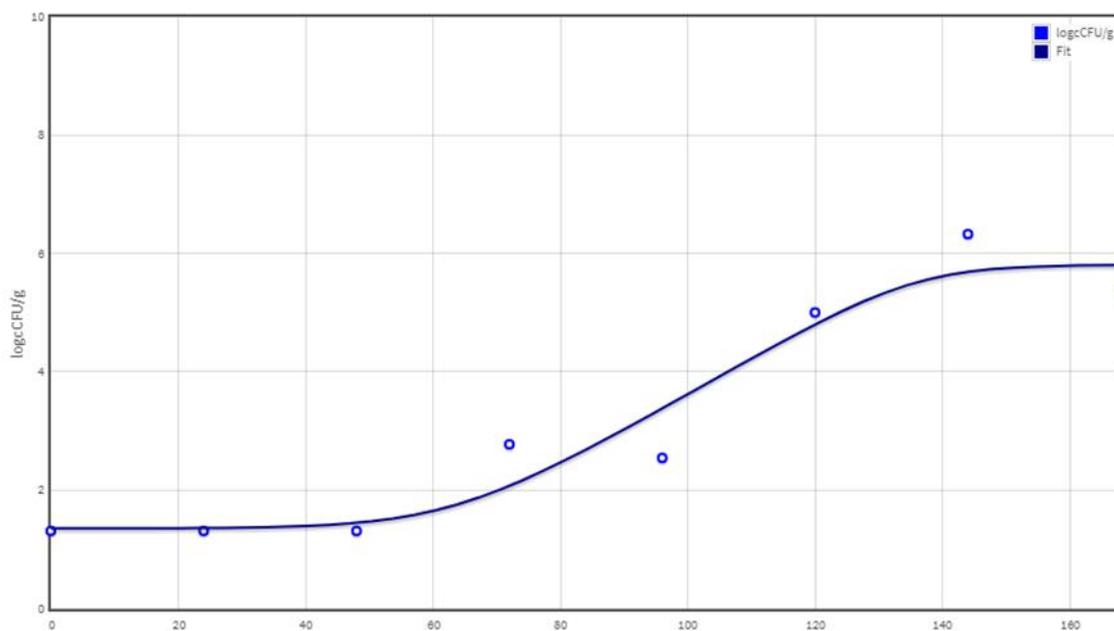
Figura 3: Predição da multiplicação de *S. aureus* em células sésseis em superfície de açoFigura 4: Predição da multiplicação de *S. aureus* em células sésseis em superfície de polipropileno

Figura 5: Predição da multiplicação de *S. aureus* em células sésseis em superfície de polietileno de alta densidade

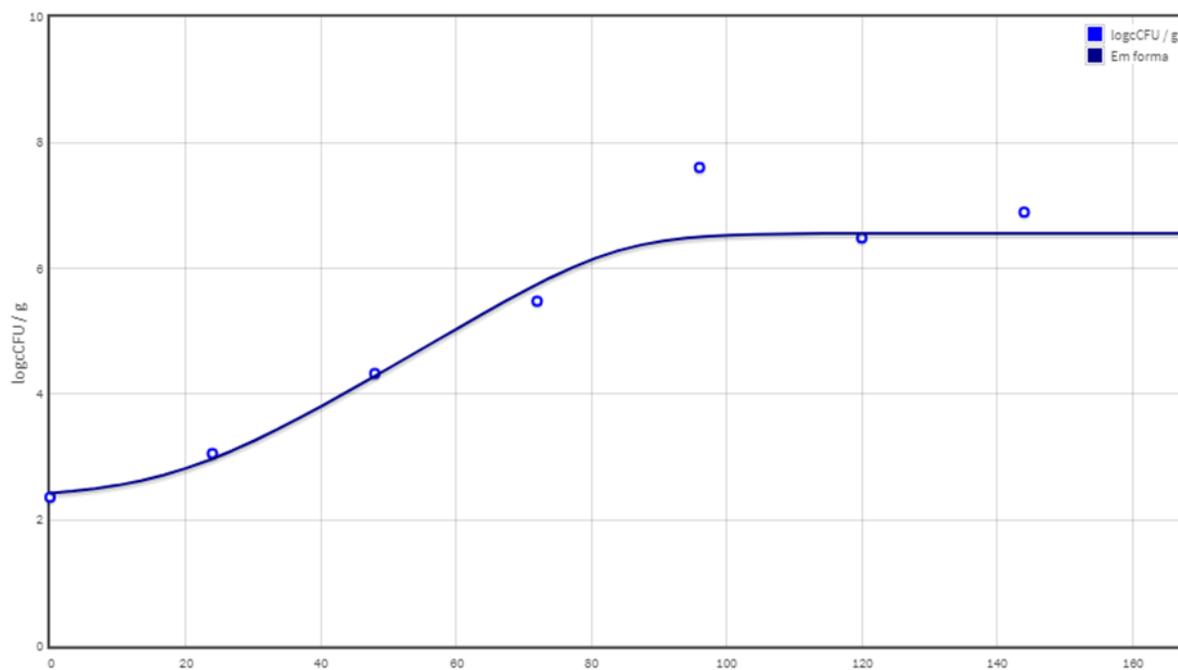


Figura 6: Predição da multiplicação de *S. aureus* em células sésseis em superfície de polietileno de baixa densidade

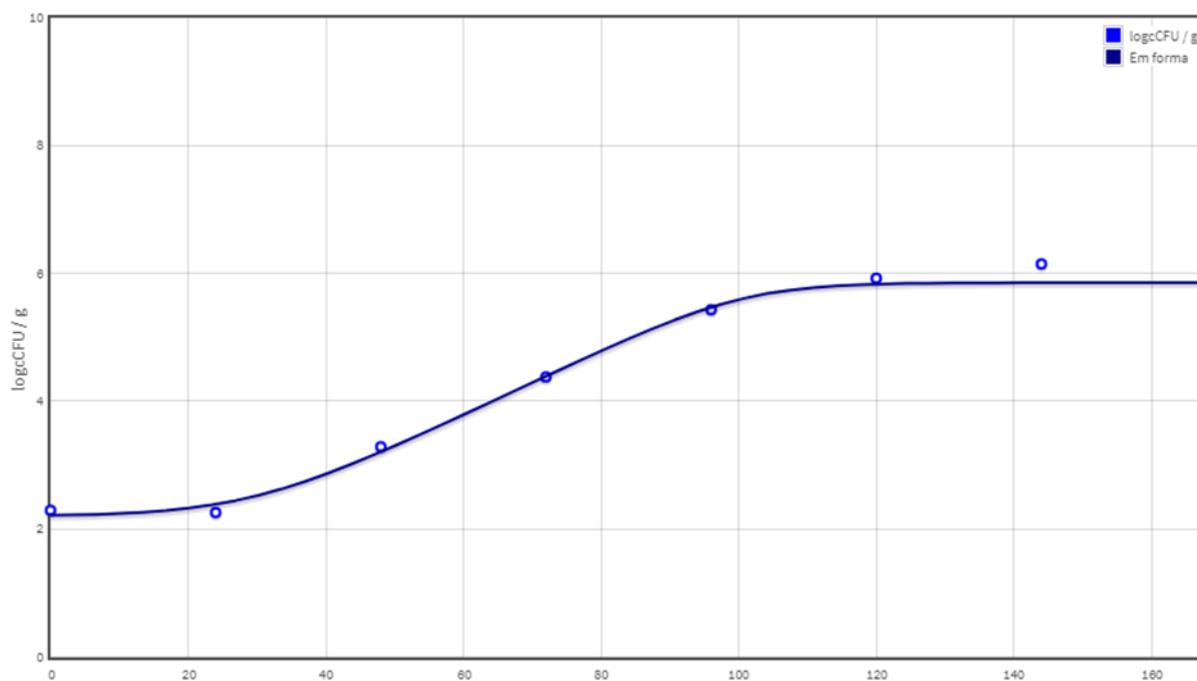
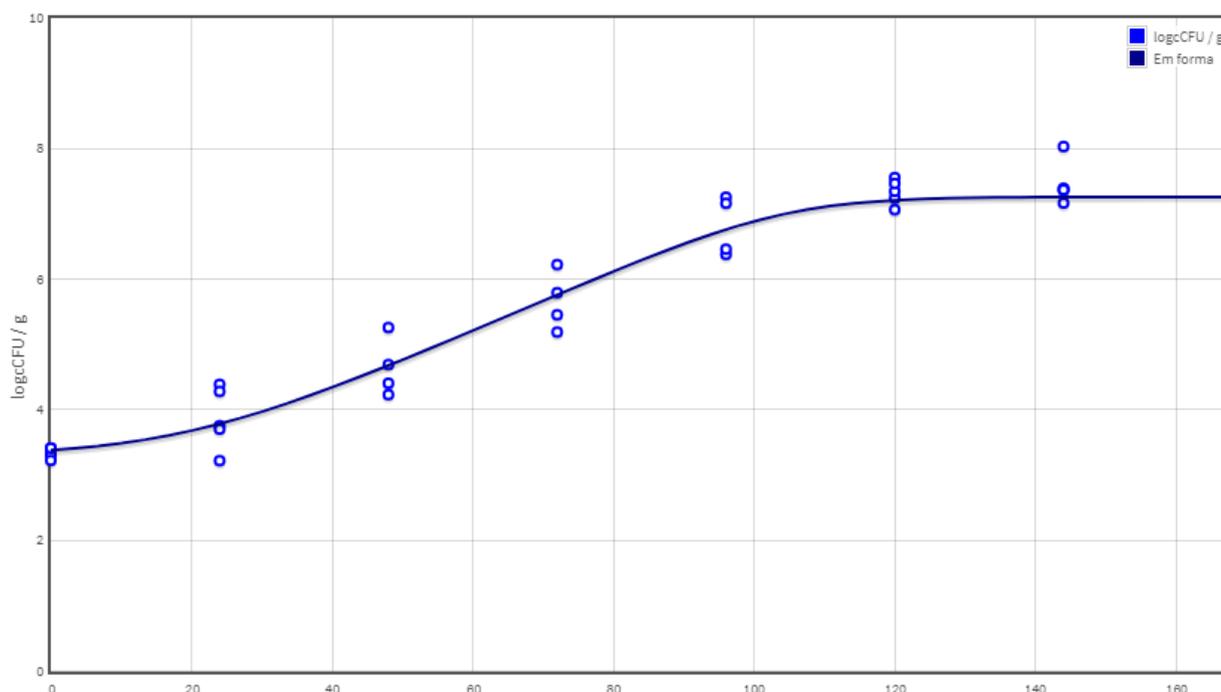


Figura 7: Predição da multiplicação de *S. aureus* em células planctônicas

A cinética de multiplicação do *S. aureus* para células sésseis apresentou diferença em todas as superfícies em relação as fases de latência (lag), exponencial (log), estacionária e morte. As células que aderiram no vidro permaneceram cerca de 22 horas na fase lag para iniciar o processo de adesão, logo após esse período, deu início a fase exponencial seguindo da fase de declínio. Os microrganismos aderidos no aço inoxidável permaneceram por 21 horas na fase lag seguindo para a exponencial, e a fase estacionária foi onde permaneceram por um período maior quando comparado com as demais superfícies. Entre todas as superfícies, a que os microrganismos permaneceram por mais tempo na fase lag foi a de polipropileno, que apenas a partir das 63 horas deu início a sua fase exponencial. Esse tempo em que as células bacterianas levaram para alcançar a fase exponencial, pode ser explicada pelo fato de que a superfície de polipropileno apresenta características lineares e sem ranhuras, o que pode ter dificultado a rápida adesão microbiana. Em relação às bactérias aderidas nas superfícies de polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade, o tempo necessário para o início da fase exponencial foi de aproximadamente dois dias. A fase de declínio onde inicia o processo de morte das células microbianas aparentemente começou a ter início a partir das 168 horas para todas as superfícies avaliadas no estudo, no entanto, seria necessário avaliar mais tempo para garantir que realmente as células entraram na fase de declínio a partir das 168 horas.

Ao longo dos 7 dias de experimentos, foi analisado o comportamento do *S. aureus* na sua fase planctônica e durante todos seus estágios na formação das comunidades de biofilmes. Ao avaliar a formação do biofilme, foi verificado que o microrganismo apresentou dinâmicas

diferentes para cada superfície quando os resultados foram modelados no ComBase, tendo em vista que, o contato inicial, a fixação à superfície, a formação da microcolônia, o desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme, maturação e dispersão podem ter ocorrido em fases diferentes em cada tempo e tipo de material aderente. Todavia, o modelo de caldo utilizado para o ajuste das curvas microbianas permitiu modelar todos os ensaios na formação do biofilme por *S. aureus* na temperatura de 15°C, apresentando uma representação gráfica dos dados de crescimento microbiano, assim como obteve estimativas de parâmetros para as taxas de concentração inicial de células, fase de adaptação, velocidade específica máxima de crescimento, concentração final e o coeficiente de determinação do modelo. Esses resultados indicam que o programa ComBase que é uma base de dados que possui vários modelos preditivos, conseguiu modelar a formação do biofilme e estimar a multiplicação microbiana em vários estágios de desenvolvimento.

Também foi realizada a modelagem das células planctônicas (Figura 7) e os resultados obtidos demonstram que o tempo de adaptação que as células permaneceram na fase lag foi de 21 horas, logo após esse período, deu início a fase exponencial e a partir das 120 horas começou a fase estacionária, período em que as bactérias presentes no meio de cultivo começaram a parar o processo de multiplicação e por fim chegando na etapa de declínio a partir das 168 horas.

Modelos preditivos bem desenvolvidos como o ComBase permitem prever a dinâmica microbiana de forma realista e precisa, sendo assim ferramentas positivas na busca pela segurança e qualidade dos alimentos. Esse modelo preditor permite que os usuários usem o módulo DMFit que pertence ao próprio ComBase para carregar os dados experimentais com o objetivo de encontrar o ajuste apropriado dependendo da curva de crescimento (TENENHAUS-AZIZA; ELLOUZE, 2015). Dessa forma, no presente estudo ao avaliar a dinâmica da multiplicação de células planctônicas e sésseis, é notório que a ferramenta utilizada na construção das curvas preditivas permitiu prever de forma significativa todos os estágios de multiplicação da bactéria *S. aureus* de acordo com cada fator avaliado. Esses resultados mostram que esses modelos terciários que são muito usados em estudos de células planctônicas, também permitem modelar a formação dos biofilmes em diferentes tipos de substratos, como apresentado no presente estudo. Portanto, é preciso que mais estudos sejam realizados com o intuito de avaliar a dinâmica do biofilme a partir de diferentes fatores ambientais por meio dessas ferramentas preditivas.

O número de microrganismos que aderem às superfícies aumenta de acordo com o tempo de contato com elas assim como a influência das condições ambientais favoráveis para essa multiplicação. As bactérias se fixam de forma imediata e mesmo em baixas temperaturas ocorre essa adesão, dessa forma, a temperatura utilizada no estudo teve influência no comportamento microbiano, contribuindo no aumento do tempo em que cada célula se multiplicava. O *S. aureus* é um desses microrganismos que consegue se adaptar bem em diversas condições ambientais,

inclusive sob baixas temperaturas, por isso a importância do monitoramento em relação ao tempo em que as células demoram para se multiplicarem, tendo em vista que, a partir desses resultados a indústria encontre a melhor maneira de evitar contaminações, principalmente por comunidades de biofilmes.

A dinâmica no comportamento adesivo do *S. aureus* como modelo bacteriano permitiu ser modelado nas suas fases planctônica e séssil, e as previsões obtidos por meio do modelo de crescimento utilizado, forneceram informações sobre o aumento na multiplicação da bactéria tanto na sua forma livre como no formato de biofilme quando aplicada uma temperatura de 15°C.

Diversos estudos relatam predições de diferentes bactérias na sua forma planctônica tanto em matrizes alimentares como em caldo utilizando o ComBase preditor como software para estimar a multiplicação microbiana. No entanto, poucas tentativas foram feitas até o presente momento, ao nosso conhecimento, sobre o desenvolvimento de modelos matemáticos para prever a formação de biofilme em diferentes superfícies de contato com alimentos. E desses estudos, não foi encontrado nenhum na literatura que modelou a formação do biofilme por meio do ComBase preditor. Na maioria dos estudos, os autores desenvolveram modelos preditivos para prever os efeitos ambientais na formação do biofilme bacteriano (DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2016; TANGO et al., 2018; VAEZI et al., 2020). Diante disso, é importante ressaltar que os softwares existentes também podem ser capazes de modelar os estágios da multiplicação do biofilme, assim como modelam a multiplicação das bactérias na sua forma planctônica como é visto em diversos estudos. Dessa forma, em um estudo foram avaliadas as taxas de crescimento específicas para *S. aureus* na sua forma livre para estimar o risco associado à exposição a enterotoxina estafilocócica do consumo de queijo Minas fresco no Brasil de acordo com diferentes temperaturas, pH e NaCl, e esses parâmetros foram testados no ComBase. De acordo com as predições avaliadas pelo programa, a temperatura de armazenamento foi o parâmetro que mais impactou a taxa de multiplicação e fase de latência de *S. aureus* (NUNES; CALDAS, 2017). Esses resultados ressaltam a importância de avaliar os efeitos da temperatura para o armazenamento de alimentos, pois o binômio tempo-temperatura são fatores fundamentais para prever o comportamento microbiano em suas diferentes fases de multiplicação. Em outro estudo, os autores também ajustaram seus dados experimentais no DMFit por meio do ComBase, comparando assim as taxas de crescimento, tempo de fase de latência e concentração final na multiplicação de células planctônicas de *Salmonella enterica* em sushi exposto a diferentes cenários de tempo-temperatura (SILVA et al., 2020).

A existência de modelagens matemáticas assim como o desenvolvimento de novos modelos preditivos são maneiras de prever a multiplicação microbiana de forma eficaz, tanto na

sua forma planctônica com séssil, embora ainda exista poucas abordagens no uso dos programas computacionais como o ComBase para a predição da formação do biofilme.

3.3.2 Análise da microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *S. aureus*

As imagens apresentam a microscopia representativa das superfícies de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade (Figuras 8 e 9). Foram avaliadas as superfícies em duas condições, sendo elas limpas e com adesão microbiana. As microscopias mostram a adesão microbiana em todas as superfícies avaliadas no estudo, sendo observado claramente a formação da arquitetura do biofilme por *S. aureus* (ATCC 25923) na temperatura de 15°C no período de 168 horas. Ao avaliar cada superfície, foi observado que o vidro (Figura 8 A – B) teve pouca adesão microbiana quando comparada com as demais superfícies. Os biofilmes formados no aço inoxidável (Figura 8 C – D) apresentaram uma maior adesão com uma arquitetura bem estruturada. A adesão da cepa de *S. aureus* também foi observada nas superfícies de polipropileno (Figura 9 E – F), polietileno de alta densidade (Figura 9 G – H) e polietileno de baixa densidade (Figura 9 I – J).

Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 a 15°C em superfícies de vidro limpo (A) e vidro com biofilme (B), aço inoxidável limpo (C) e aço inoxidável com biofilme (D). Ampliação 20.000 x.

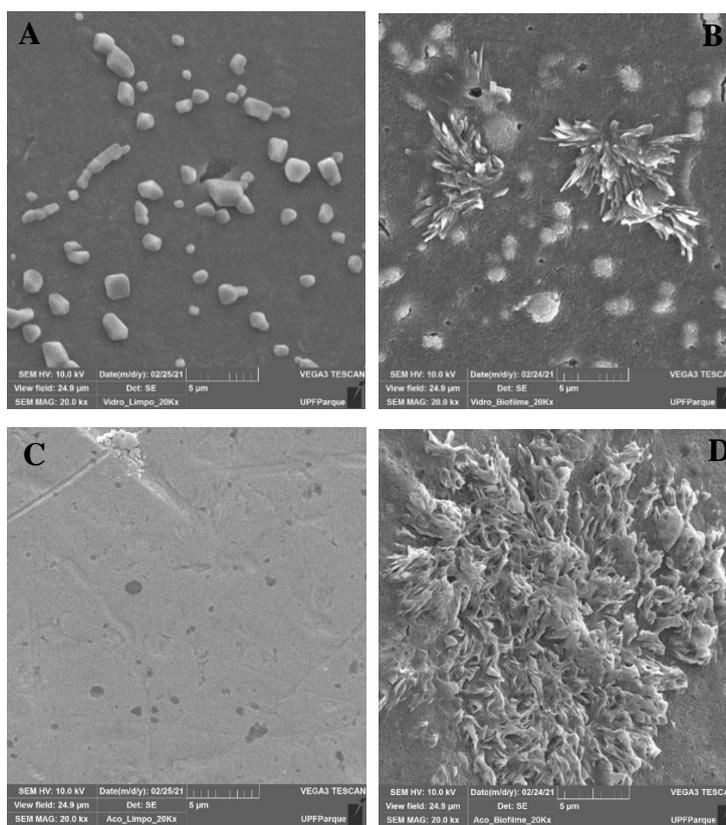
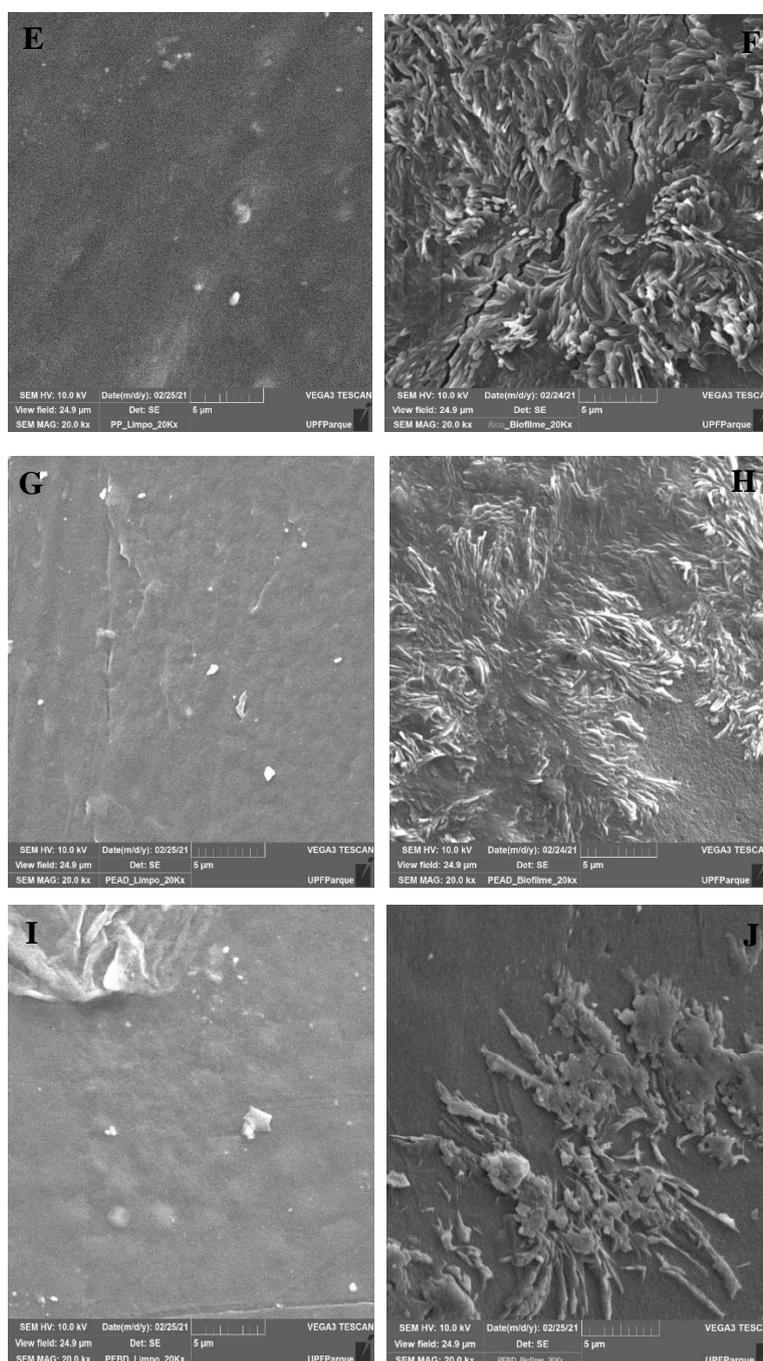


Figura 9: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 a 15°C em superfícies de polipropileno limpo (E) e PP com biofilme (F), polietileno de alta densidade limpo (G) e PAD com biofilme (H) e polietileno de baixa densidade limpo (I) e PBD com biofilme (J). Ampliação 20.000 x.



A microscopia eletrônica de varredura permite a observação entre a interação da bactéria com a superfície de contato e pode ser utilizada como uma técnica semiquantitativa (CICCIO et al., 2015). O isolado de *S. aureus* apresentou alta capacidade de aderir e formar biofilme nas superfícies testadas sob baixas temperaturas de incubação após os sete dias de cultivo. A temperatura de multiplicação na formação de biofilme de *S. aureus* permitiu um efeito significativo na duplicação das células, todavia, além da temperatura, a formação do biofilme é

afetada por vários fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes do meio de cultura, as estruturas extracelulares dos microrganismos, além das propriedades superficiais dos substratos que servirão de suporte no processo de adesão, como a carga elétrica, a hidrofobicidade e a tensão superficial de cada superfície (ARAÚJO et al, 2010).

Os resultados dos ensaios da adesão bacteriana foram usados para avaliar as diferenças entre cada processo de adesão e formação do biofilme para todas as superfícies de contato usadas no estudo. De acordo com as imagens apresentadas do MEV, é possível observar a formação de biofilme em cada tipo de substrato de acordo com os diferentes tipos de fatores existentes para cada superfície, no entanto, as imagens mostram uma variação na estrutura dos biofilmes de acordo com o material aderente. A menor formação na arquitetura do biofilme foi observada no vidro, mesmo a superfície sendo hidrofílica o que facilitaria maior adesão, fatores do meio ou até mesmo da própria superfície podem ter influenciado para que esse processo ocorresse de forma mais lenta. Resultados semelhantes de baixa adesão foram encontrados no estudo de Rodríguez-Melcón et al. (2019), que relataram uma menor produção na arquitetura de biofilme no vidro a partir de cepas de *Listeria* spp.

As superfícies utilizadas nas indústrias de alimentos são frequentemente uma fonte de contaminação cruzada com patógenos alimentares e conseqüentemente causam riscos de intoxicação alimentar. Vidro, aço inoxidável e os polímeros aparecem como os materiais mais comumente utilizados para superfícies de contato com alimentos nas indústrias. Por isso, grande parte dos estudos que avaliam a adesão microbiana utilizam esses tipos de superfícies para verificar a formação dessas grandes comunidades de biofilmes. A adesão nesses materiais acontece da seguinte forma: látex > polietileno > PVC > polipropileno > aço inoxidável > vidro (MEYER, 2003; VIDÁCS et al., 2018). Esses resultados podem explicar os encontrados no presente estudo que obteve respostas de maior adesão nos polímeros e menos adesão no aço inoxidável e no vidro.

De acordo com o presente estudo, as células de *S. aureus* conseguiram se aderir em todos os substratos avaliados. Embora cada tipo de substrato tenha um tipo de carga elétrica, hidrofobicidade e condições ambientais diferentes, foi possível observar que tanto em superfícies hidrofóbicas como hidrofílicas ocorreu esse processo de adesão. Esses resultados podem ser comparados com um recente estudo que explica a capacidade do *S. aureus* de aderir ao vidro (hidrofílico) e ao polietileno (hidrofóbico) (KOUBALI et al., 2021). A adesão microbiana a um substrato é explicada por ser resultado de muitas interações entre a célula microbiana e a superfície de contato, além disso, o efeito da hidrofobicidade na adesão da bactéria ao substrato pode sofrer alterações por diferentes microrganismos e por diferentes materiais (BILGILI et al., 2020).

A superfície do material aderente tem grande influência no fenômeno de adesão bacteriana e, conseqüentemente, com a formação do biofilme. O vidro e o aço inoxidável por exemplo apresentam superfícies hidrofílicas, enquanto os polímeros são hidrofóbicos (BAN et al., 2014). Mas isso não significa que necessariamente essa hidrofobicidade de cada substrato pode determinar em que material a bactéria será aderida de forma mais significativa, levando em consideração que as propriedades das superfícies das células bacterianas podem sofrer modificação por diversos fatores como o tipo de meio de cultura usado, as condições de crescimento e os diferentes métodos de estudos utilizados durante os experimentos (Tomičić et al, 2016). Além disso, a carga da superfície celular também afeta a adesão bacteriana às superfícies por meio de forças eletrostáticas atrativas ou repulsivas (KOUBALI et al., 2021).

Os resultados do presente estudo também podem estar relacionados com a influência da rugosidade e porosidade apresentada por cada superfície avaliada. Como é explicado no estudo realizado por Yu et al. (2021), a rugosidade dos materiais tem influência no aumento da formação do biofilme, dessa forma, o estudo avaliou a rugosidade de quatro superfícies, sendo elas vidro, PVC, aço inoxidável e borracha, dessas superfícies o cupom de vidro apresentou a menor rugosidade. Esses resultados colaboram com os encontrados no presente estudo, que apresenta o vidro como a superfície com menor adesão, diferente por exemplo do aço inoxidável, do polipropileno e polietileno de alta e baixa densidade que obtiveram uma arquitetura mais estruturada de acordo com as imagens apresentadas pelo MEV. Por outro lado, estudos têm mostrado resultados contraditórios ao comparar a rugosidade da superfície com o aumento da adesão bacteriana, como mostra no estudo de Koubali et al., (2021), em que a rugosidade das superfícies não afetou a adesão microbiana, pois a taxa de células de *S. aureus* ATCC 25923 aderidas foi maior no vidro do que no polietileno.

A temperatura também é um fator contribuinte na capacidade de bactérias formarem biofilme, todavia, temperaturas baixas assim como temperaturas altas podem favorecer a adesão microbiana. Neste experimento foi usada a temperatura de 15°C por um período de 7 dias para o desenvolvimento do biofilme por *S. aureus*, essa temperatura foi escolhida devido a sua relevância no processamento de alimentos. Temperaturas de 15°C, 25°C e 37°C foram usadas em um estudo que avaliou a formação de biofilme de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável, e os resultados apresentaram uma multiplicação constante da população de células tanto em 15°C como em 25°C (KIM; KIM; KANG, 2020). Esse estudo colabora com a presente pesquisa que também encontrou um crescimento constante e formação de biofilmes maduros em superfície de aço inoxidável em temperatura de 15°C. A adesão microbiana em superfície de aço inoxidável sob baixas temperaturas utilizando cinco cepas de *S. entérica* também foi observada em um estudo anterior,

dessas cinco cepas, a *S. Typhimurium* apresentou a maior probabilidade de adesão ao aço inoxidável mesmo em uma temperatura baixa de 15 °C (MORAES et al., 2018).

Os resultados de adesão nos polímeros apresentados no presente trabalho mostram que em todos os tipos de materiais utilizados houve o processo de adesão. Observa-se que mesmo os polímeros apresentando propriedades hidrofóbicas, ocorreu essa adesão nas superfícies de contato. Resultados de um estudo apresenta formação de biofilme em superfície de polipropileno e aço inoxidável a partir de cepas de *S. aureus* e de *Salmonella* spp. O estudo consta que o tipo de superfície não teve influência na formação do biofilme por *S. aureus* e *Salmonella* spp. em condições de monoespécie e ambos os microrganismos mostraram a mesma capacidade de desenvolver biofilmes (IÑIGUEZ-MORENO et al., 2018).

As indústrias de processamento de alimentos são ambientes propícios para a proliferação microbiana. Embora haja um excelente controle de qualidade, alguns resíduos orgânicos instalados em áreas de difíceis acesso podem não ser atingidos no momento da limpeza e sanitização, podendo ser fontes de nutrientes para que ocorra o desenvolvimento do biofilme. A formação de comunidades de biofilmes existe como uma excelente estratégia de sobrevivência para a bactéria *S. aureus*, pois o biofilme serve como uma camada protetora podendo ser mais resistente aos ataques ambientais do que as células na forma planctônica (MAIA et al., 2020) e esse fator pode contribuir para a ocorrência de surtos de doenças veiculadas por alimentos.

Dessa forma, a indústria de alimentos deve dar uma atenção mais voltada para a seleção das superfícies de contato com o alimento, além de desenvolver programas de limpeza e higienização com o objetivo de evitar o acúmulo de resíduos alimentares para então prevenir a fixação bacteriana.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados dessa pesquisa revelam que a adesão microbiana a partir da cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 ocorreu em todos os substratos utilizadas no experimento, essa adesão a uma superfície de contato é resultado de muitas interações entre o substrato e a célula aderida. Portanto, para uma melhor compreensão sobre esse fenômeno de adesão microbiana, modelagens preditivas são aplicadas com o objetivo de encontrar respostas satisfatórias na formação do biofilme. No presente estudo foi realizada a modelagem por meio do ComBase Predictor com base no modelo Completo de Baranyi e Roberts e todas as previsões foram satisfatórias para todos os parâmetros obtidos no estudo tanto para as células planctônicas como para as células sésseis. Em relação à temperatura de 15°C utilizada no estudo, indica que mesmo sob baixas temperaturas uma célula microbiana consegue se multiplicar e formar biofilme, apresentando risco de

contaminação para a indústria de alimentos. Dessa forma, de todas as superfícies do estudo, os polímeros apresentaram menor fase de adaptação e maior formação de biofilme nos substratos do que o vidro e o aço que apresentaram uma maior fase de adaptação de acordo com a predição microbiana. Diante disso, é importante estabelecer sempre uma boa manipulação e conservação dos alimentos mesmo sob baixas temperaturas, para que a taxa de multiplicação microbiana seja controlada e que não ocorra danos à saúde do consumidor. Portanto, mais estudos devem ser realizados a fim de prever a multiplicação de outras bactérias patogênicas na formação de comunidades de biofilmes.

4 CONCLUSÃO

A capacidade do *S. aureus* colonizar superfícies que entram em contato com alimentos em baixas temperaturas utilizadas na indústria alimentícia pode contribuir para a persistência da bactéria nos ambientes de processamento de alimentos, aumentando consequentemente os riscos de contaminação cruzada.

Diante disso, ao avaliar a dinâmica da multiplicação do *S. aureus* em suas fases planctônicas e sésseis, foi observado que a partir da predição microbiana é possível verificar todas as etapas em que ocorre essa contaminação durante os processos na indústria. A microbiologia preditiva é uma maneira positiva de prevenir os estágios na formação de comunidade de biofilmes, sendo eficaz na busca de respostas que previnem essa multiplicação dos microrganismos.

Portanto, torna-se cada vez mais necessário a aplicação de estudos que abordem estratégias no controle microbiano, evitando assim possíveis contaminações cruzadas, além disso, é importante melhorar as condições de higiene para controlar o surgimento de biofilmes no setor alimentício para assim evitar os riscos de problemas de saúde pública.

Estudos mais aprofundados são necessários para compreender melhor o fenômeno de adesão do *S. aureus* assim como de outros microrganismos, com a finalidade de analisar todas as características e propriedades das superfícies com possíveis modificações tanto das superfícies dos substratos como das células. Além disso, deve ser explorado mais os diversos modelos existentes de microbiologia preditiva, a fim de encontrar respostas positivas a partir dos diferentes ensaios realizados, para que cada vez mais tenham estudos que contribuam na busca por soluções alternativas na eliminação eficaz dos biofilmes na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABEYSUNDARA, P. A.; DHOWLAGHAR, N.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; MAHMOUD, B.; SHARMA, C. S.; MA, D-P. *Salmonella enterica* growth and biofilm formation in flesh and peel cantaloupe extracts on four food-contact surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 280, p. 17–26, 2018.
- AL-SHABIB, N. A.; HUSAIN, F.M.; AHMAD, I.; BAIG, M.H. Eugenol inhibits quorum sensing and biofilm of toxigenic MRSA strains isolated from food handlers employed in Saudi Arabia. **BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT**, v. 31, n. 2, p. 387–396, 2017.
- AKKERMANS, S.; IMPE, J. F.V. Mechanistic modelling of the inhibitory effect of pH on microbial growth. **Food Microbiology**, 72, p. 214-219, 2018.
- ANDRADE, N. J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.
- ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal Virulence**, v. 2, ed. 5, 2011.
- AZEVEDO, N. F.; CERA, N. Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria. Porto: Publindústria Edições Técnicas, p. 23-50, 2012.
- BAKA, M.; VERHEYEN, D.; CORNETTE, N.; VERCRUYSSSEN, S.; IMPE, J. F. V. *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* dynamics in/on variable (micro)structures of fish-based model systems at suboptimal temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, 240, p. 32–39, 2017.
- BAPTISTA, I.; ROCHA, S. M.; CUNHA, A.; SARAIVA, J. A.; ALMEIDA, A. Innovative Food Science and Emerging Technologies. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 128–149, 2016.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, ed. 3-4, p. 277-294, 1994.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive microbiology. **Int. J. Food Microbiol**, v. 26, p. 199–218, 1995.
- BARBOSA, J.; CUPPINI, M.; FLACH, J.; STEFFENS, C.; CANSIAN, R. L.; TONIAZZO, G. Removal of *Escherichia coli* in boning knives with different sanitizers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 309-315, 2016.
- BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. L. Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 65, n. 10, p. 4543–4548, 1999.

- BAI, M.; LI, C.; CUI, H.; LIN, L. Preparation of self-assembling Litsea cubeba essential oil/diphenylalanine peptide micro/nanotubes with enhanced antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* biofilm. **LWT**, v. 146, artigo 111394, 2021.
- BOATEMAA, S.; BARNEY, M.; DRIMIE, S.; HARPER, J.; KORSTEN, L.; PEREIRA, L. Awakening from the listeriosis crisis: Food safety challenges, practices and governance in the food retail sector in South Africa. **Food Control**, 104, p. 333-342, 2019.
- BRAĀEK, O.B.; MERGHNI, A.; SMAOUI, S.; MASTOURI, M. *Enterococcus lactis* Q1 and 4CP3 strains from raw shrimps: Potential of antioxidant capacity and anti-biofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **LWT - Food Science and Technology** 102, p. 15–21, 2019.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA--Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 22 out. 2019.
- BRIDIER, A.; VIZUETE, P.S.; GUILBAUD, M.; PIARD, J.C.; NAĀTALI, M.; BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, p. 167-178, 2015.
- CHA, Y.; SON, B.; RYU, S. Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. **Food Microbiology**, v. 84, 2019.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 499-511, 1993.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, 49, p. 711-745, 1995.
- CICCIO, P. D.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R. PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; LANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930-936, 2015.
- CREMASCO, M. A. **Operações unitárias em sistemas particulados ou fluidomecânicos**. São Paulo: Blucher, 2012.
- CRUZADO-BRAVO, M.L.M.; SILVA, N.C.C.; RODRIGUES, M.X.; SILVA, G.O.E.; PORTO, E.; STURION, G.L. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. **Food Research International**, 122, p. 450–460, 2019.
- DIALLO, M. A.; BOGAERTS, P. Dynamic microorganism growth modeling for shelf life prediction: application to cooked and brined shrimps. **IFAC-PapersOnLine**, 49-7, p. 230-235, 2016.

DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLU, D.; LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.P. Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. **Food Microbiology**, 53, 76-81, 2016.

FERRER, J.; PRATS, C.; LÓPEZ, D.; REGO, J.V. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 2–8, 2009.

FETSCH, A.; CONTZEN, M.; HARTELT, K.; KLEISER, A.; MAASSEN, S.; RAU, J.; KRAUSHAAR, B.; CAMADA, F.; STROMMENGER, B. Staphylococcus aureus food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1-6, 2014.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª edição, Artmed, 2013.

FUKUDA, K. Food safety in a globalized world. **Bull World Health Organ**, 93, p. 212, 2015.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRATAMICO, P. M.; ANNOUS, B. A.; GUNTHER, N.W. **Biofilms in the Food and Beverage Industries**. CRC Press (Woodhead publishing in food science, technology, and nutrition), Boca Raton, 2009.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; S CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, 97, p. 298-309, 2014.

GIBSON, H.; TAYLOR, J. H.; HALL, K. E.; HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Jornal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1990.

GONZÁLEZ, S.C.; POSSAS, A.; CARRASCO, E.; VALERO, A.; BOLÍVAR, A.; IZQUIERDO, G.D.P.; GIMENO, R.M.G.; ZURERA, G.; RODRÍGUEZ, F.P. MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290 p. 226–236, 2019.

GUILLIER, L. Predictive microbiology models and operational readiness. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 133 – 136, 2016.

GUTIÉRREZ, D.; RODRÍGUEZ-RUBIO, L.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, published: 08 June 2016 doi: 10.3389/fmicb.2016.00825.

GUNVIG, A.; ANDRESEN, M. S.; JACOBSEN, T.; BORGGGAARD, C. Staphtox predictor - A dynamic mathematical model to predict formation of *Staphylococcus* enterotoxin during heating and fermentation of meat products. **International Journal of Food Microbiology**, 285, p. 81-91, 2018.

HUANG, L. IPMP 2013 – A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 100–107, 2014.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; AVILA-NOVOA, M.G. Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries. **International Journal of Food Microbiology**, 303, p. 32–41, 2019.

ISO 18593: 2012. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, p. 8, 2012.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, ed. 1, p. 7-11, 2018.

KANG, J.; JIN, W.; WANG, J.; SUN, Y.; WU, X.; LIU, L. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. **LWT - Food Science and Technology**, 101, p. 639–645, 2019.

KOUBALI, H.; LOUALI, M. E.; ZAHIR, H.; SOUFIANI, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Physicochemical characterization of glass and polyethylene surfaces treated with different surfactants and their effects on bacterial adhesion. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 104, artigo 102754, 2021.

LATORRE, A. A.; VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; ZURAKOWSK, M. J.; PRADHAN, A. K.; BOOR, K. J.; JAYARAO, B. M.; HOUSER, B. A.; DAUGHERTY, C. S.; SCHUKKEN, Y. H. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2792–2802, 2010.

LEE, Y.J.; JUNG, B. S.; KIM, K. T.; PAIK, H. D. Predictive model for the growth kinetics of *Staphylococcus aureus* in raw pork developed using Integrated Pathogen Modeling Program (IPMP) 2013. **Meat Science**, 107, p. 20-25, 2015.

LEROY, S.; LEBERT, I.; ANDANT, C.; TALON, R. Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 326, artigo 108653, 2020.

MAHINKA S. P.; MILLER, A. R.; VAUGHN, J. L. **Conformidade de embalagens de vidro com requisitos de tóxicos na embalagem para saúde e segurança humana e ambiental**. Instituto de Embalagem de Vidro, Arlington VA, 2013.

MCMEEKIN, T. A.; BOWMAN, J.; MCQUESTIN, O.; MELLEFONT, L.; ROSS, T.; TAMPLIN, M. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 2–9, 2008.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, Ed. 4, p. 249-253, 2003.

- MENDONÇA, R. C. S.; MORELLI, A. M. F.; PEREIRA, J. A. M.; CARVALHO, M. M.; SOUZA, N. L. Prediction of *Escherichia coli* O157:H7 adhesion and potential to form biofilm under experimental conditions. **Food Control**, v. 23, ed. 2, p. 389-396, 2012.
- MOGHA, K. V.; SHAH, N. P.; PRAJAPATI, J. B.; CHAUDHARI, A. R. Biofilm - A threat to dairy industry. **Indian J. Dairy Sci.**, 67(6), 2014.
- MORAES, J. O.; CRUZ, E.A.; SOUZA, E.G.F.; OLIVEIRA, T.C.M.; ALVARENGA, V.O.; PEÑA, W.E.L.; SANT'ANA, A.S.; MAGNANI, M. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. **International Journal of Food Microbiology**, 281, 90-100, 2018.
- MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**, v. 5(11), e. 307, p. 2458-2461, 2007. doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307.
- MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, 104 (3), p. 365-376, 2017.
- NUNES, M. M.; CALDAS, E. D. Preliminary Quantitative Microbial Risk Assessment for *Staphylococcus enterotoxins* in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 524-531, 2017.
- NYHAN, L.; BEGLEY, M.; MUTEL, A.; QU, Y.; JOHNSON, N.; CALLANAN, M. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. **Food Microbiology**, v. 74, p. 75-85, 2018.
- OMS. **Doenças transmitidas por alimentos**. 2019. Disponível em: https://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/. Acesso em: 01 out. 2019.
- ORHAN-YANIKAN, E.; SILVA-JANEIRO, S.; RUIZ-RICO, M.; JIMÉNEZ-BELENQUER, A. I.; AYHAN, K.; BARAT, J. M. Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. **Food Control**, 101, p. 29-38, 2019.
- PLAZA-RODRIGUEZ, C.; HABERBECK, L. U.; DESVIGNES3, V.; DALGAARD, P.; SANAA, M.; NAUTA, M.; FILTER, M.; GUILLIER, L. Towards transparent and consistent exchange of knowledge for improved microbiological food safety. **Current Opinion in Food Science**, 19, p. 129-137, 2018.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. V. 1 2.ed. São Paulo, SP: Pearson Makron Books, 1997. 524p.
- RODRIGUES, J. B. S.; CARVALHO, R. J.; SOUZA, N. T.; OLIVEIRA, K. S.; FRANCO, O. L.; SCHAFFNER, D.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 73, p. 1237-1246, 2017.
- RODRÍGUEZ-MELCÓN, C.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Architecture and Viability of the Biofilms Formed by Nine *Listeria* Strains on Various Hydrophobic and Hydrophilic Materials. **Applied Sciences**, v. 9, artigo 5256, 2019. doi:10.3390/app9235256.

SHAO, L.; DONG, Y.; CHEN, X.; XU, X.; WANG, H. Modeling the elimination of mature biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Using combined ultrasound and disinfectants. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 69, artigo 105269, 2020.

SILVA, D. C.; LOPES, S. M.; AQUINO, N. S. M.; ELIAS, S. O.; DUDA, H. A.; TONDO, E. C. Mathematical modelling and validation of *Salmonella enterica* growth in sushi exposed to different time-temperature scenarios found in real sushi establishments. **Food Research International**, v. 136, artigo 109609, 2020.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SILVEIRA, A. F. N. **Manual de Métodos de Análise Microbiologia de Alimentos e Água**. 5ª ed. São Paulo: Blucher, 560p. 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. 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.

SCHERBA, G.; EIGEL, R. M.; O'BRIEN, W. D. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2079-2084, 1991.

SOUZA, E. L.; MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; CONCEIÇÃO, M. L.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, 67-75, p. 2014.

TANGO, C.N.; AKKERMANS, S.; HUSSAIN, M.S.; KHAN, I.; IMPE, J.V.; JIN, Y.G.; OH, D.H. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v. 76, p. 287–295, 2018.

TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. **Food Microbiology**, 45, p. 290-299, 2015.

TOMIČIĆ, R. M.; ČABARKAPA, I. S.; VUKMIROVIĆ, Đ. M.; LEVIĆ, J. D.; TOMIČIĆ, Z. M. Influence of growth conditions on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. **Food Feed Res**, 43, 19-24, 2016.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, ISSN 1364-5072, p. 1117–1131, 2010.

VIDÁCS, A.; KERÉKES, E.; RAJKO, R.; PETKOVITS, T.; ALHARBI, N. S.; KHALED, J. M.; VÁGVÖLGYI, C.; KRISCH, J. Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p. 257-262, 2018.

VAEZI, S. S.; POORAZIZI, E.; TAHMOURESPOUR, A.; AMINSHAREI, F. Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH, time, NaCl and ethanol

concentrations on the biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, artigo 103986, 2020.

WEBBER, B.; CANOVA, R.; ESPER, L. M.; PERDONCINI, G.; NASCIMENTO, V.; PILOTTO, F.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. The use of vortex and ultrasound techniques for the in vitro removal of *Salmonella* spp. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-5, 2015.

XU, Z.; XIE, J.; SOTEYOME, T.; PETERS, B.M.; SHIRTLIF, M.E.; LIU, J.; HARRO, J.M. Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. **Current Opinion in Food Science**, 26, p. 57–64, 2019.

ZHAO, X.; ZHAO, F.; WANG, J.; ZHONG, N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC Advances**, Ed. 58, 2017.

ZHANG, Y.; LI, G.; WU, D.; LI, X.; YU, Y.; LUO, P.; CHEN, J.; DAI, C.; WU, Y. Recent advances in emerging nanomaterials based food 2 sample pretreatment methods for food safety screening. **Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

ZHANG, L.; LIANG, E.; CHENG, Y.; MAHMOOD, T.; GE, F.; ZHOU, K.; BAO, M.; LV, L.; LI, L.; YI, J.; LU, C.; TAN, Y. Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, artigo 110184, 2020.

APÊNDICE A – Média e desvio padrão da contagem de células séssil em superfícies de vidro, aço inoxidável, polipropileno, polietileno de alta densidade e polietileno de baixa densidade

Célula Séssil 15°C					
\log^{10} UFC/cm ²					
Tempo	Vidro	Aço inoxidável	Polipropileno	Polietileno Alta Densidade	Polietileno Baixa Densidade
0	0,698 ± 0,173 ^{ab}	0,602 ± 0 ^a	1,309 ± 0,281 ^b	2,360 ± 0,099 ^c	2,291 ± 0,207 ^c
24	0,857 ± 0,241 ^{ab}	0,602 ± 0 ^a	1,309 ± 0,281 ^b	3,055 ± 0,020 ^{de}	2,257 ± 0,107 ^c
48	2,319 ± 0,175 ^c	2,265 ± 0,201 ^c	1,309 ± 0,281 ^b	4,328 ± 0,142 ^{gh}	3,286 ± 0,189 ^{ef}
72	4,105 ± 0,093 ^{gh}	3,814 ± 0,134 ^{fg}	2,773 ± 0 ^{cde}	5,479 ± 0,031 ^{klm}	4,378 ± 0,202 ^{ghi}
96	4,605 ± 0,239 ^{hij}	4,452 ± 0,092 ^{hij}	2,543 ± 0,522 ^{cd}	7,606 ± 0,054 ^q	5,431 ± 0,090 ^{klm}
120	5,522 ± 0,026 ^{klmn}	5,057 ± 0,195 ^{jk}	5,003 ± 0,414 ^{ijk}	6,484 ± 0,248 ^{op}	5,923 ± 0,070 ^{lmno}
144	6,057 ± 0,108 ^{mno}	5,562 ± 0,170 ^{klmn}	6,327 ± 0,150 ^{op}	6,895 ± 0,181 ^p	6,146 ± 0,163 ^{no}
168	4,654 ± 0,298 ^{hij}	5,044 ± 0,048 ^{jk}	5,335 ± 0,097 ^{kl}	5,408 ± 0,052 ^{kl}	5,489 ± 0,069 ^{klm}

APÊNDICE B - ARTIGO DE REVISÃO

Uma abordagem do uso de microbiologia preditiva para formação de biofilmes

An approach on the use of predictive microbiology for biofilm formation

Un enfoque al uso de microbiología predictiva para la formación de biofilms

O artigo foi publicado na revista Research, Society and Development, v. 9, n. 8, e90985117, 2020 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5117>

Recebido: 30/05/2020 | Revisado: 06/06/2020 | Aceito: 11/06/2020 | Publicado: 25/06/2020

Jaqueline da Silva Rumão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1794>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: jaquelinne93@hotmail.com

Christian Oliveira Reinehr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4710-3635>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: reinehr@upf.br

Resumo

É necessário garantir a qualidade e a segurança dos alimentos durante todas as etapas da produção de alimentos. O grande desafio no setor de alimentos é o controle da multiplicação microbiana, pois os microrganismos estão buscando alternativas, que envolvem o seu desenvolvimento tanto na forma livre quanto em biofilmes, para sobreviver a ataques ambientais. Devido a essa preocupação, os pesquisadores usam novas estratégias para entender a dinâmica do crescimento microbiano. Nesse contexto, a microbiologia preditiva está ganhando espaço na microbiologia de alimentos. O objetivo do estudo foi verificar se os atuais modelos preditivos são adequados para prever também o crescimento de células sésseis além das planctônicas. Realizou-se um levantamento bibliográfico sobre a aplicação da microbiologia preditiva na avaliação do controle de segurança alimentar e concluiu-se que, devido à escassez de estudos, não foi possível afirmar a adequação de modelos terciários no controle de biofilmes durante a produção de alimentos. Destaca-se a necessidade de estudos que possam modelar a formação de biofilme de patógenos sob diferentes fatores ambientais.

Palavras-chave: Análise bibliométrica; Células planctônicas; Células sésseis; Controle de qualidade; Predição microbiana.

Abstract

It is necessary to ensure food quality and safety during all stages of food production. The major challenge in the food sector is the control of microbial multiplication, as microorganisms are increasingly looking for alternatives, which involve their development, both in free form as in biofilm, to survive environmental attacks. Due to this concern, researchers use new strategies to understand the dynamics of microbial growth. In this context, predictive microbiology is gaining space in food microbiology. Therefore, the objective of the study was to verify whether the current predictive models are adequate to predict the growth of sessile cells, as well as planktonic cells. A bibliographic survey on the application of predictive microbiology in the evaluation of food safety control was carried out, and we concluded that, due to the scarcity of studies, it was not possible to state the adequacy of tertiary models in the control of biofilms during food production. We highlight the need for studies that can model the formation of biofilm of pathogens under different environmental factors.

Keywords: Bibliometric analysis; Microbial prediction; Planktonic cells; Quality control; Sessile cells.

Resumen

Es necesario garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos durante todas las etapas de la producción de alimentos. El principal desafío en el sector alimentario es el control de la multiplicación microbiana, ya que los microorganismos buscan alternativas, que implican su desarrollo tanto en forma libre como en biofilms, para sobrevivir a los ataques ambientales. Debido a esta preocupación, los investigadores utilizan nuevas estrategias para comprender la dinámica del crecimiento microbiano. En este contexto, la microbiología predictiva está ganando espacio en la microbiología de los alimentos. El objetivo del estudio fue verificar si los modelos predictivos actuales son adecuados para predecir el crecimiento de células sésiles, así como se usan para planctónicas. Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la aplicación de la microbiología predictiva en la evaluación del control de seguridad alimentaria. Con base en la investigación realizada, se concluyó que, debido a la escasez de estudios, no fue posible afirmar la idoneidad de los modelos terciarios en el control de las biopelículas durante la producción de alimentos. Destacamos la necesidad de estudios que puedan modelar la formación de biopelículas de patógenos bajo diferentes factores ambientales.

Palabras clave: Análisis bibliométrico; Células planctónicas; Células sésiles; Control de calidad; Predicción microbiana.