

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

Amauri Picollo de Oliveira

**Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis de surtos
de doenças transmitidas por alimentos**

Passo Fundo

2016

Amauri Picollo de Oliveira

**Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis de surtos
de doenças transmitidas por alimentos**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Laura Beatriz
Rodrigues

Passo Fundo

2016

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

Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis de surtos de doenças
transmitidas por alimentos

Elaborada por
Amauri Picollo de Oliveira

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

Comissão Examinadora


Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)


Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF


Kelly Cristina Tagliari de Brito, Dra., Fepagro

Passo Fundo, RS, Brasil
2016

CIP – Catalogação na Publicação

O48d Oliveira, Amauri Picollo de
Dinâmica de formação de biofilmes por Salmonella
Enteritidis de surtos de doenças transmitidas por
alimentos / Amauri Picollo de Oliveira. – 2016.
57 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Salmonela. 2. Biofilme. 3. Intestinos - Doenças.
4. Alimentos – Contaminação. I. Rodrigues, Laura Beatriz,
orientadora. II. Título.

CDU: 664:615.9

Catalogação: Bibliotecária Cristina Troller - CRB 10/1430

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos e à minha orientadora, pelo apoio, incentivo e carinho. À vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua presença constante em minha vida e amparo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Isaque e Noemy, por todo o apoio e carinho, e aos quais devo todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Gilvane e Atílio Marcos, pela amizade e apoio.

À Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de realização desse curso e pelo aprendizado.

À Professora Laura Beatriz Rodrigues, querida orientadora e amiga, por acreditar na minha capacidade, estar sempre disposta a ajudar, pela dedicação, orientação e eterno exemplo profissional e pessoal. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Professora Luciana Ruschel dos Santos, pela ajuda valiosa e ensinamentos.

À Professora Luciane Daroit, pelo empenho e dedicação na realização da análise estatística do projeto, sem você não seria possível.

À Bruna Webber, pela amizade e companheirismo na realização do projeto, sem você não seria possível.

Aos seletos professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial ao coordenador Professor Luiz Carlos Gutikoski.

A todos os funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário, em especial a Alana da Silva, a Lisangela Rizzardi e a Natalie Rizzo.

Aos colegas de mestrado, em especial a Eduarda Martello, pela amizade e ajuda na execução do projeto.

Aos integrantes do Grupo de Estudos Microbiológicos: Alexandra da Silva, Denise Tedesco, Edinara Lima, Emanuele Pottker, Henrique Bilibio, Jéssica Mandelli, Jonas Klein, Juliana Orsato, Kristian Kissmann, Renata Mattiello, Roger Pascoeti, Tálisson Zanotto e Willian Ribeiro, pela constante ajuda na realização deste trabalho, sem vocês nada disso seria possível.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do projeto.

À FAPERGS pelo apoio financeiro deste projeto e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

A *Salmonella* Enteritidis (SE) é capaz de formar biofilmes e permanecer no ambiente de processamento, havendo maior chance de transmissão aos alimentos processados, representando grandes riscos à segurança alimentar, podendo levar a surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo de extrema relevância para a saúde pública. A indústria alimentícia possui diversos materiais que compõem as superfícies dos equipamentos de processamento de alimentos. Por mais que se realizem os procedimentos de higienização rotineiros, existe possibilidade de agregação de matéria orgânica e maior probabilidade de adesão de microrganismos patogênicos nestas superfícies, reconhecidas fontes de contaminação microbiana, além do aumento da resistência aos sanitizantes, característica preocupante dos biofilmes microbianos. Dessa forma, avaliou-se a capacidade da SE formar biofilme em diferentes superfícies, mimetizando procedimentos de higiene pré-operacional e operacional para removê-los das superfícies de contato com alimentos. Para tanto, superfícies de poliuretano, polietileno e aço inoxidável, comumente utilizadas em abatedouro, foram utilizadas como corpos de prova, imersas em culturas de *Salmonella* Enteritidis e incubadas a $3\pm 1^\circ\text{C}$, $9\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$ e $42\pm 1^\circ\text{C}$. Os tempos de incubação foram de 0, 4, 8, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene operacional e pré-operacional em abatedouros de aves. Foram realizados testes com o uso de água estéril aquecida a 45°C e a 85°C , nas quais os corpos de prova permaneceram imersos por 3 minutos, e em soluções com os sanitizantes ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1%, nos quais os corpos de prova permaneceram imersos por 5 minutos, simulando a higiene operacional e pré-operacional utilizada em abatedouros avícolas. A aderência bacteriana indicou que ambas as SE aderiram no aço inoxidável, no polietileno e no poliuretano. A SE 24 e a SE 69 aderiram sob todas as temperaturas de exposição, 3°C , 9°C , 25°C , 36°C e 42°C , aumentando a adesão conforme aumentava a temperatura. Não houve diferença estatística na formação dos biofilmes após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação em cada amostra. O ácido peracético revelou-se o melhor tratamento na remoção dos biofilmes. A amônia quaternária e a água a 85°C removeram o biofilme, mas com menor eficácia comparando com o ácido peracético. De maneira geral, os resultados demonstraram que esses materiais, utilizados na indústria de alimentos, propiciaram a aderência das SE nas diferentes condições ambientais. Enfatiza-se a formação de biofilmes em temperaturas de refrigeração, principalmente a 3°C , descrita primeiramente por nosso grupo de pesquisa como possível para crescimento de *Salmonella* Enteritidis nestas superfícies. Nossos resultados são importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e pode auxiliar a indústria avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos abatedouros, levando a um aprimoramento das condições higiênicas destes estabelecimentos.

Palavras-chave: Biofilmes, DTA, *Salmonella* Enteritidis.

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis (SE) is able to form biofilms and remain in the processing environment, with bigger chance of transmission to processed foods, representing major risks to food safety and may lead to outbreaks of foodborne illness, and is extremely relevant to public health. The food industry has various materials which compose the surfaces of food processing equipment. Although perform the routine hygienisation procedures, there is a possibility of aggregation organic material and higher probability adhesion of pathogenic microorganisms in these areas, recognized sources of microbial contamination, and increased resistance to sanitizers, worrying feature of microbial biofilms. Thus, we evaluated the SE ability to form biofilms on different surfaces, mimetizing the pre-operational and operational hygiene procedures to remove them from the surfaces of food contact. Therefore, surfaces of polyurethane, polyethylene and stainless steel, commonly used in slaughterhouse, were used as test samples immersed in *Salmonella* Enteritidis cultures and incubated at $3\pm 1^\circ\text{C}$, $9\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$ and $42\pm 1^\circ\text{C}$. Incubation times were 0, 4, 8, 12 and 24 hours, simulating the periods of operational and pre-operational hygiene in poultry slaughterhouses. Tests were performed using sterilized water heated at 45°C and 85°C , in which the samples remained immersed for 3 minutes, and sanitizers solutions with 0.5% peracetic acid and 1% quaternary ammonium in which the samples remained immersed for 5 minutes, simulating operational and preoperational hygiene used in poultry slaughterhouses. Bacterial adherence showed that both SE adhered in stainless steel, polyethylene and polyurethane. As regards the exposure temperatures, SE 24 and SE 69 adhered to 3°C , 9°C , 25°C , 36°C and 42°C , increasing the adhesion with increase in temperature. There was no statistical difference in the formation of biofilms after 4, 8, 12 and 24 hours of incubation in each sample. Peracetic acid has proved to be the better treatment for the removal of biofilms. Quaternary ammonia and water to 85°C removed the biofilm, but with less effective compared with the peracetic acid. Overall, the results demonstrated that these materials used in the food industry, results in the adherence of SE in different environmental conditions. Emphasizes the formation of biofilms in refrigeration temperature, especially at 3°C , first described by our research group as possible for growth of *Salmonella* Enteritidis on these surfaces. Our results are important for the development of strategies to control *Salmonella* Enteritidis biofilms and may assist the poultry industry to have a better understanding of the actual conditions of the slaughterhouses, leading to an improvement of the hygienic conditions of these establishments.

Key-words: Biofilms, Foodborne illness, *Salmonella* Enteritidis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teoria de formação de biofilmes em três etapas: fixação, colonização e multiplicação.	28
Figura 2 - Teoria de formação de biofilmes em cinco etapas: eventos de pré-adesão, adesão reversível, adesão irreversível, maturação e destacamento.	28
Figura 3 - Corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano provenientes de abatedouros avícolas.	36
Figura 4 - Formação de biofilme em todas as superfícies, temperaturas e tempos testados. ...	37
Figura 5 - Remoção de biofilme de <i>S. Enteritidis</i> proveniente de surtos de DTA em aço inoxidável, por diferentes procedimentos de higienização.	45
Figura 6 - Remoção de biofilme de <i>S. Enteritidis</i> proveniente de surtos de DTA em polietileno, por diferentes procedimentos de higienização.	46
Figura 7 - Remoção de biofilme de <i>S. Enteritidis</i> proveniente de surtos de DTA em poliuretano, por diferentes procedimentos de higienização.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> em todas as superfícies e condições ambientais testadas.	39
Tabela 2 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> em aço inoxidável, polietileno e poliuretano, sob todas as temperaturas de incubação.	40
Tabela 3 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> sob diferentes temperaturas de incubação em todas as superfícies testadas.	42
Tabela 4 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> sob diferentes tempos de incubação em todas as superfícies e temperaturas testadas.	43
Tabela 5 - Médias das repetições da quantificação da remoção de biofilmes por duas cepas de <i>S. Enteritidis</i> provenientes de surtos de DTA, nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano frente a diferentes procedimentos de higienização.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

AP: Água Peptonada 0,1%

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BHI: Caldo Brain-Heart Infusion

BPF: Boas Práticas de Fabricação

DTA: Doenças transmitidas por alimentos

EPS: Substâncias poliméricas extracelulares

FAMV: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

GSS: Programa *Global Salm-Surv*

KWL: Esquema *Kauffmann-White-LeMinor*

PCA: Ágar Padrão de Contagem

PNSA: Programa Nacional de Sanidade Avícola

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis

SE: *Salmonella* Enteritidis

SIF: Serviço de Inspeção Federal

TSB: Caldo Triptona de Soja

UE: União Europeia

UPF: Universidade de Passo Fundo

WHO: *World Health Organization*

XLD: Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	GÊNERO <i>SALMONELLA</i>	25
2.2	FORMAÇÃO DE BIOFILMES.....	27
2.2.1	Biofilmes de <i>Salmonella</i>	30
2.3	HIGIENIZAÇÃO EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS.....	30
2.4	TEMPERATURAS PRECONIZADAS EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS ..	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	AMOSTRAS DE SE	35
3.2	PREPARAÇÃO DE CORPOS DE PROVA	35
3.3	FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	36
3.4	AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO.....	36
3.5	REMOÇÃO DO BIOFILME	37
3.6	DETERMINAÇÃO DOS RESULTADOS	38
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	VARIABILIDADE DAS AMOSTRAS DE SE	39
4.2	FORMAÇÃO DE BIOFILME NAS DIFERENTES SUPERFÍCIES	40
4.3	EFEITO DAS TEMPERATURAS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME	41
4.4	EFEITO DO TEMPO NA FORMAÇÃO DO BIOFILME	43
4.5	TRATAMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO	44
5	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* Enteritidis (SE) é uma das bactérias que mais causam doenças transmitidas por alimentos (DTA) em todo o mundo, estando relacionada frequentemente em surtos de origem alimentar, geralmente associados ao consumo de carne de aves e ovos, acarretando em prejuízos econômicos em vários países (WHO, 2016).

Quando capazes de formar biofilmes em superfícies em contato com os alimentos, possuem maior chance de transmissão aos alimentos processados, contribuindo para surtos de infecções alimentares (VAN HOUTT; MICHELS, 2010).

O controle da formação de biofilmes é importante para a segurança dos alimentos, devido à adesão das bactérias em superfícies e utensílios em contato com os alimentos e sua difícil remoção com agentes sanitizantes. Como estes biofilmes liberam células planctônicas, que são células que se desprendem dos biofilmes, estas células livres contaminam o alimento, estando os biofilmes associados aos surtos de doenças alimentares (VAN HOUTT; MICHELS, 2010).

Como a *S. Enteritidis* é o principal sorovar isolado em humanos e alimentos e um dos principais isolados em animais, rações e amostras ambientais, além de ser um grande causador de infecções alimentares (WHO, 2012). Torna-se essencial sua pesquisa, visto que o conhecimento das características da *S. Enteritidis* e sua habilidade em formar biofilmes em superfícies, assim como o agente de sanitização mais eficiente para a redução e/ou eliminação deste problema é de grande importância para as indústrias de alimentos.

Realizar um experimento com cepas de *S. Enteritidis* provenientes de surtos, avaliando a formação de biofilmes e mimetizando procedimentos de higiene pré-operacional e operacional em superfícies de contato com alimentos, é de grande relevância na avaliação das condições higiênico-sanitárias de abatedouros avícolas, por auxiliar a indústria avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos abatedouros no Brasil, levando a um aprimoramento das condições higiênicas destes estabelecimentos.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a dinâmica de formação de biofilmes por *S. Enteritidis*, provenientes de surtos de DTA, em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, em diferentes condições ambientais, e mimetizar os procedimentos de higiene operacional e pré-operacional utilizando os tratamentos com água quente a 45°C, água quente a 85°C, ácido peracético e amônia quaternária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *SALMONELLA*

O gênero *Salmonella* é pertencente à família Enterobacteriaceae. Sua classificação reconhecida atualmente inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última com seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*.

No ano 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL) para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas. Os sorovares devem ser escritos com a primeira letra maiúscula, ou seja, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, denominada comumente *S. Enteritidis* (GRIMONT; WEILL, 2007).

A *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de endoesporos e com formato de bastonetes curtos. A maioria das espécies são móveis, com flagelos peritríquios. Fermenta a glicose produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Possuem como temperatura ótima de crescimento aproximadamente 38°C e a temperatura mínima em torno de 5°C. São relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2002).

A salmonelose é uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças alimentares. Constitui uma grande responsabilidade em saúde pública e representa um custo significativo em muitos países. Milhões de casos em seres humanos são mundialmente relatados todos os anos e a doença resulta em milhares de mortes (WHO, 2016).

No Brasil, no ano de 2015, até o mês de outubro, o Ministério da Saúde registrou 426 surtos de DTA, abrangendo 18.766 pessoas expostas, com 7.371 doentes e 4 óbitos, sendo 58,5% dos agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA não identificados e em seguida 14,4% causados por *Salmonella* spp. (BRASIL, 2015).

No Rio Grande do Sul, de 1980 a 2012, foram notificados 4.071 surtos de DTA, abrangendo 358.161 pessoas expostas ao risco de adoecer e internar por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa, com 49.451 doentes e 11 óbitos. A *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 60% dos surtos investigados (RIO GRANDE DO SUL, 2013).

Em 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com a Instrução Normativa nº 70 institui o Programa de Redução de Patógenos, visando conferir um controle sobre o processo de abate em carcaças de frango para pesquisa de *Salmonella* sp., envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com isso atendendo as exigências de segurança do alimento no mercado interno e externo (BRASIL, 2003a).

Aliado a isso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com a Instrução Normativa nº 78, reforçou a legislação de controle de sorotipos de *Salmonella* spp. nas granjas avícolas, enfatizando o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), contemplando que toda granja de reprodutoras de aves deve ser sorológica e bacteriologicamente monitorada para detecção de *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2003b).

A *Salmonella* Enteritidis (SE) vem se destacando como o sorotipo mais comum nos seres humanos, sendo a principal causadora de surtos de doenças transmitidas por alimentos, especialmente na Europa, onde responde por 85% dos casos (MILJKOVIC-SELIMOVIC et al., 2010).

Segundo dados da *World Health Organization* (WHO, 2012), em seu programa *Global Salm-Surv* (GSS), até o ano de 2012 a SE está entre os 15 sorovares mais sorotipificados de amostras de animais, meio ambiente e na alimentação animal. Entretanto, a SE não está na primeira posição do ranking nestas amostras. Em contrapartida, é o sorovar mais detectado em seres humanos e o segundo mais prevalente em alimentos para alimentação humana. Resultados semelhantes são reportados em outros países, o que torna a pesquisa de SE essencial por ser um dos mais incidentes em infecções alimentares no mundo.

A *S. Enteritidis* foi identificada como causadora da maioria das salmoneloses alimentares investigadas pela Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul nos últimos anos (RIO GRANDE DO SUL, 2013) e, dentre as fontes de contaminação de SE, as carnes e produtos à base de ovos são as mais importantes, sendo a carne de frango o veículo em numerosos casos de infecções humanas, gerando no homem quadros de salmonelose (PERESI et al., 1999). Considerada um dos enteropatógenos humanos mais frequentemente associados ao trato digestório das aves, e originando-se de diferentes fontes do ambiente avícola (CARDOSO et al., 2000), se torna essencial o seu controle em abatedouros avícolas, por possuir relevância como causadora de doenças veiculadas por alimentos e, conseqüentemente, além das preocupações de saúde pública, terem reflexo econômico, causando perdas no mercado interno e em exportações.

2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

A microbiologia tradicional caracterizou durante anos as células encontradas em suspensões, denominadas como planctônicas, ou seja, de vida livre. Entretanto, as primeiras observações de células aderidas foram realizadas em 1683, por Antonie van Leuwenhoek que, estudando amostras de dente, em seu microscópio, notou mais fragmentos de células agregadas (sésseis) do que planctônicas. A capacidade das bactérias de formar comunidades complexas e viver em agregados foi estudada desde os tempos de Robert Koch (CAIXETA, 2008).

A primeira publicação que descreve biofilmes foi descrita por Zobell em 1943, que iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em diferentes tipos de superfície que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas (ZOBELL, 1943).

Em 1978, técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas foram empregadas por Costerton, o qual verificou que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava fixo a suportes, e não na forma livre. Aos microrganismos aderidos foi atribuído o nome de biofilme (COSTERTON et al., 1995).

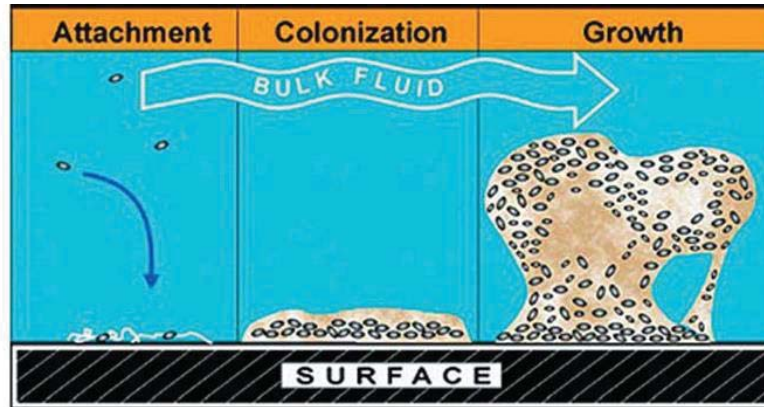
Biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multi-espécies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), aderidas a um substrato biótico ou abiótico, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os biofilmes podem estar aderidos a qualquer superfície, que por sua vez são envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, local onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, denominados glicocálice e, atualmente, conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (COSTERTON et al., 1999). A adesão superficial dos microrganismos forma o EPS, que sobrevive a ambientes hostis, de modo a bloquear e reter os nutrientes necessários para o crescimento dos biofilmes, além de oferecer proteção às células planctônicas contra agentes antimicrobianos (TORTORA et al., 2000).

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, debaixo das quais os microrganismos continuam a se multiplicar, seja em cultivo puro ou em associação com outros microrganismos. Sendo assim, nos biofilmes os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (MARQUES, 2005).

A formação dos biofilmes segundo Notermans et al. (1991), consiste em três etapas (Figura 1), que seria a fixação das bactérias, seguida pela consolidação das bactérias nas superfícies e, por último, a colonização e a multiplicação das bactérias nas superfícies.

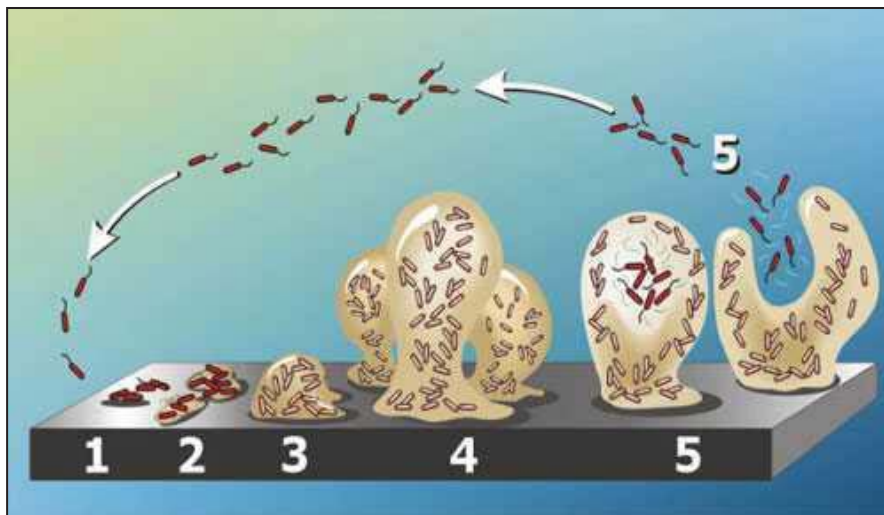
Figura 1 - Teoria de formação de biofilmes em três etapas: fixação, colonização e multiplicação.



Fonte: PIZZOLITTO, 2016.

Outra teoria (Figura 2) sugere a formação de biofilmes em cinco etapas: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; II) transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; III) início do processo de adesão bacteriana; IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível e V) biofilme com alta atividade metabólica e liberação de células localizadas na periferia (CHARACKLIS, 1984).

Figura 2 - Teoria de formação de biofilmes em cinco etapas: eventos de pré-adesão, adesão reversível, adesão irreversível, maturação e destacamento.



Fonte: STOODLEY et al., 2002.

Depois do contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando a formação das matrizes dos biofilmes, e dentro das matrizes, outras substâncias orgânicas e inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com microrganismos. A produção de EPS aumenta conforme a adesão das bactérias às superfícies (KUMAR; ANAND, 1998).

Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando fragmentos ou células planctônicas dos microrganismos, como *Salmonella* spp., podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos (FUSTER-VALLS et al., 2008).

Microrganismos em seu estilo de vida sésil resistem significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. Pesquisadores relatam que estas células sejam quinhentas a mil vezes mais resistentes que as células planctônicas (COSTERTON et al., 1995), devido a rede de EPS, uma barreira física que impede ação de agentes sanitizantes.

A formação do biofilme pelas células bacterianas gera susceptibilidade reduzida aos desinfetantes, tornando a sua eliminação de instalações de processamento de alimentos um grande desafio. A limpeza imprópria, assim como a desinfecção de equipamentos realizada de maneira ineficaz, é uma das principais fontes de contaminação dos produtos em uma indústria de alimentos, gerando um impacto negativo em várias atividades, representando perdas significativas para indústrias alimentícias (JESSEN; LAMMERT, 2003).

Diversas técnicas de microscopia podem ser utilizadas para a visualização dos processos de aderência, crescimento e formação do biofilme. A visualização da microtopografia dos biofilmes é muito importante, pois fornece a possibilidade de análise desde o início dos agregados celulares até a formação praticamente consolidada das EPS, além da observação de rugosidade dos materiais. De acordo com Wimpenny et al. (2000), a microscopia eletrônica de varredura pode ser uma informação útil sobre a superfície estrutural de um biofilme, apresentando mais um dado para o trabalho, enriquecendo a pesquisa sobre biofilmes.

2.2.1 Biofilmes de *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é capaz de formar biofilmes de forma significativa em diferentes tipos de materiais: abióticos, como, plástico, borracha, vidro e aço inoxidável, ou bióticos, como plantas, células epiteliais e cálculos biliares, possuindo uma habilidade que contribui para a sua resistência e persistência em ambos os ambientes de acolhimento (STEENACKERS et al., 2012).

Biofilmes formados por *Salmonella* spp. em equipamentos e superfícies de processamento de alimentos servem como um reservatório persistente de contaminação, comprometendo a segurança alimentar e a saúde humana (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010), como a adesão em superfícies de aço inoxidável e polietileno (MANIJEH et al., 2008).

A celulose é um dos principais componentes do biofilme produzido por *S. Enteritidis*, representando um fenótipo essencial do ciclo de vida do organismo para uma melhor adaptação da sobrevivência bacteriana no ambiente e maior probabilidade de colonização em um hospedeiro animal (SOLANO et al., 2002).

Rodrigues et al. (2009), avaliando a formação de biofilmes em placas de poliestireno por *S. Heidelberg* isoladas de abatedouros avícolas verificou que todas as amostras foram capazes de formar biofilmes no caldo TSB sem glicose, porém, no caldo TSB com 0,5%, 1% e 1,5% de glicose, todas as amostras foram fracamente formadoras de biofilmes e no caldo TSB com 2% a 4% de glicose a maioria das amostras não formou biofilme, o que demonstra a capacidade de desenvolvimento de biofilmes em ambientes sem glicose.

2.3 HIGIENIZAÇÃO EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS

Segundo a AviSite (2016), em 2015 a produção brasileira de carne de frango chegou a 13,146 milhões de toneladas, volume 3,58% superior ao registrado no ano de 2014. Com este resultado, o Brasil se consolidou como segundo maior produtor de carne de frango do mundo, superando a China, que ocupava o segundo lugar, atrás dos Estados Unidos.

A indústria avícola brasileira tem um bom desempenho devido a sistemas de tecnologia avançados que fazem do Brasil o maior exportador mundial de carnes de frango, permitindo à população adquirir um produto de boa qualidade a baixos custos (FURLAN, 2000). Aliado a isso se tem a necessidade de manutenção da sanidade dos plantéis avícolas e, também, das condições higiênico-sanitárias dentro dos abatedouros.

A higiene nas indústrias de alimentos avícolas se inserem dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos programas de qualidade, como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), visando à obtenção de alimentos seguros. Durante o processo de fabricação de alimentos, ocorre acúmulo de materiais indesejáveis, como restos de alimentos, substâncias químicas do processo e microrganismos. Esses materiais indesejáveis são designados de “resíduos” ou “sujidade” (AESBUC, 2016).

No processo de fabricação vários tipos de superfícies são utilizadas no processamento do alimento, como o aço inoxidável e os polímeros, que sofrem desgastes com o uso repetido e aumentam a possibilidade do acúmulo de sujidades e bactérias (HOLAH; THORPE, 1990). Dentre os materiais mais utilizados em equipamentos para a preparação de alimentos, tanto em nível industrial quanto doméstico, o aço inoxidável tem sido o material de escolha devido à sua resistência à corrosão e oxidação, por ter uma maior durabilidade, por ser de fácil fabricação e também por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com cobre, alumínio e com a ampla variedade de polímeros (HOLAH; THORPE, 1990; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Para o processamento de alimentos, também se destacam as esteiras de poliuretano e os utensílios fabricados com polietileno, principalmente placas de corte. Um dos principais cuidados com essas placas é a contaminação cruzada, a qual está muito relacionada com a capacidade de adesão das bactérias contaminantes, principalmente por *Salmonella* spp. (CARPENTIER, 1997). As placas de corte de polietileno apresentam superfícies irregulares, o que facilita a deposição de material orgânico dificultando a ação dos agentes desinfetantes (SINDE; CARBALLO, 2000).

Toda planta de uma indústria alimentícia avícola deve ser limpa e sanificada após o término do processo produtivo, e para isso há fases de higienização: I) remoção de resíduos sólidos; II) pré-enxágue com água quente (45°C); III) aplicação de detergente; IV) enxágue com água; V) sanitizantes e VI) enxágue com água. Esse processo é realizado em 12 horas e 24 horas no final do turno de abate. Durante o dia, em tempos de 4 e 8 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção, que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxágue (CONTRERAS et al., 2002).

O procedimento de higienização nos matadouros de aves consiste fundamentalmente no uso de água a 45°C, que garante as etapas de enxágue, cuidando com elevadas temperaturas que coagulam proteínas e propiciam maior aderência em superfícies levando a formação de biofilmes. O uso de água a 85°C para higienização de utensílios como facas de

corte, e o uso de detergentes e sanificantes, como o ácido peracético e amônia quaternária, são comumente utilizados nos processos de higienização de salas de corte nos frigoríficos do Brasil.

Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir microrganismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (MORAES et al., 1997).

Os compostos de amônia quaternária (*quats*) são largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbiocida (McDONELL; RUSSEL, 1999). O ácido peracético é um sanitizante que possui algumas vantagens, como não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e ser relatado como eficaz contra biofilmes (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

2.4 TEMPERATURAS PRECONIZADAS EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS

Segundo a Portaria nº 210 de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os estabelecimentos que realizarem cortes e/ou desossa de aves devem garantir temperatura ambiente não superior a 12°C e o resfriamento dos produtos de aves a uma temperatura da água do chiller de no máximo 4°C, respeitando, assim, o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (BRASIL, 1998). Entretanto, os estabelecimentos que exportam seus produtos para a União Europeia (UE) devem garantir temperatura ambiente não superior a 10°C nas salas de corte. Partindo deste pressuposto, serão mimetizadas as temperaturas preconizadas em abatedouros avícolas: 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura da sala de cortes para UE, máximo 10°C); 25±1°C (temperatura ambiente); 36±1°C (padrão ótimo para crescimento de mesófilos) e 42°C±1°C (temperatura de enriquecimento seletivo para *Salmonella* e, devido a posteriores estudos com bactérias termófilas, como *Campylobacter*, para pesquisa de biofilmes multiespécies).

A refrigeração dos produtos avícolas entre 4 e 8°C tem demonstrado diminuir a intensidade de crescimento de *Salmonella*. Em alimentos como a carne de frango, onde diversas intervenções tentam reduzir o agente patogênico, mais investigações são necessárias para proporcionar uma temperatura ótima de refrigeração que realmente iniba o crescimento

da *Salmonella*, sendo importante para a manutenção da vida de prateleira e para reduzir custos no processo. É essencial estudar os padrões de crescimento de *Salmonella* Enteritidis em temperaturas de refrigeração, já que são escassos os dados sobre crescimento em baixas temperaturas (MOREY; SINGH, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de avaliação da formação de biofilmes foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

3.1 AMOSTRAS DE SE

Foram analisadas duas amostras de *Salmonella* Enteritidis (SE), quanto à formação de biofilmes mono-espécie, em corpos de prova de superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano.

Ambas as cepas são provenientes de surtos, sendo uma isolada de fezes (coprocultura), identificada como SE 24 e a outra isolada de salada de maionese com batatas, identificada como SE 69, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo César Tondo da UFRGS. O sorovar foi confirmado geneticamente por *Microarray* pelo equipamento *Check&Trace* (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

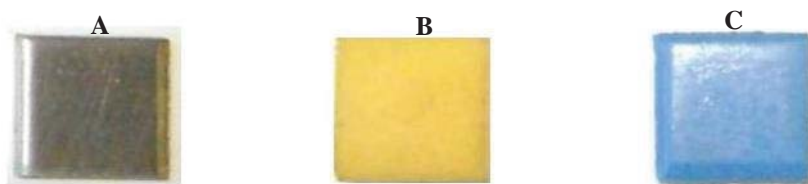
As amostras estavam armazenadas, congeladas a -20°C , em Caldo Brain-Heart Infusion (BHI, HiMedia[®]) com 20% de glicerol. Elas foram reativadas para verificar se estavam puras, utilizando um meio de enriquecimento não seletivo (BHI, HiMedia[®]), e incubadas a 37°C . Após 24 horas foram inoculadas em Caldo Rappaport Vassiliadis (RV, HiMedia[®]), e incubadas a 42°C . Depois de 24 horas foram isoladas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD, HiMedia[®]), e incubadas a 37°C . Depois de 24 horas foi observado o padrão das colônias para avaliar se eram compatíveis com *Salmonella* spp. e confirmadas bioquímica e sorologicamente através da metodologia descrita pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2016).

3.2 PREPARAÇÃO DE CORPOS DE PROVA

Foram utilizados, como corpos de prova, superfícies de aço inoxidável AISI 316, polietileno e poliuretano, limpos e esterilizados, com área de 1 cm^2 , confeccionados nas dimensões de $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ e $0,1\text{ cm}$ de espessura, como mostra a Figura 3. Os materiais utilizados para a preparação dos corpos de prova foram obtidos do ambiente de processamento de cortes de aves. Os mesmos foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- a) limpeza manual com auxílio de esponja, água e detergente neutro líquido;
- b) enxágue com água destilada;
- c) imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente;
- d) enxágue com água destilada;
- e) esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Figura 3 - Corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano provenientes de abatedouros avícolas.



Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: A: aço inoxidável; B: polietileno; C: poliuretano.

3.3 FORMAÇÃO DO BIOFILME

Para a formação dos biofilmes os corpos de prova foram cultivados individualmente em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços (Nest[®]). Foi adicionado 2,75 mL de caldo triptona de soja sem glicose (TSB, Difco[®]) e 250µL de culturas individuais de cada SE, com aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹ em cada poço. Esta população foi verificada, em todo o experimento, por semeadura em placas contendo Ágar Padrão de contagem (PCA, HiMedia[®]).

Os corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano foram imersos na cultura de cada microrganismo e incubados a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, simulando as temperaturas do ambiente de processamento, ótimas dos microrganismos e de termotolerância, e avaliados nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene operacional e pré-operacional em abatedouros de aves (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

3.4 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO

A eficácia dos tratamentos foi testada sobre os biofilmes formados nas três superfícies, em todos os tempos e temperaturas. Os corpos de prova, previamente incubados após a remoção das células planctônicas, foram colocados em recipientes com 5 mL de água estéril aquecida a 45°C por 3 minutos, água estéril aquecida a 85°C por 3 minutos, e nas soluções de

ácido peracético 0,5% (Kalykim[®], Brazil) e amônia quaternária 1% (Kalykim[®], Brazil), por um tempo de 5 minutos.

3.5 REMOÇÃO DO BIOFILME

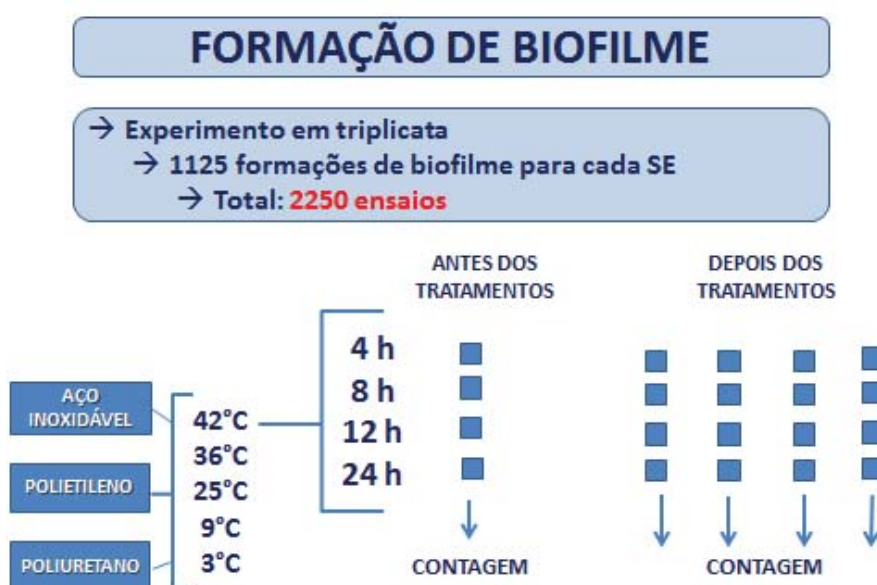
Nos tempos determinados, os cupons foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% (AP, HiMedia[®]), por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas.

Após a remoção das células planctônicas, os corpos de prova foram imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% com agentes neutralizantes por 1 minuto (JOSEPH et al. 2001; ISO 18593:2012), introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água Peptonada 0,1% e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom para desadesão de células sésseis (SCHERBA et al., 1991; WEBBER et al., 2015).

Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar PCA e utilizado o método de contagem em gota (*Drop plate*), inoculando cinco gotas de 10µL de cada diluição (WEBBER et al., 2015), com leitura após 24 horas de incubação a 37°C.

Todos os ensaios foram realizados com três repetições, resultando em 1125 ensaios de formações de biofilmes nas três superfícies, temperaturas e tempos, para cada amostra de SE, totalizando 2250 análises (Figura 4).

Figura 4 - Formação de biofilme em todas as superfícies, temperaturas e tempos testados.



3.6 DETERMINAÇÃO DOS RESULTADOS

Para determinar o resultado, foi aplicada a fórmula:

$$UFC.cm^{-2} = \left(\frac{V_D}{V_A}\right) \cdot M \cdot \left(\frac{D}{A}\right) \quad (1)$$

sendo:

V_D : volume do diluente usado no enxágue (5 mL);

V_A : volume da alíquota usada no plaqueamento (0,05 mL ou 0,1 mL);

M: média da contagem obtida nas placas em UFC;

D: diluição utilizada na contagem;

A: área do corpo de prova (2 cm²).

Os resultados foram convertidos em log e expressos em log₁₀.UFC.cm⁻² (GIBSON et al., 1999; CARELI, 2005; ISO 18593:2012).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância. A comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi feita utilizando o software ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VARIABILIDADE DAS AMOSTRAS DE SE

Ao compararmos as duas amostras de *Salmonella* Enteritidis, ambas provenientes de surtos de DTA, a SE 24, isolada de fezes (coprocultura), formou mais biofilmes que a SE 69, isolada de salada de maionese com batatas, com diferença estatística significativa, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* em todas as superfícies e condições ambientais testadas.

CEPA	MÉDIA DE FORMAÇÃO*
SE 24	6,602 a
SE 69	6,238 b

Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: * Resultados em \log^{10} .UFC.cm⁻². As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Conforme Ronner e Wong (1993), para caracterizar a formação de biofilme são necessários um número mínimo 10^3 UFC ($3 \log^{10}$.UFC.cm⁻²) aderidas por cm². Desse modo, ambas as cepas estudadas formaram biofilmes nas três superfícies avaliadas e em todas as condições ambientais testadas, sendo algo preocupante para a indústria de alimentos e para a saúde pública.

Segundo Azevedo e Cerca (2012) e Wang et al. (2013), poucos estudos avaliam a capacidade de formação de biofilme com várias estirpes do mesmo microrganismo, e mais limitados são os dados de pesquisa disponíveis sobre a produção de biofilme por diferentes cepas do mesmo patógeno em diferentes condições ambientais.

Assim, alguns trabalhos relatam que a diferença estatística que encontramos na formação de biofilme nas duas cepas de SE é devido a variabilidade de cada cepa. Vestby et al. (2009), Lianou e Koutsoumanis (2012) e Wang et al. (2013), relatam diferenças significativas entre os sorovares de *Salmonella* spp. sobre a capacidade de formar biofilme. Além disso, observaram que a variabilidade das estirpes na formação do biofilme é afetada por todos os parâmetros ambientais testados, e pareceu aumentar a formação do biofilme à medida que as condições tornaram-se menos favoráveis para o microrganismo.

4.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME NAS DIFERENTES SUPERFÍCIES

Houve formação de biofilme pelas SE no aço inoxidável, no polietileno e no poliuretano. Entretanto, houve maior formação de biofilme no polietileno em ambas as amostras.

Na SE 24 houve maior formação de biofilmes no polietileno, com diferença estatística significativa quando comparamos com o aço inoxidável e o poliuretano. Na SE 69 só existiu diferença entre o polietileno e o poliuretano. A adesão no aço inoxidável, comparada com o polietileno e o poliuretano, foram semelhantes, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* em aço inoxidável, polietileno e poliuretano, sob todas as temperaturas de incubação.

CEPA	SUPERFÍCIES*		
	Aço inoxidável	Polietileno	Poliuretano
SE 24	6,188 Aa	7,116 Ba	6,501 Aa
SE 69	6,217 ABa	6,558 ABb	5,939 Ab

Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: * Resultados em \log^{10} .UFC.cm⁻². As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

A aderência de microrganismos a uma superfície está intimamente relacionada com as propriedades do material testado. Relatos têm demonstrado que a *Salmonella* consegue formar biofilmes em superfícies abióticas, como plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável (JOSEPH et al., 2001; SOLANO et al., 2002; PROUTY; GUNN, 2003; ARNOLD; YATES, 2009; MORETRO et al., 2009; O'LEARY et al., 2013).

Na indústria de alimentos, o aço inoxidável tem sido o material de escolha mais utilizado por ter uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com vários polímeros. Porém sua aplicabilidade é limitada em locais que são necessários materiais flexíveis (HOLAH; THORPE, 1990; ROSSONI; GAYLARDE, 2000). No processamento de alimentos, principalmente em abatedouros de frangos de corte, se destacam as esteiras de poliuretano e os utensílios fabricados com polietileno, principalmente placas de corte (CARPENTIER, 1997; STEENACKERS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013).

Algo preocupante para a indústria de alimentos foi a capacidade das SE aderirem no aço inoxidável e formarem biofilme com a mesma capacidade do poliuretano nas duas amostras, e com a mesma capacidade no polietileno na amostra SE 69. Por ser uma superfície menos irregular, o aço inoxidável evidencia maior adequação aos processos de higienização.

Porém, Oliveira et al. (2006), sugere que não é a distância entre as rugosidades que abriga as células, e sim a profundidade dessas imperfeições que leva a uma maior adesão microbiana.

Houve maior formação de biofilmes no polietileno, possivelmente por ser uma superfície de natureza polimérica com maior manipulação. Sinde e Carballo (2000) afirmam que as placas de corte de polietileno apresentam superfícies irregulares, o que facilita a deposição de material orgânico dificultando a ação dos agentes desinfetantes. Em contrapartida, o polietileno é muito usado por ser atóxico e proporcionar menor desgaste das facas de corte.

Stepanovic et al. (2004), observou a formação de biofilme por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em superfície de plástico e, em todos os testes, ambos microrganismos produziram biofilme estando em um meio adequado. Ao observar o meio de crescimento, a *Salmonella* spp. produziu mais biofilme em meio mais limitado em nutrientes, enfatizando o uso do TSB sem glicose em nossa pesquisa. Rodrigues et al. (2009) corroboram a capacidade de desenvolvimento biofilme por *Salmonella* spp. em ambiente sem glicose, ao avaliar a formação de biofilme na superfície de poliestireno por *S. Heidelberg*, observando que todas as amostras foram capazes de formar biofilme.

Rodrigues et al. (2013), avaliaram a adesão de *Salmonella* e *Listeria* nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polietileno no processo de higiene pré-operacional em sala de cortes em um abatedouro de aves. Somente foi isolado *Listeria* do poliuretano e da mesa de aço inoxidável, antes da lavagem, não obtendo achados na superfície de polietileno.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que tanto o aço inoxidável, quanto o polietileno e o poliuretano, materiais amplamente utilizados na indústria de alimentos, propiciaram a aderência de ambos os sorovares de *S. Enteritidis*. Este fato é preocupante para a indústria de alimentos e para a saúde dos consumidores, devido à potencial contaminação cruzada durante o processamento de alimentos.

4.3 EFEITO DAS TEMPERATURAS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os abatedouros avícolas brasileiros que exportam seus produtos para a União Europeia (UE) devem garantir no resfriamento dos produtos de aves temperatura de no máximo 4°C e na sala de cortes temperatura ambiente não superior a 10°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, conforme a Portaria nº 210 (BRASIL, 1998).

A partir disso, mimetizamos as temperaturas preconizadas em abatedouros avícolas: $3\pm 1^{\circ}\text{C}$, temperatura de resfriamento, máximo a 4°C ; $9\pm 1^{\circ}\text{C}$, temperatura da sala de cortes para UE, máximo 10°C ; $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, temperatura ambiente; $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, padrão ótimo para crescimento de mesófilos; e $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, temperatura de enriquecimento seletivo para *Salmonella*, devido à termotolerância.

Quando avaliamos os resultados da formação de biofilmes pelas duas cepas de SE frente às diferentes temperaturas utilizadas para incubação, tanto a SE 24 como a SE 69, aderiram a 3°C , 9°C , 25°C , 36°C e 42°C . No entanto, observou-se uma maior adesão da *S. Enteritidis* com o aumento das temperaturas de incubação. A SE 24 revelou diferença estatística na formação de biofilme quando comparamos a temperatura de 3°C com as de 25°C , de 36°C e de 42°C . A SE 69 revelou diferença significativa na formação de biofilme quando comparamos as temperaturas de 3°C e de 9°C com a temperatura de 36°C (Tabela 3).

Tabela 3 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* sob diferentes temperaturas de incubação em todas as superfícies testadas.

CEPA	TEMPERATURAS*				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
SE 24	6,072 Aa	6,413 ABa	6,844 Ba	6,876 Ba	6,802 Ba
SE 69	5,768 Aa	5,906 Ab	6,470 ABCa	6,813 BCa	6,235 ABCb

Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: * Resultados em $\log^{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Enfatiza-se a formação de biofilmes por *S. Enteritidis* na temperatura de 3°C , nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, descrita primeiramente pelo nosso grupo de pesquisa como possível para crescimento de *Salmonella* spp. nestas superfícies (WEBBER, 2015). Fato este extremamente preocupante, uma vez que as temperaturas de refrigeração atuam na conservação dos alimentos inibindo o crescimento microbiano.

Morey e Singh (2012) salientam que temperaturas baixas, como 4°C e 8°C , foram fatores importantes na determinação da sobrevivência e crescimento de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*. Em nosso estudo destacamos, também, a importância da manutenção de alimentos a temperaturas de refrigeração o mais próximo possível de 0°C , pois a formação de biofilmes a 9°C foi semelhante à temperatura ótima na SE 24 e à temperatura ambiente e de termotolerância na SE 69.

Conforme Rode et al. (2007) e Reuter et al. (2010), os microrganismos na forma de vida séssil adaptam-se melhor ao meio, e isso permite a sobrevivência e crescimento sob

condições prejudiciais e estressantes. Os resultados reportados em nosso estudo corroboram com esta possibilidade de desenvolvimento de biofilmes de *S. Enteritidis* em condições inóspitas, como temperaturas baixas e de termotolerância.

4.4 EFEITO DO TEMPO NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os abatedouros avícolas devem ser limpos e sanificados após o término do processo produtivo. Esse processo é realizado no final do turno de abate, sendo conhecido como higiene pré-operacional, e ocorre a cada 12 e 24 horas. Durante o processo produtivo, em tempos de 4 e 8 horas costuma-se realizar a chamada higiene operacional, nos intervalos de produção. Partindo disso, mimetizamos os tempos preconizados no processo de higienização operacional, 4 e 8 horas, e pré-operacional, 12 e 24 horas, em abatedouros avícolas.

As amostras de *Salmonella* Enteritidis não revelaram diferença significativa na formação de biofilmes após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Média das repetições da formação de biofilmes pelas *S. Enteritidis* sob diferentes tempos de incubação em todas as superfícies e temperaturas testadas.

CEPA	TEMPOS*				
	0 horas	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas
SE 24	0,000 Aa	6,569 Ba	6,652 Ba	6,658 Ba	6,527 Ba
SE 69	0,000 Aa	6,562 Ba	5,986 Bb	6,081 Bb	6,324 Ba

Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: * Resultados em \log^{10} .UFC.cm⁻². As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Diante dos resultados, podemos verificar a importância do processo de higienização nos abatedouros avícolas. As duas cepas *Salmonella* Enteritidis foram capazes de formar biofilmes sem diferença estatística após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação. Ressaltamos a importância do processo de higiene operacional em intervalos de poucas horas durante o processo produtivo, evitando que resíduos aderidos se tornem fontes de contaminação, e não esperando somente o término do processamento para que seja realizada apenas a higiene pré-operacional. Parizzi e Andrade (2004) salientam que o número de células aderidas nas superfícies aumentarão com o tempo de contato do microrganismo. Consequentemente, quanto maior a taxa de contaminação mais se prejudica o resultado efetivo da higienização.

Em relação à saúde pública, além do perigo de transmissão de enfermidades aos consumidores, em um biofilme as bactérias são mais resistentes a antimicrobianos, quando comparadas às mesmas células planctônicas (CHAVANT et al., 2007), justificando a

necessidade da realização da higiene operacional em intervalos de poucas horas durante o processo de produção.

4.5 TRATAMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO

Frente aos tratamentos testados para remoção de biofilmes em ambas as amostras, o ácido peracético 0,5% foi o melhor tratamento na remoção dos biofilmes nas três superfícies e em todas as temperaturas e tempos de formação, seguido pela ação da amônia quaternária a 1%, da água estéril aquecida a 85°C e da água estéril aquecida a 45°C, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Médias das repetições da quantificação da remoção de biofilmes por duas cepas de *S. Enteritidis* provenientes de surtos de DTA, nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano frente a diferentes procedimentos de higienização.

CEPA	TRATAMENTOS*				
	CONTROLE	ÁGUA ESTÉRIL AQUECIDA 45°C	ÁGUA ESTÉRIL AQUECIDA 85°C	ÁCIDO PERACÉTICO 0,5%	AMÔNIA QUATERNÁRIA 1%
SE 24	6,602 Aa	6,189 Ba	2,860 Ca	1,186 Da	2,174 Ea
SE 69	6,238 Ab	5,567 Bb	2,371 Cb	1,327 Da	1,690 Db

Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: * Resultados em \log^{10} .UFC.cm⁻². As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em ambas as amostras, a água estéril aquecida a 45°C e a 85°C, e os sanitizantes ácido peracético 0,5% e amônia quaternária 1%, revelaram diferença estatística frente ao controle e entre os tratamentos, demonstrando remoção dos biofilmes formados por *Salmonella* Enteritidis. Contudo, não houve diferença estatística entre a amônia quaternária 1% e o ácido peracético 0,5% na SE 69.

Nossos resultados vêm ao de encontro ao relatado por Webber (2015), que obteve melhor redução de biofilmes em duas amostras de *S. Enteritidis*, não envolvidas em surtos, em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, com o uso do sanitizante ácido peracético.

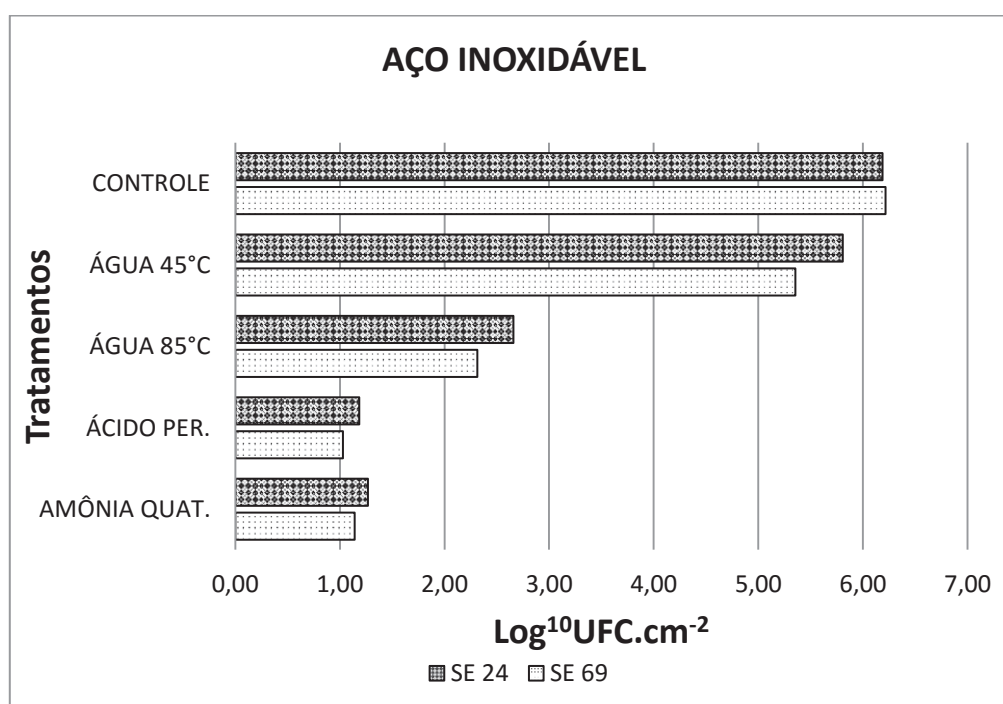
Na Diretiva 471/2001 da União Europeia, no teste de superfícies, o nível aceitável é até no máximo 10 UFC.cm⁻² ($1,5 \log^{10}$ UFC.cm⁻²) de microrganismos mesófilos e 1 UFC.cm⁻² ($0,15 \log^{10}$ UFC.cm⁻²) de enterobactérias. Os estabelecimentos habilitados à exportação para a União Europeia devem atender a esta diretiva (UNIÃO EUROPEIA, 2001a).

Entretanto, para testes de superfícies em contato com alimentos, de acordo com a Norma EN 13697:2001 da União Europeia, os procedimentos de sanitização devem realizar uma redução de no mínimo 4 log na contagem bacteriana (UNIÃO EUROPEIA, 2001b; MORETTO et al., 2009).

Analisando a remoção de biofilmes, apesar da diferença estatística, a água estéril aquecida a 45°C não atendeu as recomendações para higienização correta de uma superfície, conforme a norma EN 13697:2001 (UNIÃO EUROPEIA, 2001b), com redução de somente 0,413 \log^{10} UFC.cm⁻² na SE 24 e 0,671 \log^{10} UFC.cm⁻² na SE 69, ao avaliar a média de redução em todas as superfícies, tempos e temperaturas de incubação. Destaca-se o fato de que no uso da água estéril aquecida a 45°C, conforme Contreras et al. (2002), deve-se utilizar pressão para a remoção dos resíduos e garantir o aquecimento adequado da água, para obter uma boa eficácia da etapa de pré-enxágue.

A remoção de biofilmes na superfície de aço inoxidável, em todas as temperaturas e tempos de incubação, após a realização dos tratamentos, está descrita na Figura 5.

Figura 5 - Remoção de biofilme de *S. Enteritidis* proveniente de surtos de DTA em aço inoxidável, por diferentes procedimentos de higienização.



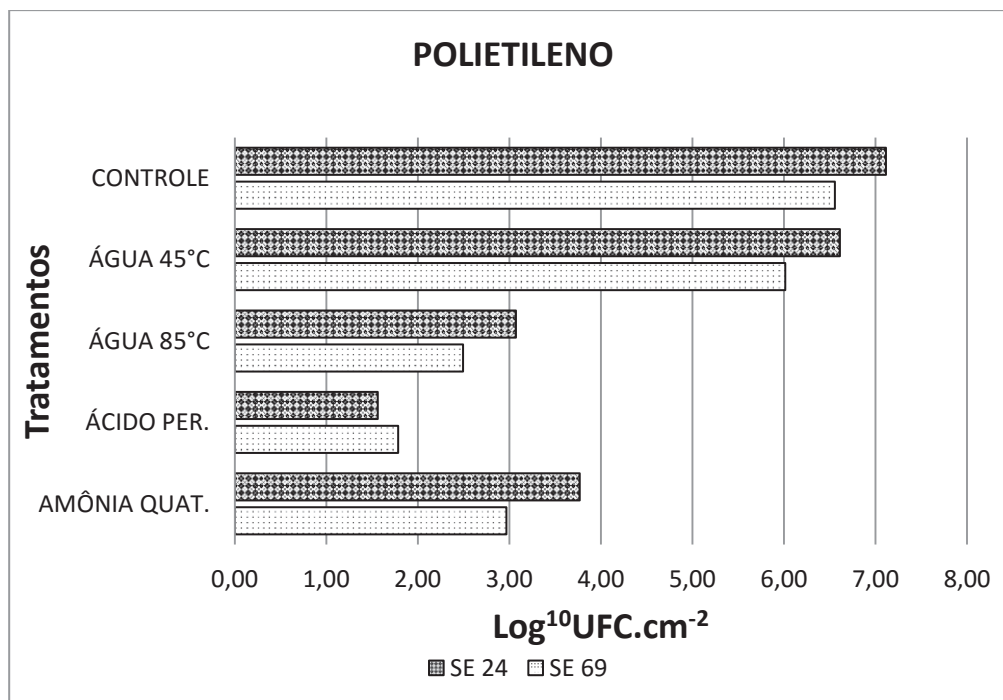
Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: Água 45°C: água estéril aquecida a 45°C; Água 85°C: água estéril aquecida a 85°C; Ácido Per.: ácido peracético 0,5%; Amônia Quat.: amônia quaternária 1%.

Os sanitizantes demonstraram eficácia na redução dos biofilmes, e o uso da água a 85°C ficou muito próximo da redução de 4 log exigida (UNIÃO EUROPEIA, 2001b).

A remoção de biofilmes na superfície de polietileno, em todas as temperaturas e tempos de incubação, após a realização dos tratamentos, está descrita na Figura 6.

Figura 6 - Remoção de biofilme de *S. Enteritidis* proveniente de surtos de DTA em polietileno, por diferentes procedimentos de higienização.



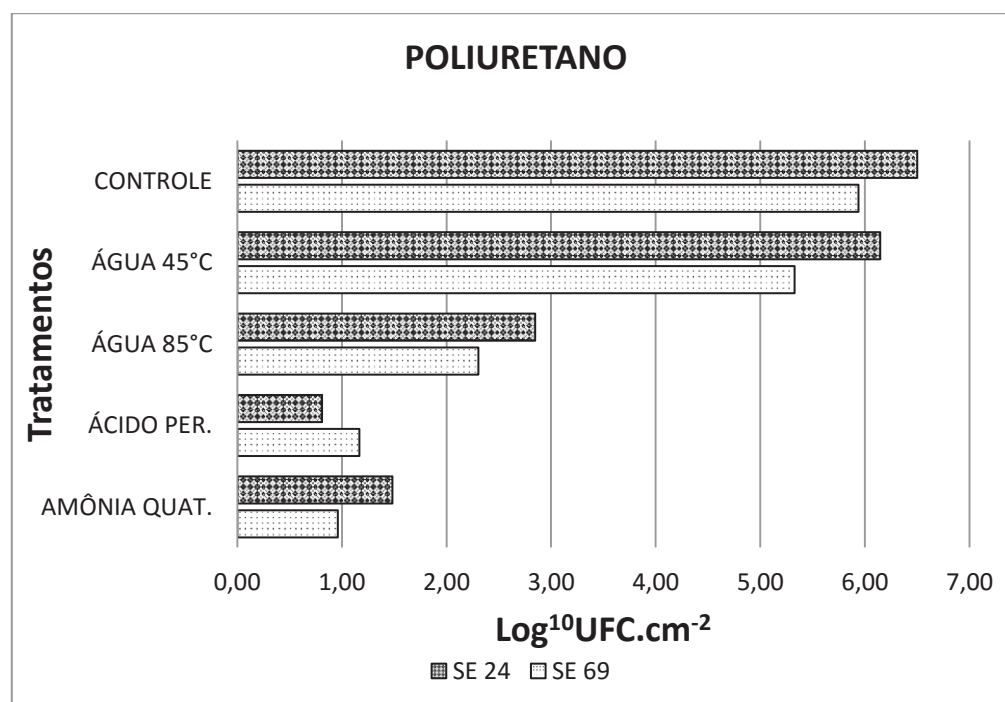
Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: Água 45°C: água estéril aquecida a 45°C; Água 85°C: água estéril aquecida a 85°C; Ácido Per.: ácido peracético 0,5%; Amônia Quat.: amônia quaternária 1%.

O sanitizante amônia quaternária apresentou menor eficácia no polietileno do que nas demais superfícies.

A remoção de biofilmes na superfície de poliuretano, em todas as temperaturas e tempos de incubação, após a realização dos tratamentos, está descrita na Figura 7.

Figura 7 - Remoção de biofilme de *S. Enteritidis* proveniente de surtos de DTA em poliuretano, por diferentes procedimentos de higienização.



Fonte: elaborada pelo Autor (2016).

Legenda: Água 45°C: água estéril aquecida a 45°C; Água 85°C: água estéril aquecida a 85°C; Ácido Per.: ácido peracético 0,5%; Amônia Quat.: amônia quaternária 1%.

Em suas pesquisas Silva et al. (2014) e Sinde e Carballo (2000) relatam a eficácia dos sanitizantes frente à SE, e ressaltam que a redução da aderência depende das propriedades do material testado. Já Borowsky et al. (2006) demonstraram a resistência de amostras de *S. Typhimurium* após 5 minutos de exposição aos sanitizantes, mas, após 15 minutos, de contato nenhuma foi resistente.

A sobrevivência dos microrganismos à desinfecção é frequentemente associada com a presença de biofilmes em superfícies (BRESSLER et al., 2009). Os biofilmes constituem uma forma privilegiada de vida para as bactérias, e uma compreensão mais clara dos processos envolvido é crucial para o seu controle.

Estudos de Bridiera et al. (2011) evidenciam que a resistência do biofilme a um desinfetante é intimamente relacionada com a sua estrutura tridimensional, por ser uma bioestrutura heterogênea e multifatorial, resultado de uma acumulação de diferentes mecanismos. Em vista do observado, é fundamental que se leve em conta o “modo de vida” dos biofilmes, já que incidem sobre a avaliação da eficácia de um desinfetante.

Diante dos resultados, a melhor opção para a remoção de biofilmes de SE, em superfícies usadas comumente em abatedouros, é a utilização de ácido peracético como agente sanitizante e o uso da água aquecida a 85°C para os utensílios.

Além disso, esses resultados salientam a necessidade de emprego de ação mecânica em conjunto à ação química na remoção dos biofilmes. Os resultados demonstraram a importância dos procedimentos de higiene nas superfícies que entram em contato com os alimentos, já que se verificou que a formação de biofilme pode ocorrer mesmo em um curto período de tempo, o que enfatiza a necessidade de bons procedimentos de higienização durante todo o processamento de alimentos.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se, que:

a) As *S. Enteritidis* foram capazes de aderir em nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, sendo o polietileno a superfície com maior formação de biofilme.

b) A SE 24 e SE 69 formaram biofilmes em todas as condições de temperaturas testadas, inclusive nas propícias para a conservação dos alimentos sob refrigeração, de 3°C e 9°C.

c) As *S. Enteritidis* formaram biofilmes em todos os tempos de incubação (4, 8, 12 e 24 horas), sem diferença estatística significativa.

d) O ácido peracético foi o melhor tratamento utilizado para a remoção dos biofilmes formados pelas SE nas três superfícies.

REFERÊNCIAS

- AESBUC - Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica. Manual de Higienização. 2016. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual_higienizao_aesbuc.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- ARNOLD, J. W.; YATES, I. E. Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. **Poultry Science**, v. 88, n. 6, p. 1292-1298, 2009.
- AviSite. **Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015**. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/clipping/index.php?codclipping=27161>>. Acesso em: 20 fev. 2016
- AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria**. Porto: Publindústria, Edições Técnicas, p. 23-50, 2012.
- BAM - Bacteriological Analytical Manual. *Salmonella*. 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- BOROWSKY, L. M.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. I.; AVANCINI, C. A. M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, v. 36, p. 76-79, 2006.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União de 10 out.** 2003, seção 1, p. 9a.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimento Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. **Diário Oficial da União de 05 de nov.** 2003, seção 1, p. 3b.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União de 26 nov.** 1998, seção 1, p. 226.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- BRESSLER, D. C.; BALZER, M.; DANNEHL, A.; FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. **Water Science and Technology**. v. 9, p. 81-87, 2009.

BRIDIERA, A.; BRIANDETA, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNETA, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p. 1017-1032, 2011.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, A. G. M.; CASTRO, A. M. I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, on-line, São Paulo, v. 67, n. 1, jan-jun, 2000. Disponível: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_1/pesquisa_salmonella.htm>. Acesso em: 26 fev. 2016.

CARELI, R. T. **Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

CARPENTIER, B. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. **Food Microbiology**, v. 14, p. 31-37, 1997.

CHARACKLIS, W. G. Biofilm development: a process analysis. In: **Microbial Adhesion and Aggregation**. Ed. K. C. Marshall, Sprig Verlag, New York, 1984.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R. HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 68, p. 605-612, 2007.

CONTRERAS, C.J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2002. 181 p.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, R.; LAPPINSCOTT, H.M. Microbial biofilmes. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 410 p.

FURLAN, R. L. Anatomia-Fisiologia. In: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 13-28.

FUSTER-VALLS, N.; HERMÁNDEZ-HERRERO, M.; MARIN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

- 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. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1999.
- GRIMONT, P.; WEILL, F. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: World Health Organization. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur**. 9 ed. Paris: p. 6-7. 2007.
- HOLAH, J. T.; THORPE, R. H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 599-608, 1990.
- 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.
- JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 265-269, 2003.
- JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. V. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, 1998.
- KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 227-236, 2003.
- LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella* enterica under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 171-178, 2012.
- MANIJEH, M.; MOHAMMAD, J.; ROHA, K. K. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. **Journal of Biological Science**, v. 8, n. 2, p. 502-505, 2008.
- MARQUES, C. S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- McDONELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Rev**, v. 12, p. 147-179, 1999.
- MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; BABIC, T.; STOJANOVIC, P. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis - actualities and importance. **Acta Medica Medianae**, v. 49, p. 71-75, 2010.
- MORAES, M. S. V.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; PASSOS, F. J. V.; GOMIDE, L. A. M. Isolament of aerobic mesophilic and thermophilic spores in equipments of poultry

slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. **Ciênc. Tecnol. Alimentar**, v. 17, p. 325-329, 1997.

MORETTO, T.; VESTBY, L.K.; NESSE, L.L.; HANNEVIK, S.; KOTLARZ, K.; LANSRUD, S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005-1012, 2009.

MOREY, A.; SINGH, S. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. Department of Poultry Science, Auburn University, Auburn, Alabama. **Foodborne pathogens and disease**. v. 9, n. 3, 2012.

NOTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. **Biofouling**, v. 5, p. 1-16, 1991.

O'LEARY, D.; MCCABE, E. M.; MCCUSKER, M. P.; MARTINS, M.; FANNING, S.; DUFFY, G. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 36-43, 2013.

OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **The New Microbiologica**, v. 29, p. 49-54, 2006.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

PERESI, J. T. M.; LIMA, I.A.Z.C.; TAVECHIO, A.T; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes microbianos de cepas isoladas 390 de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 58, n. 1, p. 41-46. 1999.

PIZZOLITTO, E. L. **Formação de Biofilmes Microbianos sobre superfícies sólidas**. 2016. Disponível em: <<http://www.unesp.br/prope/projtecn/Saude/Saude02.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

PROUTY, A.M.; GUNN, J.S. Comparative analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium biofilm formation in gallstones and on glass. **Infection and Immunity**, v. 70, n.5, p. 2640-2649, 2003.

REUTER, M.; MALLETT, A.; PEARSON, B. M.; VAN VLIET, A. H. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, p. 2122-2128, 2010.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - VEDTA. Relatório 2013. Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS - Secretaria da Saúde do Estado.

RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETTO, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 372-383, 2007.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; OLIVEIRA, A. P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S. C.; TAGLIETI, R. M.; DICKEL, E. L.; NASCIMENTO, V. P. Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 225-230, 2009.

RODRIGUES, L. R.; SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A.P.; FERREIRA, D.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* and *Listeria* from Stainless Steel, Polyurethane and polyethylene Surfaces in the Cutting Room of a Poultry Slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1-7, 2013.

RONNER, A. B., WONG, A. C. L., Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v. 56, n. 9, p.750-758, 1993.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International journal of food microbiology**, v. 61, p. 81-85, 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.

SILVA, C. F.; GEHLEN, S. S.; WEBBER; B.; DIEDRICH, L. N.; PILOTTO; F.; SANTOS, L. R.; TONDO, E. C.; NASCIMENTO, V. P.; RODRIGUES, L. B. Biofilm Former *Salmonella* Enteritidis are Multiresistant to Antibiotics. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 42, p. 1-8, 2014.

SILVA, F. A. S. ASSISTAT: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG - Atualizado em 01 de abril de 2014. Disponível em: <www.assistat.com>. Acesso em: 20 fev. 2016.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2000.

SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 793-808, 2002.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I. C.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2000. 827 p.

UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2001/471/CE de 21 de junho de 2001. Regras para os controlos regulares à higiene geral dos estabelecimentos. **Comissão da Comunidades Europeias**, Europa, 2001a.

UNIÃO EUROPEIA. NS-EN 13697:2001: Quantitative Non-Porous Surface Test for the Evaluation of Bactericidal and/or Fungicidal Activity of Chemical Disinfectants used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas. Test Method and requirements without Mechanical Action. Brussels, Belgium: **European Committee for standardization**. Europa, 2001b.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117-1131, 2010.

VESTBY, L. K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L. L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal - and feed factories. **BMC Veterinary Research**. v. 5, 2009.

WANG, H. H.; YE, K. P.; ZHANG, Q. Q.; DONG, Y., XU, X. L.; ZHOU, G. H. Biofilm formation of meatborne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Control**. v. 32, p. 650-658, 2013.

WEBBER, B. Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

WEBBER, B.; CANOVA, R.; ESPER, L. M.; PERDONCINI, G.; NASCIMENTO, V. P.; 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.

WIMPENNY, J.; MANS, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 661-671, 2000.

WHO - World Health Organization. **Top 15 lists from a Country, parameters**. 2012. Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show>. Acesso em: 20 fev. 2016.

WHO - World Health Organization. *Salmonella*. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

ZOBELL, C. E. The effects of solids surfaces upon bacterial activity. **J. Bacteriology**. v. 46, p. 39-56, 1943.