

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

Nathanyelle Soraya Martins de Aquino

**Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e *quorum sensing* de biofilmes
mono e multiespécies**

Passo Fundo

2017

Nathanyelle Soraya Martins de Aquin
Tecnóloga de Alimentos

**Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e *quorum sensing* de biofilmes
mono e multiespécies**

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Orientador: Laura Beatriz Rodrigues
Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades
funcionais de alimentos

Passo Fundo

2017

**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

Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e *quorum sensing* de biofilmes mono e multiespécies

Elaborada por
Nathanyelle Soraya Martins Aquino

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

Comissão Examinadora

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

Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF

Leticia Sopena Casarin, Dra., UFCSPA

CIP – Catalogação na Publicação

A657s Aquino, Nathanyelle Soraya Martins de
Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e
quorum sensing de biofilmes mono e multiespécies /
Nathanyelle Soraya Martins de Aquino. – 2017.
116 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. Ave - Alimento. 2. Alimentos - Contaminação.
3. Alimentos - Controle biológico. 4. Biofilme. I.
Rodrigues, Laura Beatriz, orientador. II. Título.

CDU: 664

Dedico esta, e todas as demais conquistas que ainda estão por vir, a Deus meu criador e socorro bem presente, aos meus pais, meu irmão, minha avó Assunção e meus avós Maria Aquino e Natanael Aquino *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso pelo dom da vida, pela segurança e pelo conforto. Por sempre me guiar por caminhos seguros. Por cumprir o que está escrito em Sua palavra “... o choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã”.

Aos meus pais que sempre me ampararam e me apoiaram em todas as minhas decisões. Por muitas vezes terem de adiar seus sonhos, para que eu pudesse iniciar os meus. Saber que eu posso contar com vocês em qualquer situação me motiva a seguir em frente.

Ao mano por cuidar dos nossos pais durante minha ausência. E por sempre ir ao banco fazer o depósito quando era preciso enviar dinheiro para mim.

À minha avó Assunção por toda preocupação, oração e auxílio financeiro. Suas ligações diárias sempre me confortavam.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas. Sempre soube que mesmo de longe vocês estavam torcendo para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Em especial agradeço a Larissa por ter me dado a afilhada mais linda desse mundo e as minhas primas Samily e Iza por serem companheiras.

À minha orientadora querida Laura Beatriz Rodrigues, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Apesar das dificuldades, foi muito engrandecedor profissionalmente. Muito obrigada por ter me acolhido e me recebido tão bem desde que eu cheguei. Sempre se mostrou amiga acima de orientadora, me oportunizando participar de momentos muito especiais na sua família. Obrigada por me acalmar quando eu por vezes me desesperei e obrigada por estar ao meu lado mesmo nos momentos ruins. Aprendi muito com você, espero um dia retribuir todo carinho.

Ao GeMicro por toda a ajuda dada durante a realização do experimento. Vocês são muito importantes para que nossos sonhos e nossos objetivos sejam concretizados. Agradeço à doutoranda Bruna Webber pela imensa contribuição neste trabalho. Por ter sido um amparo em momentos difíceis e por sempre torcer para que as coisas ocorressem bem. À Emanuele Pottker e sua mãe por terem se disponibilizado a buscar as cepas biossensoras utilizadas neste trabalho e pelas palavras de incentivo. Também à Sara Ghelen pelo ano de trabalho juntas e pelo companherismo.

Ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário por ceder o espaço para realização das análises. À Alana e Leti pela ajuda e por dividir muitas vezes a bancadas durante este trabalho.

Aos professores Luiz Carlos Kreutz e Rafael Frandoloso por permitirem a realização de parte deste experimento no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada do PPGBioexperimentação. Em especial à Pós-doutora Leticia por ser tão prestativa e ajudar sempre que solicitado.

Aos professores Marcelo Palma Sircili, Samuel Campanelli Freitas Couto e ao Instituto Butantan por cederem gentilmente as cepas biossensoras.

À todos do Laboratório de Fermentações, principalmente à Ana Margarites. Só tenho a agradecer pela ajuda com as análises, estatística e pelas contribuições dadas a este trabalho. Era sempre um conforto saber que eu poderia sempre que precisasse ter o seu auxílio.

Aos queridos João e Clarisse do Laboratório de Aula Práticas, por estarem sempre dispostos a ajudar e auxiliar no que fosse preciso.

À todos os professores do PPGCTA por terem contribuído com a minha formação e por terem nos estimulado e desafiado durante as realizações das tarefas. À professora Luciana Ruschel dos Santos e Elci Dickel um agradecimento especial por sempre compartilharmos momentos de descontração e também momentos de seriedade. Obrigada pelos ensinamentos repassados.

Aos meus colegas de mestrado pelo apoio mútuo e pela amizade. Foram anos difíceis, mas conseguimos. Agradeço especialmente à Mere, Pati, Kelly, Ana Bianchi e Vanessa, vocês foram minha família aqui no Rio Grande do Sul. Foram muitos momentos de apoio, de ajuda e de compreensão. Não tenho como agradecer todo o acolhimento que me foi dado. Nossas conversas, nossas jantãs, nosso grupo foi de extrema importância para o meu bem-estar emocional, levarei vocês sempre no coração.

À professora Luciane Daroit pela análise estatística descrita neste trabalho.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, Jonas. Foram muitas horas na bancada, muitos finais de semana no laboratório e muitas madrugadas no hospital veterinário. Obrigada por sempre me acompanhar nas análises, por se fazer presente e por acreditar em mim. O seu apoio foi muito importante durante esses anos.

À Capes pela concessão da bolsa.

Ao fomento da FAPERGS e do CNPq, que subsidiaram este projeto de mestrado.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A indústria avícola é um dos setores mais importantes da economia brasileira, e o controle microbiológico deve ser prioridade para manter a qualidade dos produtos. Um dos entraves observados é a contaminação dos alimentos pelo contato com superfícies aderidas por microrganismos. Esta adesão, denominada biofilme, proporciona à comunidade bacteriana maior proteção e resistência frente à ação de sanitizantes, dificultando a higienização. Durante o processo de formação de biofilmes as bactérias liberam moléculas autoindutoras responsáveis pela comunicação celular que atuam ativando genes de virulência, incentivando maior formação de biofilmes, estimulando a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), dentre outras funções. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a formação de biofilmes monoespécies e multiespécies por patógenos previamente isolados do ambiente de processamento de aves: *S. Enteritidis*, *E. coli*, *C. jejuni* e *L. monocytogenes*. Também, a quantificação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a presença de moléculas de *quorum sensing* e os efeitos dos tratamentos de higienização no EPS destes biofilmes. As temperaturas e as superfícies utilizadas para a formação dos biofilmes foram escolhidas de forma a mimetizar o ambiente de processamento da indústria avícola. Os resultados demonstraram que todos os microrganismos foram capazes de aderir às superfícies analisadas, com exceção do *C. jejuni*, cuja quantificação não foi possível em nenhuma das condições testadas. As bactérias demonstraram maior capacidade de formação de biofilme monoespécie, com capacidade semelhante de adesão em todas as superfícies. Houve uma diminuição na quantificação quando em interações multiespécies, e os polímeros propiciaram maior adesão que o aço inoxidável. Houve habilidade de formação de biofilmes mesmo em temperaturas de refrigeração, sendo *S. Enteritidis* a cepa mais adaptada às condições testadas. Em consonância com os resultados acima, notou-se que a quantificação de EPS foi maior em temperaturas críticas para o crescimento dos microrganismos, provavelmente por ser utilizado como ferramenta de sobrevivência, funcionando como barreira contra o estresse térmico. Apesar do EPS dificultar a penetração de sanitizantes dentro da comunidade bacteriana, pode-se perceber que a água a 85°C e o hipoclorito de sódio a 2% foram eficazes no rompimento da matriz, com menos EPS nas amostras após o uso da água aquecida a 85°C. Com relação ao estudo do *quorum sensing* nos biofilmes, não foi possível detectar a presença de autoindutores em nenhuma das interações estudadas. Os dados obtidos reforçam a importância do estudo de biofilmes como um auxílio para a indústria, destacando os pontos cruciais que devem ser trabalhados a fim de evitar a contaminação de alimentos. A modificação de superfícies pode ser uma estratégia para inibir a adesão microbiana, já que o polietileno, o poliuretano e o aço inoxidável avaliados, obtidos diretamente de abatedouro de aves, possibilitaram elevada quantificação. A manutenção dos alimentos na cadeia do frio pode ser utilizada para retardar a adesão dos microrganismos, pois, embora tenha havido formação de biofilmes em temperaturas de refrigeração, esta foi menor se comparada a temperaturas mais altas. Logo, superfícies modificadas, higienizações em períodos de tempos apropriados, combinados à temperaturas de refrigeração, pode ser uma alternativa eficaz no controle de biofilmes na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Alimentos. Aves. Biofilme. EPS. Higienização. *Quorum sensing*.

ABSTRACT

The poultry industry is one of the most important sectors of the Brazilian economy, and microbiological control should be a priority to maintain product quality. One of the barriers observed is the contamination of food by contact with surfaces adhered by microorganisms. This adhesion, called biofilm, gives the bacterial community greater protection and resistance against the action of sanitizers, making hygiene difficult. During the process of biofilm formation the bacteria release autoinductive molecules responsible for cellular communication that act by activating virulence genes, encouraging the formation of biofilms, stimulating the production of extracellular polymer substances (EPS), among other functions. The objective of this work was to evaluate the formation of monospecies and multispecies biofilms by pathogens previously isolated from the avian processing environment: *S. Enteritidis*, *E. coli*, *C. jejuni* and *L. monocytogenes*. Also, the quantification of extracellular polymer substances (EPS), the presence of quorum sensing molecules and the effects of hygienization treatments on EPS of these biofilms. The temperatures and surfaces used for biofilm formation were chosen to mimic the processing environment of the poultry industry. The results showed that all the microorganisms were able to adhere to the analyzed surfaces, except for *C. jejuni*, whose quantification was not possible under any of the conditions tested. Bacteria showed higher capacity for monospecific biofilm formation, with similar adhesion capacity on all surfaces. There was a decrease in the quantification when in multispecies interactions, and the polymers provided greater adhesion than the stainless steel. There was ability to form biofilms even at refrigeration temperatures, with *S. Enteritidis* being the strain most adapted to the conditions tested. In agreement with the results above, it was observed that the quantification of EPS was higher in temperatures critical for the growth of microorganisms, probably because it is used as a survival tool, acting as a barrier against thermal stress. Although EPS impedes the penetration of sanitizers into the bacterial community, it can be seen that water at 85°C and 2% sodium hypochlorite were effective in breaking the matrix, with less EPS in the samples after the use of water heated to 85°C. Regarding the study of quorum sensing in biofilms, it was not possible to detect the presence of auto-inducers in any of the interactions studied. The data obtained reinforce the importance of the study of biofilms as an aid to the industry, highlighting the crucial points that must be worked in order to avoid contamination of food. The modification of surfaces may be a strategy to inhibit microbial adhesion, since the evaluated polyethylene, polyurethane and stainless steel, obtained directly from poultry slaughterhouse, allowed high quantification. The maintenance of the foods in the cold chain can be used to delay the adhesion of the microorganisms, because, although there was biofilm formation in the cooling temperatures, it was smaller when compared to higher temperatures. Therefore, modified surfaces, hygienizations at appropriate times, combined with refrigeration temperatures, can be an effective alternative in the control of biofilms in the food industry.

Key-words: Food. Poultry. Biofilm. EPS. Sanitation. *Quorum sensing*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo esquemático das fases de formação do biofilme de <i>S. epidermidis</i>	27
Figura 2 - Autoindutor tipo 1: sinais de <i>quorum sensing</i> em bactérias Gram negativas.....	29
Figura 3 - Produção de violaceína por <i>Chromobacterium violaceum</i>	31
Figura 4 - Modelo de <i>quorum sensing</i> em bactérias Gram positivas.	32
Figura 5 - Corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano provenientes de abatedouros avícolas.....	48
Figura 6 - Comparação entre a formação de biofilmes monoespécie e multiespécie em polietileno, poliuretano e aço inoxidável após 24 horas de incubação, sob todas as condições ambientais testadas. Médias das repetições.	57
Figura 7 - Formação de biofilmes monoespécie e multiespécie pelos microrganismos <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7) e <i>S. Enteritidis</i> (SE24) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável após 24 horas de incubação, sob todas as condições ambientais testadas.	58
Figura 8 - Resultado das incubações do controle positivo (A), controle negativo (B) e amostras (C) após 24 horas de contato com a cepa biossensora <i>Chromobacterium violaceum</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formação de biofilmes monoespécie por <i>S. Enteritidis</i> (SE24), <i>L. monocytogenes</i> (L4) e <i>E. coli</i> (C7) em todas as superfícies e temperaturas, após 24 horas de incubação. Média das triplicatas.	53
Tabela 2 - Formação de biofilmes multiespécies por <i>S. Enteritidis</i> (SE24), <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7) e <i>C. jejuni</i> (CJ134) em todas as superfícies, tempos e condições ambientais testadas. Média das triplicatas.	53
Tabela 3 - Formação de biofilmes monoespécie pelas cepas de <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4) e <i>E. coli</i> (C7) sob diferentes temperaturas, em todas as superfícies testadas, após 24 horas de incubação. Médias das triplicatas.	54
Tabela 4 - Formação de biofilmes multiespécies pelas cepas de <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7) e <i>S. Enteritidis</i> (SE24) e <i>C. jejuni</i> (CJ134), em todas as superfícies e tempos testados, nas diferentes temperaturas de incubação. Médias das triplicatas.	55
Tabela 5 - Formação de biofilmes monoespécie por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4) e <i>E. coli</i> (C7) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável, sob todas as condições ambientais testadas, após 24 horas de incubação. Médias das triplicatas.	55
Tabela 6 - Formação de biofilmes multiespécies por <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>S. Enteritidis</i> (SE24) e <i>C. jejuni</i> (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável, sob todas as condições ambientais testadas. Médias das triplicatas.	56
Tabela 7 - Formação de biofilmes monoespécie total e multiespécie nas superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável em 24 horas de incubação, sob todas as temperaturas testadas. Média das triplicatas.	56
Tabela 8 - Formação de biofilmes monoespécie total e multiespécie nas superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável em 24 horas de incubação, sob todas as condições testadas. Médias das triplicatas.	57
Tabela 9 - Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 04 horas de incubação. Médias das triplicatas.	60
Tabela 10 - Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 12 horas de incubação. Médias das triplicatas.	60

Tabela 11 - Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 24 horas de incubação. Médias das triplicatas.	60
Tabela 12 - Comparação entre a quantificação de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies antes e após as higienizações. Sob todas as condições de tempo, temperatura e superfícies testadas.	61
Tabela 13 - Comparação entre a quantificação de EPS e a formação de bofilmes multiespécies sob todas as condições de tempo, temperatura e superfícies testadas.	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	BIOFILMES.....	27
2.1.1	Comunicação celular em biofilmes bacterianos	299
2.1.1.1	<i>Comunicação celular intraespécie em bactérias Gram negativas</i>	29
2.1.1.2	<i>Comunicação celular intraespécie em bactérias Gram positivas</i>	31
2.1.1.3	<i>Comunicação celular interespecie em bactérias Gram positivas e Gram negativas</i>	32
2.1.2	Biofilmes e a indústria de alimentos.....	32
2.1.2.1	<i>Procedimentos de sanitização x formação de biofilmes na indústria de alimentos</i>	35
2.2	INDÚSTRIA AVÍCOLA.....	36
2.2.1	Temperaturas em abatedouros avícolas	37
2.2.2	Principais microrganismos relacionados à carne de frango.....	38
2.2.2.1	<i>Gênero Salmonella spp.</i>	38
2.2.2.2	<i>Listeria spp.</i>	41
2.2.2.3	<i>Campylobacter spp.</i>	43
2.2.2.4	<i>Escherichia coli</i>	45
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1	AMOSTRAS PARA FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONO E MULTIESPÉCIES	47
3.2	FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONOESPÉCIE E MULTIESPÉCIES	48
3.2.1	Preparação dos corpos de prova	48
3.2.2	Formação de biofilmes	48
3.3	ANÁLISES REALIZADAS APÓS A FORMAÇÃO DOS BIOFILMES.....	49
3.3.1	Coleta das células planctônicas	49
3.3.2	Tratamento dos cupons após as incubações	49
3.3.2.1	<i>Avaliação dos procedimentos de sanitização</i>	49
3.3.2.2	<i>Desadesão e coleta das células sésseis</i>	50
3.3.3	Avaliação das moléculas autoindutoras.....	50
3.3.3.1	<i>Purificação das moléculas autoindutoras</i>	50

3.3.3.2	<i>Avaliação da produção de moléculas autoindutoras 1 pela cepa biossensora Chromobacterium violaceum</i>	51
3.3.4	Quantificação da produção de EPS.....	51
3.3.5	Quantificação da formação de biofilmes monoespécie e multiespécie.....	51
3.3.6	Análise estatística.....	52
4	RESULTADOS	53
4.1	FORMAÇÃO DOS BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES..	53
4.1.1	Média da formação dos biofilmes monoespécies	53
4.1.2	Média da formação dos biofilmes multiespécies	53
4.2	INFLUÊNCIA DAS TEMPERATURAS NOS BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES	54
4.2.1	Influência das temperaturas nos biofilmes monoespécies	54
4.2.2	Influência das temperaturas nos biofilmes multiespécies	54
4.3	INFLUÊNCIA DAS SUPERFÍCIES NOS BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES	55
4.3.1	Influência das superfícies nos biofilmes monoespécies.....	55
4.3.2	Influência das superfícies nos biofilmes multiespécies	55
4.4	COMPARAÇÃO ENTRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES NO TEMPO DE 24 HORAS DE INCUBAÇÃO..	56
4.4.1	Comparação entre as médias de formação dos biofilmes monoespécies e multiespécies.....	56
4.4.2	Influência das superfícies nos biofilmes monoespécies e multiespécies	56
4.4.3	Influência das superfícies e das temperaturas nos biofilmes monoespécies e multiespécies.....	57
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE EPS NOS BIOFILMES MULTIESPÉCIES	58
4.5.1	Quantificação de EPS nos biofilmes multiespécies antes da higienização	58
4.5.2	Comparação entre a quantificação de EPS nos biofilmes multiespécies antes e após a sanitização dos cupons	61
4.6	RELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE EPS ANTES DO TRATAMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIE	61
4.7	RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS AUTOINDUTORAS 1 PELA CEPA BIOSSENSORA CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM	62

5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO.....	93

1 INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes nos equipamentos e nos utensílios é uma das principais causas da contaminação dos alimentos no ambiente de processamento. Biofilmes são definidos como comunidades microbianas, compostas por seres da mesma espécie (monoespécie) ou de espécies diferentes (multiespécies), envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), aderidas a superfícies bióticas ou abióticas. Essa matriz confere ao biofilme uma estrutura tridimensional e proporciona resistência à ação de antibióticos e sanitizantes. Isso contribui para que as células sésseis sejam de 500 a 1000 vezes mais resistentes que as células planctônicas. Assim, comunidades bacterianas tornam-se ainda mais difíceis de eliminar durante os processos de higienização na indústria.

Durante a formação dessas comunidades, as bactérias trocam informações e se comunicam através da difusão de moléculas sinalizadoras no ambiente. Essas moléculas passam a ser percebidas pelas bactérias quando existe uma grande quantidade no meio. É preciso que haja uma densidade populacional relativamente alta para que as mesmas tenham *quorum* suficiente para serem detectadas. Essas pequenas moléculas são denominadas autoindutores e são responsáveis por sincronizar as atividades dentro da comunidade bacteriana, seja ativando genes de virulência, produzindo enzimas, induzindo a formação de biofilmes ou estimulando a produção de EPS.

O Brasil, por ser o maior exportador de carne de aves, precisa manter os padrões de higiene e qualidade como prioridades na indústria avícola. Apesar dos controles estabelecidos, casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido reportados com relação ao consumo de frango, ovos e subprodutos. Dentre os principais microrganismos envolvidos estão *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni*. Além destes, os microrganismos *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* também têm sido isolados de abatedouros avícolas. No ambiente de processamento, se as condições forem favoráveis, estes microrganismos poderão estar aderidos às superfícies formando biofilmes monoespécies ou multiespécies. Devido à variedade de microrganismos encontrados nas diversas matérias-primas, geralmente na indústria ocorre a formação de biofilmes multiespécies. A interação entre os microrganismos torna os estudos sobre as comunidades mistas mais complexos. As bactérias envolvidas, as superfícies e as condições ambientais são fatores que afetam a formação de biofilmes.

Partindo do pressuposto que estes microrganismos estariam formando biofilmes no ambiente avícola, objetivou-se estudar a formação de biofilmes mono e multiespécies em três superfícies diferentes. Avaliou-se, nestes biofilmes, a quantificação de EPS e a produção de moléculas sinalizadoras, antes e após o contato com sanitizantes comumente utilizados na indústria.

Assim, pretende-se que este estudo sobre formação de biofilmes e sistema de comunicação celular auxilie na eliminação de microrganismos na indústria, ou no tratamento e prevenção de infecções. Pois, uma vez que as interações entre os microrganismos são analisadas, estudos futuros podem auxiliar na eliminação ou interrupção da formação de biofilmes através da interrupção da comunicação celular, levando a um grande avanço no controle microbiológico dos alimentos.

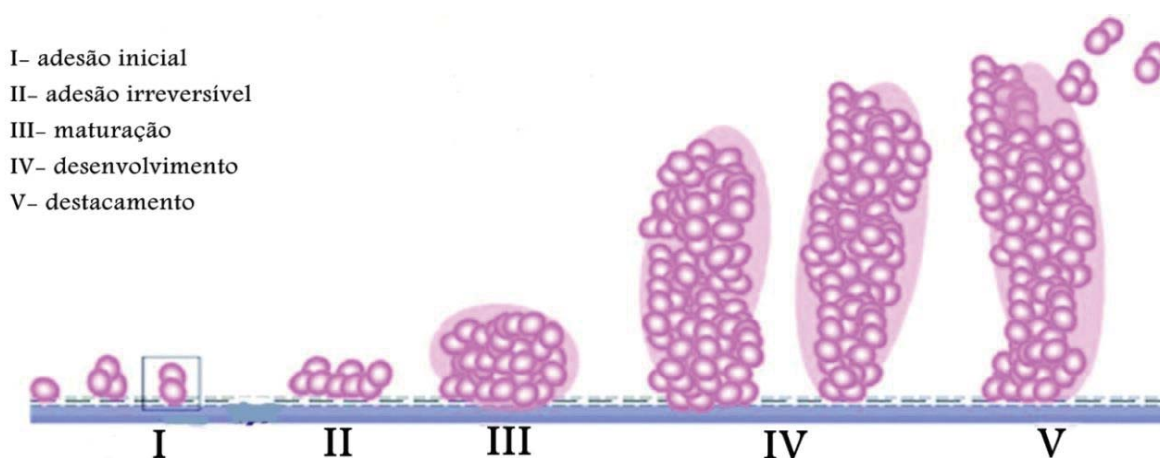
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOFILMES

Inicialmente, acreditava-se que os microrganismos viviam como células planctônicas em suspensão. Com o passar dos anos, constatou-se que 99% das bactérias encontram-se formando comunidades sésseis (COSTERTON et al. 1987; DALTON et al., 2011). Van Leeuwenhoek foi um dos pioneiros na descoberta do que hoje se denomina biofilme. Sua primeira observação de adesão bacteriana foi na superfície de dentes utilizando microscópio simples (DONLAN, 2002). O conceito de biofilmes evoluiu na medida em que foram realizados novos estudos. Costerton et al. (1995) definiram biofilmes como comunidades complexas de microrganismos ligados entre si e à uma superfície, incorporados numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Biofilmes também são definidos como uma comunidade sésseis que exibe um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e à transcrição de genes, onde as células estão irreversivelmente ligadas a um substrato e incorporadas a uma matriz polimérica extracelular produzida pelos microrganismos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Novos conceitos tem acrescentado a possibilidade da superfície de adesão ser de caráter biótica ou abiótica (GUPTA, 2015).

A formação do biofilme ocorre conforme as etapas apresentadas na Figura 1: adesão inicial, adesão irreversível, maturação, desenvolvimento e destacamento (O'TOOLE et al., 2000; GARRETT, 2008; GUPTA, 2015).

Figura 1 - Modelo esquemático das fases de formação do biofilme de *S. epidermidis*.



Fonte: Adaptado de Qian et al. (2004)

As vantagens da adesão para os microrganismos são inúmeras. Dentre elas pode-se citar: proteção contra antibióticos (MARQUES et al., 2017), sanitizantes (RYU; BEUCHAT, 2005; WANG et al.; 2014) e ambientes dinâmicos (SCHAEFFER et al., 2016; SEGHIR et al., 2017).

A composição do biofilme depende das espécies formadoras, sendo constituído em sua maioria pela matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) 75-90 % e por células 10-25 % (COSTERTON et al., 1987; KOKARE et al., 2009). O EPS formado é constituído em sua maioria por polissacarídeos, proteínas, lípidos e ácidos nucléicos. Essa estrutura permite ao biofilme um formato tridimensional, uma maior resistência mecânica e tem um importante papel na retenção de água e nutrientes para as microcolônias (FLEMMING; WINGENDER, 2010; YARON; RÖMLING, 2014). A matriz auxilia a resistência das células contra inúmeras condições de estresse, como escassez de água e nutrientes ou a presença de biocidas e antimicrobianos no meio (KIVES et al., 2006). O biofilme formado com EPS se mantém protegido contra a dessecação, devido à hidratação proporcionada principalmente pela captura de água através dos carboidratos, contra a radiação ultravioleta, impede que os sanitizantes atuem nos sítios ativos e protegem contra variações de pH e choques osmóticos (PRAKASH et al., 2003; BOARI et al.; 2009, GUPTA, 2015). Cepas deficientes nos genes responsáveis pela produção da matriz de substâncias poliméricas extracelulares formam biofilmes mais frágeis e fáceis de serem eliminados, justamente pela falta de resistência mecânica e proteção contra os agentes antimicrobianos (DANESE et al., 2000; RINAUDI; GONZALEZ, 2009).

Ryu e Beuchat (2005) avaliaram a importância do biofilme e do EPS para o microrganismo *Escherichia coli* O157: H7. Para isto, as estirpes ATCC 43895 e 43895-EPS (mutante capaz de produzir EPS) foram testadas quanto à resistência ao cloro. As células planctônicas da estirpe 43895-EPS foram cultivadas sob condições de suporte de produção de EPS. As células planctônicas de todas as estirpes foram mortas após 10 minutos de exposição ao tratamento de 50 µg de cloro/mL. No entanto, quando ligados aos cupons de aço inoxidável, a estirpe produtora de EPS (43895-EPS) demonstrou maior resistência ao cloro, indicando que o biofilme e o EPS lhe proporcionou proteção contra o sanitizante.

Além disso, dentro da matriz, as moléculas de *quorum sensing* responsáveis pela comunicação celular se concentram em quantidade suficiente para serem detectadas pelos microrganismos (SUTHERLAND, 2001).

2.1.1 Comunicação celular em biofilmes bacterianos

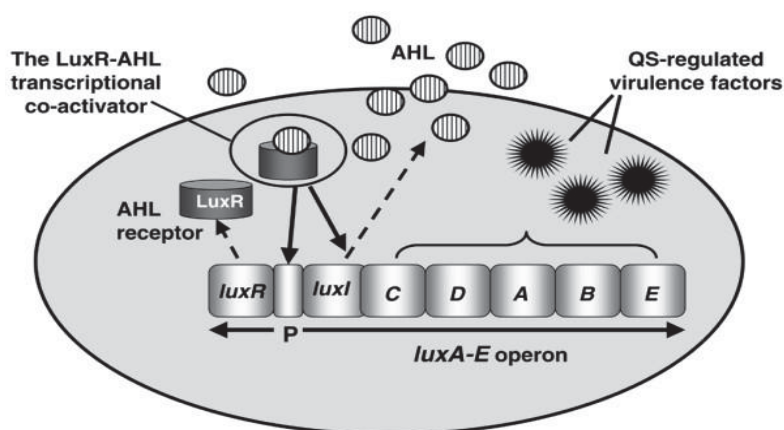
A comunicação célula-célula das bactérias é denominada *quorum sensing*. Esta comunicação está diretamente relacionada com a densidade populacional das mesmas. É necessário que uma grande quantidade de microrganismos secretem as moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* no meio para que haja *quorum* suficientemente alto para ser detectado pelas bactérias. A partir do momento que a comunidade bacteriana passa a se comunicar, as ações deixam de ser individuais e passam a ser coletivas. Dentre alguns mecanismos regulados por *quorum sensing* destaca-se: formação de biofilmes, produção de EPS, motilidade, patogenicidade e fatores de virulência (NESSE, et al. 2011; GAO et al., 2012; YANG; DEFOIRDT, 2014; SUN et al., 2014; LI et al., 2015; CHENG et al., 2017).

A comunicação celular pode ocorrer intra ou interespecies e para isto as bactérias utilizam mecanismos distintos. A comunicação interespecies é especialmente importante quando se trata de biofilmes na indústria de alimentos, uma vez que a grande quantidade de matérias-primas e insumos implica em uma maior variedade de microrganismos no ambiente de manipulação, podendo formar biofilmes multiespécie.

2.1.1.1 Comunicação celular intraespécie em bactérias Gram negativas

A comunicação celular nas bactérias Gram negativas (Figura 2) ocorre através da secreção de moléculas acil homoserina lactonas (AHL) denominadas autoindutoras 1 sintetizadas por enzimas da família LuxI (LANDINI et al., 2010; YANG et al, 2012).

Figura 2 - Autoindutor tipo 1: sinais de *quorum sensing* em bactérias Gram negativas



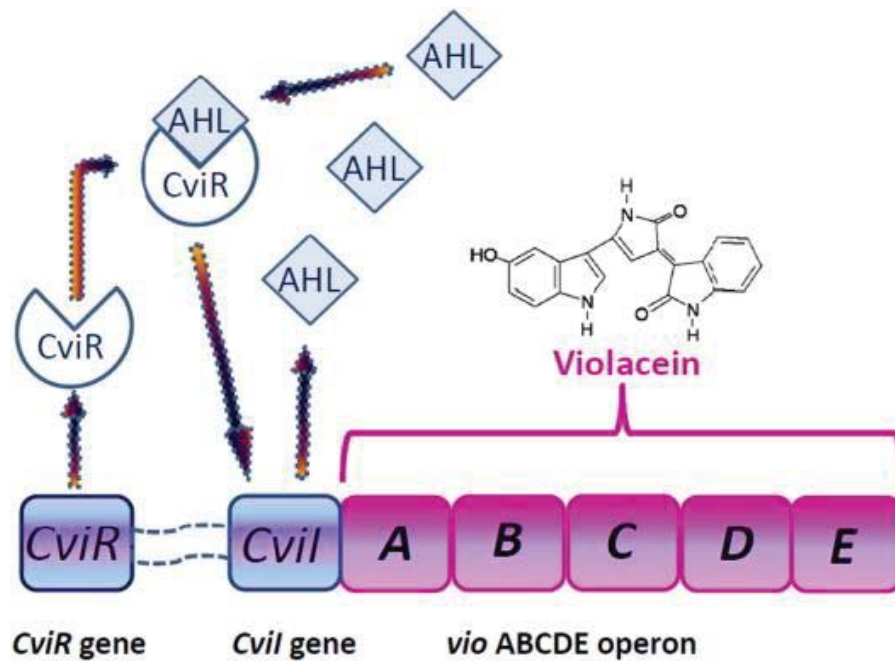
Fonte: Asad e Opal (2008)

Cada bactéria Gram negativa durante sua comunicação excretará moléculas AHL, que possuirão um anel de homoserina lactona ligado a uma cadeia acil variável, de quatro a dezoito carbonos (PARSEK et al., 1999; READING; SPERANDIO, 2005; YANG et al, 2012). As moléculas autoindutoras 1 (AI-1) atravessam a membrana das bactérias por difusão simples e são acumuladas intra e extracelularmente. Ao penetrar a membrana, liga-se à proteína receptora LuxR, e a partir disso o comportamento do grupo será coordenado através dos genes de expressão (BASSLER, 2002; ZAN et al., 2014).

O sistema LuxR/I responsável pela comunicação das bactérias Gram-negativas foi observado primeiramente em *Vibrio fischeri*. O gene *luxI* sintetiza a molécula N-(3-oxohexanoil) e a proteína LuxR codifica um fator responsável pela transcrição do sinal da AHL, necessária para a ativação do gene de luminescência (SCHAEFER et al., 1996). Alguns microrganismos possuem sistemas homólogos ao *luxI/luxR*, como é o caso da bactéria utilizada neste trabalho, a *Chromobacterium violaceum* (FUQUA et al., 1994; LANG; FAURE, 2014)

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa produtora de violaceína, um pigmento púrpura e insolúvel em água, como resposta à expressão genética devido à presença de AHL (Figura 3). Os genes que regulam a produção deste pigmento são *vioD*, *vioC*, *vioB* e *vioA*. *C. violaceum* CV026 é uma das cepas mutantes deste microrganismo, utilizada para detecção do AI-1. Esta estirpe é deficiente na produção de violaceína, conseguindo produzi-la apenas pela adição de AHL exógena. Por isso, pode ser utilizada como um biossensor. (MCCLEAN et al., 1997; VASAVI et al., 2013).

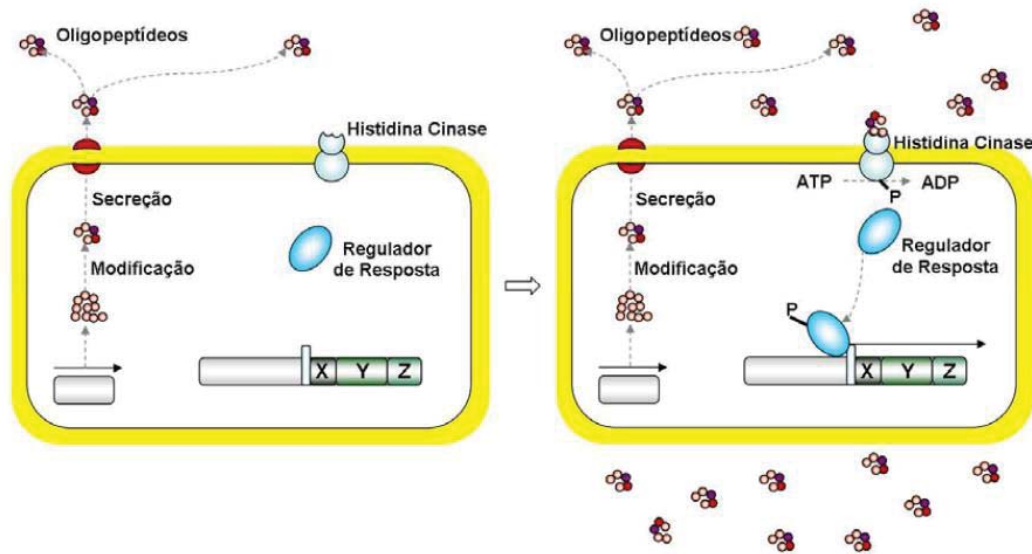
Figura 3 - Produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*.



Fonte: Durán et al. (2016).

2.1.1.2 Comunicação celular intraespécie em bactérias Gram positivas

As bactérias Gram positivas secretam pequenos peptídeos como moléculas autoindutoras (AIP). Diferente do AI-1 que permeia a membrana celular das bactérias por difusão, os AIP necessitam de transportadores para facilitar a secreção ao meio externo (Figura 4) (READING; SPERANDIO, 2005; VIANA, 2006). O detector para o AIP é denominado de sensor de cinase, o mesmo transfere o sinal fosforilado ao regulador de resposta. Este é uma proteína de ligação de DNA cuja função é induzir a expressão de genes alvos (SCHAUDER; BASSLER, 2001).

Figura 4 - Modelo de *quorum sensing* em bactérias Gram positivas.

Fonte: Viana (2006)

2.1.1.3 Comunicação celular interespecie em bactérias Gram positivas e Gram negativas

A comunicação interespecie foi observada pela primeira vez em 1979, quando Greenberg et al. (1979) publicou uma obra em que o *Vibrio harveyi* ativava o mecanismo de bioluminescência após a adição de sobrenadante livre de células do cultivo de outras espécies bacterianas (PEREIRA et al., 2013). A molécula denominada de linguagem universal é a furanosil borato diester, sintetizada pela proteína LuxS. Esta proteína codifica a enzima S-ribosilhomocisteinase que participa do metabolismo da S-adenosilmetionina (SAM) e atua na produção de autoindutores-2 (AI-2) (FERNANDES, 2014).

Este sistema de comunicação universal é um avanço para a adaptação dos microrganismos. Dados revelam que o autoindutor 2 já foi identificado em mais de 285 espécies de bactérias, principalmente *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia sp* e que a regulação deste sistema atua de forma complexa, tendo a modulação dos autoindutores, sob influencia ambiental (RUMJANEK et al., 2004)

2.1.2 Biofilmes e a indústria de alimentos

A problemática dos biofilmes na indústria de alimentos reside principalmente na dificuldade de eliminá-lo. O ambiente de processamento em si, já é um fator que colabora para adesão microbiana, devido à grande quantidade de nutrientes disponíveis no meio. Nas

superfícies em contato com alimentos se não houver uma higienização adequada, certamente haverá condições de adesão microbiana (ANDRADE, 2008). Várias superfícies tem sido demonstradas como possíveis fontes de biofilmes na indústria de alimentos, ácido inoxidável (PAN et al., 2006; BOARI et al., 2009; CHIA et al., 2009; GIÃO; KEEVIL, 2013; VIVIAN, 2014; ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ et al., 2015), poliuretano (BERESFORD et al., 2001; CHIA et al., 2009; ZIECH, 2015), poliestireno (RODRIGUES et al., 2009; CARANDINA, 2013; VIVIAN, 2014; ZIECH, 2015), vidro (DI BONAVENTURA et al., 2008; KUBOTA et al., 2008; BONSAGLIA, 2012; DANTAS, 2014), borracha (SINDE; CARBALLO, 2000; BERESFORD et al., 2001; CHIA et al., 2009) e teflon (PAN et al., 2006; CHIA et al., 2009).

Além dos problemas relacionados à contaminação dos alimentos devido ao despreendimento de células bacterianas, a formação de biofilmes nas superfícies dos equipamentos diminui sua eficiência, reduzindo a troca de calor, por exemplo, e provocando o fenômeno denominado de biocorrosão. Esses danos resultam em problemas de saúde e perdas econômicas (BEECH, 2005; SIMÕES, 2008).

Segundo a Portaria N° 368, de 04 de setembro de 1997 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997) todos os equipamentos e utensílios nas áreas de manipulação de alimentos, que possam entrar em contato com estes, devem ser:

de materiais que não transmitam substâncias tóxicas, odores nem sabores, e sejam não absorventes e resistentes à corrosão e capazes de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção. As superfícies deverão ser lisas e estar isentas de imperfeições (fendas, amassaduras etc) que possam comprometer a higiene dos alimentos ou sejam fontes de contaminação. Deve ser evitado o uso de madeira e outros materiais que não se possa limpar e desinfetar adequadamente, a menos que não tenha certeza de seu emprego não será uma fonte de contaminação. Deverá ser evitado o uso de diferentes materiais com a finalidade de evitar corrosão por contato.

Os materiais utilizados na indústria alimentícia são os mais variados possíveis, como plásticos, cerâmica, metal, vidro, borracha, dentre outros. O processo de higienização e o agente químico a ser empregado serão influenciados pelo material das superfícies, levando-se em consideração sua conservação e a eficiência da higienização (PRATES; FERNANDES, 2015). O Quadro 1 traz as características de algumas superfícies utilizadas no ambiente de processamento de alimentos.

Andrade (2008) considera que tintas, borracha, poliuretano, polipropileno, PVC e silicone estão entre as superfícies mais propensas à adesão microbiana. Segundo Rossoni e Gaylarde (2000) todas as superfícies que entram em contato com os alimentos podem ser uma fonte de adesão microbiana, até mesmo quando os programas de higiene e sanitização são corretamente aplicados.

Quadro 1 - Características das principais superfícies utilizadas na indústria de alimentos.

SUPERFÍCIES	CARACTERÍSTICAS	CUIDADOS
AÇO INOXIDÁVEL	Geralmente resistente à corrosão; Superfície lisa e impermeável; Resistente à oxidação a altas temperaturas; Fácil higienização.	Certas ligas podem ser corroídas por halogênios.
AÇO-CARBONO	Corroído por detergentes ácidos e alcalinos.	Deve ser galvanizado ou estanhado. Usar detergente neutro na higienização.
CONCRETO	Danificado por alimentos ácidos e agentes de limpeza.	Deve ser denso e resistente aos ácidos.
VIDRO	Liso e impermeável. Danificado por alcalinos fortes e outros agentes de limpeza.	Deve ser limpo com detergente neutro ou de média alcalinidade.
MÁRMORE	Resistente ao calor, vulnerável a desgastes físico e reações químicas.	Deve ser limpo com detergente neutro ou de média alcalinidade.
BORRACHA	Não deve ser porosa, não esponjosa. Não ser afetada por agentes alcalinos fortes. Não ser atacada por solventes orgânicos e ácidos fortes	Pode ser oxidada por produtos de limpeza. Possibilidade de adesão bacteriana.
MADEIRA	Permeável à umidade, gordura e óleo. Difícil manutenção. É destruída por alcalinos fortes.	Difícil de higienizar.
POLIPROPILENO	Resistente a agentes químicos, como ácidos e alcalinos.	Biodegradabilidade extremamente difícil. Pode ocorrer processo de adesão microbiana.

Fonte: Andrade (2008).

Na indústria de alimentos os polímeros, como o polietileno das placas de corte e o poliuretano das esteiras de transporte, possuem ampla utilização, devido à elevada durabilidade, resistência a ácidos e baixo custo. No entanto, se observado com técnicas de microscopia

eletrônica, pode-se notar que estes materiais possuem imperfeições que facilitam a deposição de material orgânico, dificultando a ação dos agentes desinfetantes sendo, assim, mais propícios à formação de biofilmes (ANDRADE, 2008; SINDE; CARBALLO, 2000).

O aço inoxidável é considerado uma superfície de eleição durante a fabricação de utensílios e equipamentos na indústria alimentícia, pois é de fácil higienização e possui uma textura mais uniforme que os polímeros (ANDRADE, 2008). Contudo, apesar da aparência macroscópica lisa, o tempo de uso na indústria pode acarretar em microfissuras e fendas, utilizadas pelas bactérias como ambiente de adesão (WIRTANEN et al., 1996). A presença de soldas dificulta a realização dos processos de higienização, propiciam maior retenção de resíduos e, conseqüentemente, podem facilitar os processos de adesão e formação de biofilme microbiano (CASARIN, 2014).

Por isso, o polietileno, poliuretano e aço inoxidável que são superfícies de grande uso no ambiente de manipulação de alimentos foram investigadas neste trabalho quanto à adesão de microrganismos.

2.1.2.1 Procedimentos de sanitização x formação de biofilmes na indústria de alimentos

Os procedimentos de higienização devem ser executados de modo que não interfiram nas propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos, e garanta aos consumidores produtos que não ofereçam riscos à saúde (GERMANO; GERMANO, 2001). Segundo a RDC n. 275 (BRASIL, 2002), a higienização é uma operação que se divide em duas etapas: limpeza e desinfecção. Sendo a limpeza responsável pela remoção de terra, resíduos de alimentos, sujidades e ou outras substâncias indesejáveis. E a desinfecção, responsável pela redução por método físico e ou agente químico, do número de microrganismos a um nível que não comprometa a segurança do alimento.

A correta higienização das superfícies e equipamentos é a maneira mais eficaz de evitar as contaminações por biofilmes, uma vez que sua remoção é dificultada pelos fatores já mencionados anteriormente. A limpeza e a sanitização das superfícies deve ocorrer de forma que remova as matérias orgânicas que iriam auxiliar no processo de adesão; e eliminar os microrganismos das superfícies, respeitando os tempos necessários de cada princípio ativo e o os tempos de higienização em cada turno de trabalho nas indústrias. As superfícies devem ser trocadas sempre que apresentarem imperfeições ou ranhuras, para evitar a deposição de microrganismos. Essas medidas evitariam a formação de biofilmes uma vez que Lemos (2002) afirma que seriam necessárias duas a quatro semanas para sua formação, e para isto os sistemas

de limpeza e sanitização seriam deficientes. Para que a limpeza seja eficiente no controle de biofilmes ela deve ser efetuada de maneira que consiga romper ou dissolver a matriz de EPS, para que posteriormente, os desinfetantes possam ter acesso às células das bactérias (SIMÕES et al., 2006). Além disso, por este processo remover apenas 90 % das bactérias, é necessário o processo de desinfecção para evitar que os 10% restantes se liguem novamente às superfícies, formando um novo biofilme (SREY; JAHID; HA, 2013).

A desinfecção ou sanitização pode ser realizada pelo uso de agentes físicos, como o calor ou agentes químicos como o cloro (ANDRADE, 2008).

O hipoclorito de sódio é um sanitizante muito utilizado em ambientes de pH ácido e por ser um importante agente antimicrobiano no combate às células do biofilme (IMMING, 2013). Menegaro et al. (2015) encontraram o cloro como o sanitizante mais utilizado para equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias no sudoeste do Paraná e, segundo os autores, a eficiência, o baixo custo, a facilidade no acesso e a disponibilidades no mercado justificaria esse resultado. Para que ocorra uma higienização eficiente deve-se considerar a concentração, a temperatura, tempo de exposição e ação mecânica adequada (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC; 2010).

A água quente (82,2°C) é utilizada para descontaminação de utensílios utilizados durante o manuseio de carcaças. Facas, serras e alicates, no mínimo, devem ser lavados e sanificados (através da imersão em esterilizadores 82° C por 20 segundos) após cada operação (BRASIL, 2005). Barbosa (2012) submeteu facas contaminadas à remoção dos microrganismos pela imersão em banho-maria, onde a faca ficou totalmente coberta por água quente (82,2°C) por 15 segundos. O tratamento mostrou-se eficiente, com redução dos microrganismos, *E. coli* e *L. monocytogenes*, nos materiais testados.

Tapp III et al. (2013) observaram que o tratamento com água quente a 82,2°C foi mais eficaz na remoção de *E. coli* e *Salmonella* na superfícies de facas contaminadas artificialmente do que sanitizantes químicos, como metasilicato de sódio (1,1%), de amônia quaternária (200 ppm), cloro (200 ppm) e ácido láctico (5%).

2.2 INDÚSTRIA AVÍCOLA

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016), o Brasil é o segundo produtor mundial de carne de frango e o primeiro exportador deste produto.

O aumento da produção e comercialização dos produtos avícolas no Brasil exigiu dos órgãos competentes, o estabelecimento de normas e regras para que toda esta cadeia produtiva

mantivesse rígidos padrões de qualidade, para garantir que o produto final tivesse a qualidade e a segurança desejada (VIVIAN, 2014). A Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. De acordo com esta portaria, a lavagem e a desinfecção das instalações, equipamentos e utensílios, devem obedecer as seguintes etapas: a) Pré-lavagem com água sob pressão para remoção de sólidos; b) Remoção física por ajuda mecânica ou uso de detergentes; c) Lavagem para a remoção de detergentes e sólidos; d) Aplicação de desinfetantes, quando necessário e, sempre procedido de completa enxaguem (BRASIL, 1998).

Nas indústrias avícolas os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) são responsáveis por descrever todos os procedimentos de limpeza e sanitização executados diariamente pelo estabelecimento para prevenir a contaminação do produto. O PPHO é subdividido em higiene Pré-Operacional e Operacional. O PPHO Pré-Operacional abrange os procedimentos de limpeza e sanitização executados antes do início das atividades do estabelecimento, ou seja, incluem desde a higienização realizada após o encerramento da produção até as atividades imediatamente anteriores ao início das mesmas. O PPHO Operacional inclui a limpeza, sanitização e sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e nos intervalos entre turnos, inclusive nas paradas para descanso e almoço (BRASIL, 2003b).

2.2.1 Temperaturas em abatedouros avícolas

A Portaria nº 210 de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento preconiza a temperatura de refrigeração entre 0°C a 4°C para os produtos avícolas (carcaças, cortes ou recortes, miúdos e/ou derivados), com tolerância de 1°C. As salas de cortes e/ou desossa devem garantir temperatura ambiente não superior a 12°C e a água *chiller* utilizada para resfriar os produtos deve estar no máximo 4°C (BRASIL, 1998).

Assim, este trabalho selecionou as temperaturas para formação dos biofilmes de acordo com as temperaturas preconizadas na legislação, de forma a mimetizar as condições de um abatedouro avícola. 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura da sala de cortes para UE, máximo 12°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 bactérias termófilas, como *Campylobacter*, para pesquisa de biofilmes multiespécies).

2.2.2 Principais microrganismos relacionados à carne de frango

2.2.2.1 Gênero *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é formado por microrganismos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de endosporos e com morfologia de bastonetes curtos. São móveis em sua maioria, apresentando flagelos peritríquios, com exceção da *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* que são imóveis. Possuem a capacidade de fermentar glicose, com produção de ácido e gás, porém não metabolizam lactose e sacarose. A temperatura ótima de multiplicação é de cerca de 38°C e a mínima fica em torno de 5°C (FORSYTHE, 2013). Atualmente este gênero é composto pelas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. A espécie *S. bongori* é formada apenas pela subespécie *bongori*. Já a espécie *Salmonella enterica* é formada por cinco subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizone*, *diarizone*, *housteane* e *indica*. As subespécies são ainda divididas em mais de 2500 sorotipos ou sorovares de acordo com o antígeno somático O, presente na parede celular de lipopolissacarídeos; o antígeno Vi de superfície e o antígeno flagelar H de natureza proteica (GRIMONT; WEILL 2007, PEGUES; MILLER, 2015). O sorotipo Enteritidis foi o mais prevalente entre os surtos de salmoneloses ocorridas nos EUA no de 2016 (MARDER et al., 2017)

A salmonelose é uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças transmitidas por alimentos (DTA). Estima-se que acometa dezenas de milhões de pessoas no mundo a cada ano, ocasionando mais de cem mil mortes. Os sintomas desta doença são geralmente brandos e o paciente se recupera sem tratamento específico. Grupos de risco, tais como crianças, gestantes, imunodeprimidos ou idosos podem estar mais vulneráveis e através da desidratação correr risco de morte. Febre, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos são as principais características desta infecção (OMS, 2013). Apesar da subnotificação no Brasil, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são os três principais patógenos envolvidos em surtos de DTA. Dos anos 2007 a 2016 a *Salmonella* foi responsável por 7,3% (aproximadamente 499 casos) dos surtos, ficando atrás somente dos casos onde não se pode identificar o agente causador (BRASIL, 2016).

Os principais alimentos envolvidos em surtos de salmonelose são frango, ovos, leite e produtos lácteos, frutas e vegetais consumidos crus (FDA, 2012). A proliferação da *Salmonella* na granja pode ocorrer tanto por transmissão horizontal via fezes dos animais infectados, uma vez que as aves são coprofágicas, quanto por transmissão vertical, onde os ovos já saem contaminados, havendo no último caso, grande mortalidade das aves na primeira semana de

vida. O controle da ração e da qualidade da água é de suma importância para impedir a entrada de *Salmonella* spp. nos plantéis avícolas (VASCONCELLOS et.al, 2014). Quando a patologia não é diagnosticada nas granjas e os animais infectados, geralmente assintomáticos, são enviados às fábricas para o abate, toda a linha de processamento fica comprometida. O microrganismo pode espalhar-se pela fábrica, contaminando as superfícies dos equipamentos e os utensílios de cozinha, promovendo assim a contaminação cruzada entre animais doentes e saudáveis (HAMMACK, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, representam os dois sorotipos mais envolvidos em surtos alimentares (OMS, 2013). No ano de 2015 dois surtos de *Salmonella* Enteritidis foram registrados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Um dos surtos ocorreu de 09 de maio a 22 de julho de 2015 na cidade de Minnesota (EUA), resultando em cinco casos notificados e duas internações. Todos os envolvidos haviam ingerido algum produto da marca de congelados Antioch Farms, produzido pela Aspen Foods. A empresa foi obrigada a realizar o *recall* de 1,9 milhões de libras em frango congelado cru, recheado e empanado que poderiam estar contaminados com o patógeno. Em outubro deste mesmo ano, após a FSIS-USDA (Agência de Segurança e Serviço de Inspeção Alimentar do Departamento de Agricultura dos EUA) confirmar a contaminação destes produtos, a Aspen Foods expandiu para mais 561.000 libras o recolhimento dos produtos (CDC, 2015).

O outro surto obteve uma proporção maior, 15 pessoas foram infectadas com estirpes de *Salmonella* Enteritidis em sete estados dos Estados Unidos da América. Uma pessoa em Connecticut, duas em Illinois, oito em Minnesota, uma em New Hampshire, uma em Nova Iorque, uma em Oklahoma e uma em Wisconsin. A fonte de contaminação foi frango cru congelado, empanado e recheado produzido por Barber Foods. Inicialmente a empresa recolheu 58.320 libras em produtos porque poderiam estar contaminados com *Salmonella* Enteritidis. Posteriormente recolheu mais 1,7 milhões de libras em produtos congelados, matérias-primas e frangos recheados. Das quatro cepas isoladas 100% (4) foram resistentes a ampicilina e a tetraciclina (CDC, 2015). Embora os dois surtos estejam encerrados, o CDC alerta que por se tratar de produtos congelados e, conseqüentemente, com vida útil prolongada, é possível que ainda tenham exemplares nos congeladores dos consumidores. E caso os mesmos não estejam cientes do *recall*, podem consumir estes alimentos contaminados e sofrerem uma infecção alimentar.

Casos como os supracitados causam inúmeros prejuízos, seja à saúde do consumidor, seja ao Estado, por perdas econômicas durante as internações em hospitais públicos. A indústria

perde economicamente através do *recall* dos produtos suspeitos ou por pagamentos de indenizações aos afetados e, socialmente, por perder a confiança e a credibilidade junto aos consumidores, além de ficar com seu nome relacionado negativamente a casos de surtos.

No Brasil, diversos trabalhos têm alertado sobre a presença de *Salmonella* Enteritidis em produtos avícolas. Pandini et al. (2015) avaliaram 342 amostras de suabes de arrasto provenientes de granjas de corte localizadas no estado do Paraná, de janeiro de 2010 a janeiro de 2011. Destas, 39 (11,4%) amostras foram positivas para *Salmonella* spp., sendo 3 (7,70%) do sorovar Enteritidis. Minharro et al. (2015) analisaram 300 carcaças, 600 corações e 600 fígados que foram recolhidos de 60 lotes de frango, originários dos estados de Tocantins, Goiás, Distrito Federal e São Paulo. Todos os frangos foram abatidos no estado do Tocantins em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF), no período de agosto 2010 a junho de 2011. Houve 11 lotes positivos para *Salmonella* sp., representando 18,33% (11/60). O sorovar Enteritidis foi o de maior predominância, sendo isolado 10 vezes (38,48%). Este sorovar estava presente no coração, fígado e carcaça dos lotes provenientes do Estado de Goiás.

O Brasil tem uma importante presença no cenário mundial de carne de frangos. Garantir a qualidade e a inocuidade dos produtos é essencial para que o país continue na liderança dos mercados exteriores. Em 1994 foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), cujos objetivos foram normatizar as ações de acompanhamento sanitário das aves e estabelecer a cooperação entre as instituições públicas e privadas. O plano englobava as principais doenças aviárias: Doença de Newcastle, Influenza aviária, Salmoneloses (*S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) e Micoplasmoses (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. melleagridis*), de acordo com BRASIL (1994). Em 1998 foi aprovado o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves através da Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA (BRASIL, 1998). Em 2003 duas importantes normativas foram criadas. A Instrução Normativa nº 70, de 10 de outubro de 2003, que institui o Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus (BRASIL, 2003a). E a IN nº 78, de 03 de novembro de 2003, que aprova as normas técnicas para o controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella* Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2003b).

Apesar dos programas de controle nacionais e internacionais para este patógeno, tem sido demonstrada a presença do mesmo em produtos avícolas e, conseqüentemente, no ambiente de manipulação. Nas indústrias, estes microrganismos podem estar nas superfícies dos equipamentos e utensílios formando biofilmes que serão responsáveis pela contaminação

cruzada das matérias-primas. A capacidade de adesão da *Salmonella* tem sido registrada em vários trabalhos. Silva et al. (2014) avaliou quanto à formação de biofilmes, 20 amostras de *S. Enteritidis* (10 oriundas de infecções alimentares e 10 de origem avícola). Observou-se que 100% das amostras de *S. Enteritidis* oriundas de infecções alimentares foram produtoras de biofilmes, destas, 30% foram classificadas como fortemente formadora de biofilme, 50% moderadamente formadora de biofilme e 20% fracamente formadora de biofilme. Já nas amostras de *S. Enteritidis* de produtos avícolas, 80% produziram biofilme, sendo 10% fortemente formadoras, 10% moderadamente formadoras e 60% fracamente formadores de biofilmes.

Ziech (2015) analisou a formação de biofilmes em placas de poliestireno por 98 estirpes de *Salmonella* isoladas de esteiras transportadoras em salas de corte de plantas processadoras de aves. Estas eram habilitadas para exportação, localizadas no estado do Paraná e com abate diário superior a 160 mil aves. Os resultados demonstraram que todas as estirpes formaram biofilmes nas placas de 96 poços de poliestireno. Somente uma estirpe foi fortemente formadora de biofilme e a maioria (69) das estirpes avaliadas neste estudo foram fracamente e 28 foram moderadamente formadoras de biofilmes.

Aviles et al. (2013) concluíram que biofilmes de *Salmonella* podem resistir em alimentos com baixa atividade de água ($A_w = 0,3$) por cerca de 30 dias. Isso demonstra a importância do controle da qualidade da matéria-prima e a correta higienização dos equipamentos para evitar a formação de biofilmes por este patógeno, uma vez que o mesmo pode resistir por longos períodos em condições adversas podendo contaminar alimentos e causar danos à saúde do consumidor.

2.2.2.2 *Listeria spp.*

Listeria é um bacilo Gram positivo, anaeróbico facultativo e não formador de esporos. São móveis à temperatura de 25°C devido à presença de flagelos peritríquios, apresentando movimento característico, denominado tombamento, que auxilia na sua identificação. Este microrganismo apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Segundo Trabulsi e Alterthum (2008), este patógeno intracelular facultativo sobrevive e prolifera-se em macrófagos, enterócitos e outras células. Locomove-se com auxílio de flagelos apenas entre as temperaturas de 20 a 25°C, por isso, o microrganismo desenvolveu estratégia para movimentar-se de outra maneira no corpo humano, sendo este um

ponto importante para a sua virulência. Utiliza, em seu benefício, a actina da célula hospedeira para se mover através e entre as células, similarmente à *Shigella* spp.

O gênero *Listeria* atualmente é composto atualmente por 17 espécies reconhecidas (*Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* e *Listeria booriae*) (ORSI; WIEDMANN, 2016). Dentre as espécies supracitadas, *L. monocytogenes* é a única espécie patogênica transmitida por alimentos, o que a torna um microrganismo importante tratando-se das enfermidades causadas pela ingestão de produtos alimentícios contaminados (FORSYTHE, 2013). Os principais reservatórios desta bactéria são o solo e os vegetais. Estes microrganismos também foram encontrados em hortaliças, água doce, esgoto e do material fecal de várias espécies de mamíferos. Normalmente, aves e peixes são portadores assintomáticos e através das fezes liberam a bactéria no ambiente. Tal fato explica a facilidade da mesma ser encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, tanto “in natura” quanto processado (RYSER; DONNELLY, 2001).

A listeriose é uma doença transmitida por alimentos (DTA) que ocorre em todo o mundo, sendo mais frequentemente diagnosticada em seres humanos que vivem em áreas urbanas nos países desenvolvidos (SILVA, 2009). Os alimentos associados à transmissão da doença, na maioria das vezes, são processados industrialmente, têm vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração e são consumidos sem cocção prévia (*ready-to-eat*) (GARRIDO; GARCÍA-JALÓN, 2010). *L. monocytogenes* é considerada um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados. Percebe-se uma maior vulnerabilidade a este microrganismo, pessoas pertencentes aos grupos de riscos, tais como: gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, cirrose, carcinoma, entre outros (FDA, 2009).

A contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias alimentícias é um grave problema de segurança dos alimentos. A capacidade deste microrganismo suportar temperaturas de refrigeração e congelamento; e baixa atividade de água, tem sido um entrave para a cadeia produtiva. Em 2012 um lote de frangos contaminados com *Listeria* spp. foi devolvido ao Brasil pela Vigilância Veterinária das regiões de Primorie e de Sacalina, no Extremo Oriente da Rússia (GAZETA RUSSA, 2012). Situações como está pesam negativamente nas relações de exportação brasileira. Esta bactéria pode ser encontrada em diversas áreas de uma planta de

processamento, como pisos, ralos e equipamentos, e tem a habilidade de colonizar e se multiplicar em várias superfícies, incluindo aço inoxidável, borracha, vidro e polipropileno (VAID; LINTON; MORGAN, 2010). Estudos tem demonstrado a capacidade deste microrganismo formar biofilmes monoespécie (MONTGOMERY; BANERJEE, 2015; LÓPEZ, 2015) e multiespécie (GIAOURIS et al., 2015; KOSTAKI et al., 2012; TRAVIER et al., 2013), o que o torna um microrganismo importante a ser estudado.). Uma vez que a formação de biofilmes em equipamentos pode ocasionar sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido à contaminação e deterioração precoce dos alimentos e deficiência dos equipamentos (BREMER et al., 2006; GRAM et al., 2007).

2.2.2.3 *Campylobacter* spp.

Este gênero compreende bactérias caracterizadas por serem finos bastonetes Gram negativos, microaerófilos (requerem 3 a 5% de oxigênio e 2 a 10% de dióxido de carbono) e cuja temperatura ótima de crescimento varia entre 42°C e 46°C (FORSYTHE, 2013). Possuem um único flagelo que é responsável pelo seu movimento característico de saca-rolha ou vaivém. Quanto à morfologia, as células de *Campylobacter* podem ter formato de asa de gaivota (culturas jovens) ou morfologia cocóide (quando submetidas às condições adversas). Neste último caso, as células são denominadas viáveis, mas não-cultiváveis. Bactérias nesse estado mantêm sua capacidade de virulência, porém diminuem seu metabolismo até que as condições sejam novamente favoráveis (OLIVER, 2005). São quimiorganotróficos, não possuem a capacidade de fermentar ou oxidar açúcares e utilizam como fonte de energia aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo tricarboxílico. São inativos na maioria dos testes convencionais, sendo oxidase positivo e redutores de nitrato (SILVA et al, 1997).

Este gênero é composto por 32 espécies e 13 subespécies (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014), das quais as mais importantes no que se refere aos casos de gastroenterite humana são *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* (SILVA et al, 1997; SIMÕES, 2010; KAAKOUSH et al.,2015). A campilobacteriose, infecção alimentar causada por *Campylobacter*, é geralmente causada pelo *C. jejuni*. Este microrganismo é responsável pela diarreia dos viajantes e pseudoapendicite (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). É extremamente ubiqüitário, podendo ser encontrado tanto em alimentos como no intestino do homem e dos animais domésticos e de vida livre. O homem adquire a infecção por via fecal-oral através da ingestão de água e alimentos contaminados, ou pelo contato com animais e portadores (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Leite cru, fígado e carne de bovinos,

mariscos crus, vegetais, água contaminada, carne de frango insuficientemente cozida, leite pasteurizado contaminado e hambúrguer cru são os principais alimentos relacionados com a campilobacteriose (SILVA et al, 1997; FORSYTHE 2013). Esta é a zoonose intestinal de maior incidência nos Estados Unidos, acometendo mais pessoas que os surtos provocados por salmonelose (MARDER et al., 2017). Segundo o EFSA (2014) 214.000 casos desta infecção foram relatados na União Europeia no ano de 2013.

A carne e os miúdos de frango têm sido os principais veículos de *Campylobacter*. Esses animais albergam o microrganismo no intestino e durante o abate por práticas de higiene inadequadas, contaminam a carcaça e as vísceras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Embora o Brasil seja um importante produtor e exportador destes produtos, as legislações vigentes não trazem referências sobre o controle deste patógeno em produtos avícolas. Estudos nacionais demonstram a incidência de *Campylobacter* em carnes e miúdos de frango e no ambiente de processamento (PERDONCINI et al., 2015; DIAS, 2015; ALVES; OLIVEIRA, 2013; PERDONCINI, 2012; GONÇALVES et al., 2012), o que é preocupante, uma vez que não existem programas nacionais de controle para este patógeno. Internacionalmente, o Codex Alimentarius, juntamente com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) criaram diretrizes para controle de *Salmonella spp.* e *Campylobacter spp.* em carnes de frango (FAO/WHO, 2009). A Autoridade de Segurança Alimentar da Irlanda (FSAI) desenvolveu junto com o setor avícola do país um código de conduta voluntário para controlar contaminações por *Campylobacter* na avicultura irlandesa “*Recomendações para um Programa de Controle Prático para Campylobacter na Cadeia de Produção e Abate de Aves*” (FSAI, 2011) e o “*Controle de espécies de Campylobacter na cadeia alimentar*” (FSAI, 2002). Os programas de controle internacionais têm apresentado resultados positivos, pois o último relatório mostrou que os casos de campilobacteriose em humanos diminuíram ligeiramente pela primeira vez em cinco anos (EFSA, 2015).

Teh, Lee e Dykes (2016) analisaram a influência da temperatura, meio e superfície na formação de biofilme por *Campylobacter jejuni* resistente a antibióticos isolados de aves de capoeira. Todas as cepas foram fracas ou não produtoras de biofilme, sendo os meios menos ricos em nutrientes onde houve maior formação. Todas as cepas testadas formaram biofilme nas três superfícies abióticas usadas (plástico aço inoxidável e vidro). No entanto, a quantidade de biofilme formada foi considerada baixa, pois as células ligadas às superfícies abióticas pareciam ser uma única camada de células e não multicamadas complexas incorporadas na matriz extracelular.

Li et al. (2017) observaram que *Campylobacter jejuni* era capaz de formar mais biofilmes em vidro e poliestireno quando os meios de cultivo foram suplementados com caldo de frango e de carne. Notou-se também uma maior adesão quando esses suplementos foram utilizados previamente para revestir as camadas das superfícies a serem testadas. Esses resultados trazem informações muito importantes, uma vez que na indústria de alimentos esses substratos podem tanto servir de adesão como fonte de nutrientes para os microrganismos. A higienização e a utilização de boas práticas de fabricação são pontos essenciais para evitar a formação de biofilmes.

Estudar o comportamento deste microrganismo em biofilmes pode ajudar em estratégias de controle deste patógeno na indústria, em especial a indústria avícola.

2.2.2.4 *Escherichia coli*

É o mais comum e mais importante membro do gênero *Escherichia*. Este microrganismo está associado a uma variedade de doenças, incluindo gastroenterites, infecções urinárias, meningites e sepses. Como todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, são microrganismos anaeróbios facultativos, Gram negativos, reduzem nitrato a nitrito, são oxidase negativas e fermentam glicose. São móveis com flagelos peritríquios ou imóveis, e não formam esporos. Este microrganismo é membro da microbiota normal do intestino dos animais, incluindo o homem. São encontrados nas fezes de todos os indivíduos saudáveis, sendo esta característica de extrema importância para a verificação de contaminação fecal na água e nos alimentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Embora esse microrganismo possa ser um patógeno oportunista, quando ocorre perfusão intestinal e a bactéria entra no peritônio, a maioria das cepas de *E. coli* que causam doenças gastrointestinais e extraintestinais adquiriu fatores de virulência específicos codificados nos plasmídeos ou no DNA de bacteriófagos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Segundo Forsythe (2013) as cepas de *E. coli* causadoras de gastroenterite são divididas em 6 grupos: *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente adesiva (DAEC). *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é a principal causa de diarreia do viajante bacteriana e uma das principais causas de doenças diarreicas em países subdesenvolvidos, especialmente entre as crianças (FORSYTHE, 2013). Estima-se que a mesma seja responsável por 280-400 milhões de episódios de diarreia por ano em crianças menores de 5 anos de idade, resultando em 300.000 a 500.000 mortes (OMS, 2015).

No Brasil, a incidência de *E. coli* em carne de frango tem sido amplamente estudada (Penteado, 2011; Almeida, 2011; Silva et al., 2012; Carli et al., 2015; Oliveira, 2015).

A presença de *E. coli* na carne de frango pode estar relacionada à contaminação deste produto no ambiente de processamento, sendo os biofilmes uma possível fonte de contaminação.

Pavlickova et al. (2017) avaliaram a resistência à antibióticos, fatores de virulência e formação de biofilmes em 105 cepas de *Escherichia coli*. 70 cepas foram isoladas de coxas e da pele de carcaças de frangos e 35 isoladas de fezes de faisão e pato selvagem. Os resultados demonstraram que os isolados de frango eram mais resistentes (64%) aos antibióticos do que os isolados de animais selvagens (60%) e possuíam mais fatores de virulência (66%) em comparação ao grupo de outra origem (37%). Com relação à formação de biofilmes 71% das cepas isoladas de frango apresentaram capacidade de formar biofilme contra 60% das cepas isoladas de animais selvagens. Este trabalho ratifica a necessidade de investigação da formação de biofilmes de *E. coli* em ambientes de processamento, uma vez que as bactérias encontradas na matriz alimentar, neste caso o frango, possuiu maior resistência a antibióticos e mais fatores de virulência que cepas ambientais.

Os dados obtidos com o trabalho acima revelam que a presença deste patógeno pode ser um risco para a saúde do consumidor em se tratamento da contaminação cruzada, entre equipamentos aderidos por estes microrganismos e alimentos prontos para o consumo durante sua produção na indústria de alimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Universidade de Passo Fundo, nos laboratórios de Fermentações e Aulas Práticas do Curso de Engenharia de Alimentos, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada do PPGBioexperimentação e no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário.

3.1 AMOSTRAS PARA FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONO E MULTIESPÉCIES

Os microrganismos selecionados, bem como suas origens e fontes, estão dispostos no Quadro 2. *Campylobacter jejuni* estava estocado em caldo Bolton com 20% de glicerol e os demais em Caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol. Os microrganismos foram reativados e a suas purezas verificadas por isolamento em meio seletivo e testes bioquímicos específicos.

Quadro 2 - Microrganismos selecionados para a formação de biofilmes mono e multiespécies.

Microrganismo	Características
<i>Salmonella Enteritidis</i>	<p>Origem: Proveniente de surtos de infecção alimentar SE 24 - coprocultura de paciente envolvido em surto de DTA.</p> <p>Fonte: (OLIVEIRA et al., 2015)</p>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<p>Origem: Superfícies de abatedouro avícola L4 - isolada de superfície de esteiras de transporte de poliuretano após tratamento com água quente.</p> <p>Fonte: (RODRIGUES et al., 2013)</p>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<p>Origem: Provenientes de abatedouro avícola CJ134 - isolada de carcaça após pré-resfriamento após imersão.</p> <p>Fonte: (PERDONCINI, 2015)</p>
<i>Escherichia coli</i>	<p>Origem: Superfícies de abatedouro avícola C7 - isolada de superfície de esteiras de transporte de poliuretano após tratamento com água quente.</p> <p>Fonte: (RODRIGUES, 2010)</p>

Fonte: O autor (2015)

3.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONOESPÉCIE E MULTIESPÉCIES

Para a formação dos biofilmes multiespécie foram utilizados todos os microrganismos citados acima e os tempos de incubação foram 4, 12 e 24 horas. Após a formação dos biofilmes analisou-se a presença de moléculas sinalizadoras, tratamentos de higienização, quantificação do EPS e quantificação da formação de biofilmes. Para os biofilmes monoespécies, se utilizou *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, com o tempo de incubação de 24 horas. As análises posteriores foram a presença de moléculas sinalizadoras, tratamentos de higienização e quantificação da formação de biofilmes.

3.2.1 Preparação dos corpos de prova

Foram utilizados como corpos de prova cupons de aço inoxidável AISI 316, de poliuretano e de polietileno, confeccionados nas dimensões de 1 cm x 1 cm e 0,1 cm (espessura), com área de 1 cm² (Figura 5). Os materiais utilizados para a preparação dos cupons foram obtidos do ambiente de processamento de cortes de aves. Os cupons antes de cada ensaio foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- Limpeza manual com auxílio de esponja, água e detergente neutro líquido;
- Enxágue com água destilada;
- Imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente;
- Enxágue com água destilada;
- Esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Figura 5 - Corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano provenientes de abatedouros avícolas.



Fonte: Oliveira (2016).

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

3.2.2 Formação de biofilmes

Os corpos de prova foram imersos em microplacas de 12 poços contendo 2,75 mL de Caldo Triptona de Soja sem glicose (TSB w/o Dextrose). Para biofilmes monoespécies foram

acrescidas aproximadamente 10^3 UFC/mL de culturas individuais de cada microrganismo e, para biofilmes multiespécies, foram inoculados $2,5 \times 10^2$ UFC/mL de cada uma das quatro bactérias, obtendo-se aproximadamente 10^3 UFC/mL de culturas mistas. A população inoculada foi verificada, em todos os experimentos, por semeadura em placas contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) a partir de diluições seriadas decimais. As microplacas foram incubadas a $42 \pm 1^\circ\text{C}$, $36 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $9 \pm 1^\circ\text{C}$ e $3 \pm 1^\circ\text{C}$, simulando as temperaturas do ambiente de processamento e as temperaturas ótimas dos microrganismos (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

3.3 ANÁLISES REALIZADAS APÓS A FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

Interrompeu-se a formação dos biofilmes nos tempos de 4, 12 e 24 horas após a incubação, simulando os períodos de higiene pré-operacional e operacional em abatedouros de aves. Em cada um destes tempos coletou-se as células planctônicas e sésseis para purificação das amostras e posterior análises.

3.3.1 Coleta das células planctônicas

Em cada tempo pré-determinado, coletou-se os 3 mL contidos nos poços das microplacas e centrifugou-se a $6.600 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de celulose com poros de $0.22 \mu\text{m}$ (VIANA ,2006; TAKAGI, 2011).

3.3.2 Tratamento dos cupons após as incubações

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%, por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida uma parte foi destinada à avaliação dos tratamentos de higienização e uma parte para a coleta das células sésseis e quantificação da formação de biofilmes.

3.3.2.1 Avaliação dos procedimentos de sanitização

Após a etapa anterior, avaliou-se a eficácia dos tratamentos de higienização nos cupons livres de células planctônicas. Os cupons foram inoculados em recipientes com 5 mL de água

estéril aquecida aquecida a 85°C, por 3 minutos, e em solução de hipoclorito de sódio a 2% (Divosan TC 86, *Diversey*®) por 10 minutos, conforme recomendações do fabricante. Após a aplicação dos tratamentos, os cupons foram imersos em 5 mL de Água peptonada 0,1% com neutralizantes (*Tween* 80, lecitina de soja e tiosulfato de sódio) durante 1 minuto, a fim de cessar o efeito dos sanitizantes. Em seguida realizou-se a etapa de desadesão e coleta das células sésseis pós tratamento.

3.3.2.2 *Desadesão e coleta das células sésseis*

Os cupons controle, que não passaram por tratamentos de higienização, e os cupons aos quais foram aplicados os tratamentos, foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água peptonada 0,1% e sonificados por 10 minutos em banho de ultrassom para desadesão de células sésseis (JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997; WEBBER, 2015). Após a sonicação verificou-se nos tubos a presença de moléculas de *autoindutoras* e quantificação da produção de EPS.

3.3.3 **Avaliação das moléculas autoindutoras**

Para a avaliação da presença de moléculas autoindutoras, foi realizada a purificação das moléculas presentes nas amostras. As amostras coletadas foram: células planctônicas, cupons controle e após os tratamentos de higienização.

3.3.3.1 *Purificação das moléculas autoindutoras*

As amostras foram centrifugadas 6.600 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de celulose com poros de 0.22 µm. O sobrenadante livre de células dos três tipos de amostra (planctônicas, sésseis tratamentos e controle) foi submetido à extração orgânica em dois volumes de 50 mL de acetato de etila com 0,01% de ácido acético. A fase orgânica foi concentrada em rota-vapor até total evaporação do solvente. O resíduo foi solubilizado em 1 mL de acetato de etila, e este extrato de trabalho foi armazenado a -20°C para análises posteriores (VIANA, 2006; TAKAGI, 2011).

3.3.3.2 Avaliação da produção de moléculas autoindutoras 1 pela cepa biossensora *Chromobacterium violaceum*

A cepa *C. violaceum* CV026 foi cultivada por 18 h a 30°C em 10 mL de meio Luria Bertani (LB) suplementado com kanamicina 50 µg/mL. Após o crescimento, 100 µL da cultura foi adicionado a 3 mL de *soft-top* ágar (caldo LB acrescido de 0,7% de ágar), vertido como sobrecamada em placa contendo ágar LB com kanamicina 50 µg/mL. Após a geleificação do *soft-top* ágar, foram realizados orifícios de cerca de 3mm de diâmetro com o auxílio de pipeta Pasteur estéril, onde adicionaram-se 10 µL de cada um dos extratos purificados. Como controle positivo 5 µL de solução 1 µM de AHL sintética foi adicionado a um dos orifícios e como controle negativo foi inoculado 5 µL de caldo LB estéril. As placas foram mantidas a 30°C por 18 horas. Detectou-se a atividade de AHL pela presença de pigmentação violeta ao redor dos orifícios (metodologia adaptada de MCCLEAN et al., 1997 e TAKAGI, 2011).

3.3.4 Quantificação da produção de EPS

Para a quantificação de EPS utilizou-se o protocolo adaptado de Jin et al. (2013). Após a etapa de sonicação para desadesão dos biofilmes (JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997; WEBBER, 2015), transferiu-se os 5mL de cada tubo para tubos de centrifuga de 50 mL, aquecidos por 15 minutos a 100°C. Após esfriar a temperatura ambiente por 20 minutos, foi adicionado 40 µL de pronase E e incubou-se por 1 h a 37° C. A cada um dos tubos adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético 85% e a mistura foi resfriada em água a 5°C durante 30 minutos. Após esta etapa, centrifugou-se a amostra a 17.000 g durante 20 min, e ao sobrenadante contendo EPS foi adicionado 5mL etanol. A mistura foi mantida a -20°C durante 1 h e em seguida centrifugada a 17.000 g durante 20 minutos novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com dois volumes de 5 mL de etanol a 95% e centrifugado a 17.000 g durante 20 min. O precipitado final foi dissolvido em 1 mL de água destilada estéril e armazenado a -20°C. O total de EPS, expressos em µg/mL, foi estimado em cada amostra pelo método fenol-sulfúrico. Como padrão utilizou-se uma curva de solução de glicose em diferentes concentrações para relacionar com os valores encontrados nas amostras (DUBOIS et al., 1956).

3.3.5 Quantificação da formação de biofilmes monoespécie e multiespécie

Após a desadesão das células sésseis (JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997 WEBBER, 2015), realizaram-se diluições seriadas decimais e o plaqueamento foi pelo método de contagem em gota (*drop-plate*), que consiste na inoculação de cinco gotas de 10µL de cada diluição e leitura após 24 horas de incubação a 36°C (MILES & MISRA, 1938). Nos biofilmes monoespécies, o plaqueamento foi realizado no meio de cultura PCA. Nos biofilmes multiespécie, as diluições foram plaqueadas em meios específicos: *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* – mCCDA suplementado para contagem de *C. jejuni*; *Eosin Methylene Blue Agar* – EMB para contagem de *E. coli*; *Xylose Lysine Desoxycholate Agar* – XLD para contagem de *S. Enteritidis*; e Ágar Listeria Palcam suplementado, para contagem de *L. monocytogenes*. O mCCDA, foi incubado a 42°C em microaerofilia, durante 56 horas de incubação, enquanto os demais foram incubados a 36°C em aerobiose, durante 24 horas. Após o tempo de incubação dos meios, realizou-se a contagem e aplicou-se a seguinte fórmula aos resultados:

$$UFC.cm^{-2}=(VD/VA).M.(D/A) \quad (1)$$

sendo:

VD: volume do diluente utilizado (5 mL);

VA: volume da alíquota utilizada na inoculação (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 (cm²).

Os valores foram expressos em log₁₀.UFC.cm⁻² (CARELI, 2005; GIBSON, 1999, ISO 18593:2012).

3.3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos na quantificação dos biofilmes e do EPS foram analisados por meio da análise de variância e a comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade (p <0.05). A correlação de Pearson foi utilizada para relacionar a produção de EPS e a formação de biofilmes multiespécies. Realizou-se a análise estatística utilizando o software SPSS 23 (IBM, 2015).

4 RESULTADOS

4.1 FORMAÇÃO DOS BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES

4.1.1 Média da formação dos biofilmes monoespécies

Nos biofilmes monoespécies a formação total nas 24 horas de incubação foi de 16,885 \log_{10} .UFC.cm⁻², determinada pela soma dos microrganismos avaliados. Com base na Tabela 1, pode-se observar que os microrganismos *S. Enteritidis* (SE24) e *E. coli* (C7) não diferiram entre si quanto à média de formação, obtendo valores superiores ao microrganismo *L. monocytogenes* (L4).

Tabela 1 - Formação de biofilmes monoespécie por *S. Enteritidis* (SE24), *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7) em todas as superfícies e temperaturas, após 24 horas de incubação. Média das triplicatas.

CEPA	ORIGEM	MÉDIA DE FORMAÇÃO*
L4	Superfície de indústria avícola	4,417 ^a
C7	Superfície de indústria avícola	6,135 ^b
SE24	DTA	6,332 ^b
TOTAL		16,885

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

4.1.2 Média da formação dos biofilmes multiespécies

A formação dos biofilmes multiespécies em todas as condições ambientais testadas, incluindo superfícies, temperaturas e tempos de incubação, foi 7,745 \log_{10} .UFC.cm⁻². Observou-se diferença estatística em todos os microrganismos testados (Tabela 2). O microrganismo *S. Enteritidis* (SE24) destacou-se como a cepa mais formadora de biofilmes. Não observou-se crescimento da cepa CJ134 em nenhuma das condições avaliadas.

Tabela 2 - Formação de biofilmes multiespécies por *S. Enteritidis* (SE24), *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7) e *C. jejuni* (CJ134) em todas as superfícies, tempos e condições ambientais testadas. Média das triplicatas.

CEPA	ORIGEM	MÉDIA DE FORMAÇÃO*
L4	Superfície de indústria avícola	1,413 ^a
C7	Superfície de indústria avícola	2,826 ^b
SE24	DTA	3,505 ^c
CJ134	Carcaça de frango após resfriamento	0,000 ^{d#}
TOTAL		7,745

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). * Resultados em \log_{10} .UFC.cm⁻². # Não foi detectado nos ensaios de quantificação.

4.2 INFLUÊNCIA DAS TEMPERATURAS NOS BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES

4.2.1 Influência das temperaturas nos biofilmes monoespécies

A influência das temperaturas nos biofilmes monoespécies pode ser visualizada na Tabela 3. Nota-se que não foi detectada a adesão de *Listeria monocytogenes* às superfícies na temperatura de 3°C. A formação dos biofilmes pelas cepas *S. Enteritidis* (SE24) e *E. coli* (C7) não diferiu estatisticamente, sendo capazes de formar biofilmes em todas as temperaturas testadas, incluindo as temperaturas de refrigeração. Observou-se que as maiores formações ocorreram em temperaturas iguais ou superiores a 25°C, com diferença estatística.

Tabela 3 - Formação de biofilmes monoespécie pelas cepas de *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7) sob diferentes temperaturas, em todas as superfícies testadas, após 24 horas de incubação. Médias das triplicatas.

CEPAS	TEMPERATURAS*				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
L4	0,000 [#] aA	1,434 aA	7,458 bA	6,700 bcA	6,492 bcA
C7	1,634 aAB	3,912 bB	9,349 cB	8,172 cB	7,610 cA
SE24	2,996 aB	3,971 aB	8,993 bB	7,979 bB	7,723 bA
TOTAL	4,630	9,317	25,800	22,851	21,825

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). *Resultados em \log_{10} .UFC.cm⁻². # Não foi detectada nesta condição de crescimento.

4.2.2 Influência das temperaturas nos biofilmes multiespécies

Nos biofilmes multiespécies, os microrganismos desenvolveram-se semelhante nas temperaturas avaliadas. *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7) multiplicaram-se estatisticamente iguais em 9°C e 36°C. A 25°C e 42°C não houve diferença entre a formação de biofilmes das cepas *S. Enteritidis* (SE24) e *E. coli* (C7). *L. monocytogenes* (L4) não foi detectada a 3°C, e a 36°C ocorreu a maior produção de biofilmes (Tabela 4). Não foi possível quantificar o microrganismo *C. jejuni* (CJ134).

Tabela 4 - Formação de biofilmes multiespécies pelas cepas de *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7) e *S. Enteritidis* (SE24) e *C. jejuni* (CJ134), em todas as superfícies e tempos testados, nas diferentes temperaturas de incubação. Médias das triplicatas.

TEMPERATURAS*					
CEPAS	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
L4	0,000 ^{aA}	0,274 ^{aA}	1,881 ^{bA}	3,193 ^{cA}	1,717 ^{bA}
C7	0,529 ^{aB}	0,479 ^{aA}	3,568 ^{bB}	4,266 ^{bcA}	5,291 ^{cB}
SE24	1,194 ^{aC}	1,182 ^{aB}	4,520 ^{bB}	5,749 ^{cB}	4,882 ^{bcB}
CJ134	0,000 ^{aA#}	0,000 ^{aA#}	0,000 ^{aC#}	0,000 ^{aC#}	0,000 ^{Ac#}
TOTAL	1,723	1,935	9,969	13,208	11,890

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). * Resultados em \log_{10} .UFC.cm⁻². # Não foi detectado nos ensaios de quantificação.

4.3 INFLUÊNCIA DAS SUPERFÍCIES NOS BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES

4.3.1 Influência das superfícies nos biofilmes monoespécies

A formação total dos biofilmes, quando os microrganismos foram cultivados individualmente, em monoespécie, não diferiu entre as superfícies utilizadas (Tabela 5). Avaliadas individualmente, as três cepas utilizadas neste trabalho se desenvolveram de forma semelhante nas diferentes superfícies, exceto *L. monocytogenes* (L4) cujo crescimento foi inferior no aço inoxidável.

Tabela 5 - Formação de biofilmes monoespécie por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável, sob todas as condições ambientais testadas, após 24 horas de incubação. Médias das triplicatas.

SUPERFÍCIES*			
CEPAS	Polietileno	Poliuretano	Aço Inoxidável
L4	5,459 ^{aA}	4,043 ^{aA}	3,748 ^{aA}
C7	6,128 ^{aA}	6,145 ^{aA}	6,133 ^{aB}
SE24	7,540 ^{aA}	5,178 ^{aA}	6,280 ^{aB}
TOTAL[#]	19,126 a	15,366 a	16,161 a

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). * Resultados em \log_{10} .UFC.cm⁻². #A formação total não foi avaliada em relação à formação individual.

4.3.2 Influência das superfícies nos biofilmes multiespécies

Observou-se formação de biofilmes multiespécies em todas as superfícies testadas. O polietileno e o poliuretano foram as superfícies que proporcionaram maior adesão, como pode ser observado na Tabela 6. O microrganismo *L. monocytogenes* (L4) aderiu sem diferença

estatística nestas superfícies. O polietileno foi a superfície de maior adesão para a cepa *E. coli* (C7). Com relação à *S. Enteritidis* (SE24), as taxas de adesão foram iguais em todas as superfícies. Não foi possível quantificar o *C. jejuni* (CJ134).

Tabela 6 - Formação de biofilmes multiespécies por *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *S. Enteritidis* (SE24) e *C. jejuni* (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável, sob todas as condições ambientais testadas. Médias das triplicatas.

CEPAS	SUPERFÍCIES*		
	Polietileno	Poliuretano	Aço Inoxidável
L4	2,134 ^{aA}	1,502 ^{aAB}	0,602 ^{bA}
C7	4,220 ^{aB}	2,527 ^{bB}	1,733 ^{bB}
SE24	3,980 ^{aB}	3,476 ^{aC}	3,060 ^{aC}
CJ134	0,000 ^{aC#}	0,000 ^{aD#}	0,000 ^{aA#}
TOTAL	10,334 a	7,506 ab	5,394 b

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). * Resultados em \log_{10} .UFC.cm⁻². # Não foi detectado nos ensaios de quantificação.

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONOESPÉCIES E MULTIESPÉCIES NO TEMPO DE 24 HORAS DE INCUBAÇÃO

4.4.1 Comparação entre as médias de formação dos biofilmes monoespécies e multiespécies

As médias de formação dos biofilmes monoespécies e multiespécies com 24 horas de incubação diferiram significativamente. Obteve-se maior formação de biofilmes na soma dos biofilmes monoespécies (Tabela 7).

Tabela 7 - Formação de biofilmes monoespécie total e multiespécie nas superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável em 24 horas de incubação, sob todas as temperaturas testadas. Média das triplicatas.

	MONOESPÉCIE	MULTIESPÉCIE
MÉDIA DE FORMAÇÃO*	16,885 a	10,975 b

Legenda: as médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de tukey ($p>0,05$). * Resultados em \log_{10} .ufc.cm⁻².

4.4.2 Influência das superfícies nos biofilmes monoespécies e multiespécies

De acordo com a Tabela 8 não houve diferença entre as formações de biofilmes monoespécie e multiespécie no polietileno e poliuretano, no aço inoxidável observou-se maior adesão dos biofilmes monoespécie. A formação de biofilmes monoespécies foi semelhante em

todas as superfícies utilizadas, enquanto que nos biofilmes multiespécies o polietileno e o poliuretano foram as superfícies de maior adesão.

Tabela 8 - Formação de biofilmes monoespécie total e multiespécie nas superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável em 24 horas de incubação, sob todas as condições testadas. Médias das triplicatas.

SUPERFÍCIES*			
	Polietileno	Poliuretano	Aço Inoxidável
Soma dos Monoespécies	19,126 aA	15,366 aA	16,161 aA
Multiespécie	15,331 aA	9,527 abA	8,066 bB

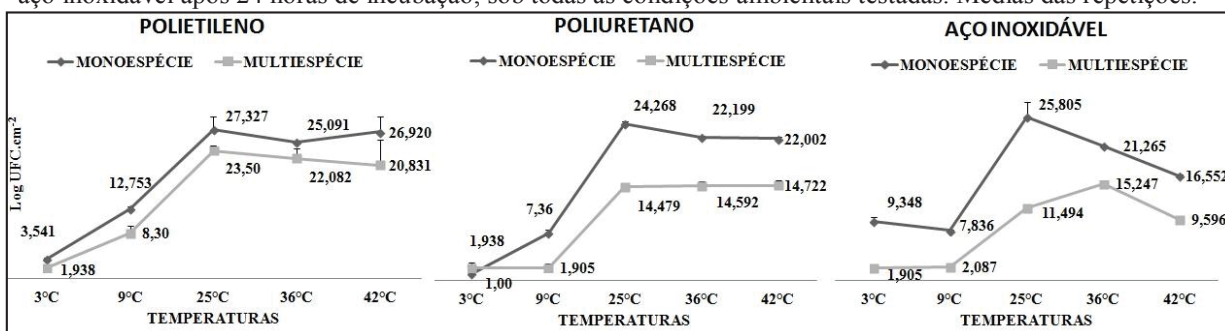
Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). * Resultados em \log_{10} .UFC.cm⁻².

4.4.3 Influência das superfícies e das temperaturas nos biofilmes monoespécies e multiespécies

As Figuras 6 e 7 comparam as produções totais e individuais nos biofilmes mono e multiespécies.

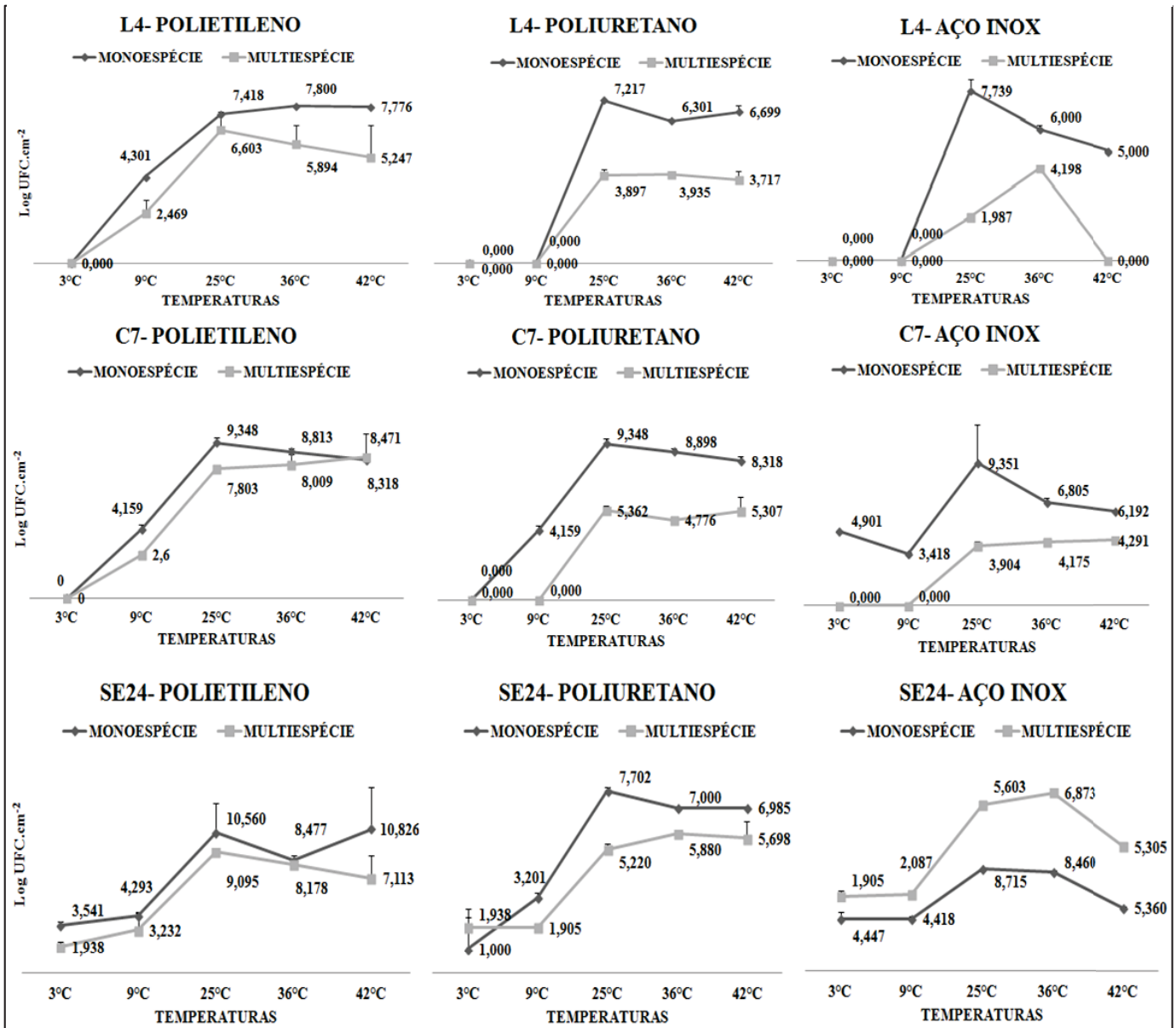
Na Figura 6 pode-se observar que a adesão na superfície de polietileno foi semelhante entre os biofilmes monoespécies e multiespécies. Nas demais superfícies houve maior formação quando em monoespécie.

Figura 6 - Comparação entre a formação de biofilmes monoespécie e multiespécie em polietileno, poliuretano e aço inoxidável após 24 horas de incubação, sob todas as condições ambientais testadas. Médias das repetições.



Com relação à Figura 7 pode-se acompanhar a formação de biofilmes de cada microrganismo em todas as temperaturas no tempo de 24 horas. Os biofilmes formados pelos microrganismos *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7), em monoespécie, foram sempre superiores aos multiespécies em temperaturas mais altas, não havendo diferença nas temperaturas de refrigeração. *S. Enteritidis* (SE24) teve crescimento semelhante tanto em comunidades simples como mistas.

Figura 7 - Formação de biofilmes monoespécie e multiespécie pelos microrganismos *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7) e *S. Enteritidis* (SE24) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável após 24 horas de incubação, sob todas as condições ambientais testadas.



4.5 QUANTIFICAÇÃO DE EPS NOS BIOFILMES MULTIESPÉCIES

4.5.1 Quantificação de EPS nos biofilmes multiespécies antes da higienização

Os resultados da quantificação do EPS nos biofilmes multiespécies antes da higienização podem ser observados nas Tabelas 9, 10 e 11.

O polietileno foi a superfície que possibilitou maior produção de EPS, principalmente na temperatura de 3°C, após 4 e 12 horas, e de 9°C após 24 horas de incubação. O poliuretano e o aço inoxidável foram iguais estatisticamente na maioria das

condições. No aço inoxidável destaca-se a temperatura de 25°C após 4 horas de incubação (139,898 µg/mL).

Tabela 9 - Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 04 horas de incubação. Médias das triplicatas.

SUPERFÍCIES	TEMPERATURAS				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
PE	349,974 aA	14,761 bA	9,265 bA	13,625 bA	23,189 bA
PU	31,471 aB	30,481 aB	39,349 bA	36,051 abB	39,752 bB
INOX	42,280 aB	36,271 aB	139,898 bB	33,376 aB	32,973 aC

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

PE: Polietileno, PU: Poliuretano, INOX: Aço Inoxidável

Tabela 10 - Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 12 horas de incubação. Médias das triplicatas.

SUPERFÍCIES	TEMPERATURAS				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
PE	136,784 aA	45,578 bA	43,526 bA	55,106 cA	32,716 dA
PU	33,742 aB	43,013 bAB	28,649 aB	29,089 aB	14,541 cB
INOX	31,654 aB	40,705 aB	57,158 bC	31,727 aB	37,590 aC

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

PE: Polietileno, PU: Poliuretano, INOX: Aço Inoxidável

Tabela 11 - Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 24 horas de incubação. Médias das triplicatas.

SUPERFÍCIES	TEMPERATURAS				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
PE	60,089 aA	99,004 abA	49,316 aA	30,958 aA	63,717 abA
PU	33,706 aB	27,000 bB	32,826 aB	50,195 cB	36,564 aB
INOX	34,146 aB	36,857 aB	31,361 acB	39,935 aAB	11,134 bC

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

PE: Polietileno, PU: Poliuretano, INOX: Aço Inoxidável.

4.5.2 Comparação entre a quantificação de EPS nos biofilmes multiespécies antes e após a sanitização dos cupons

Após a higienização dos cupons houve diminuição na quantidade de EPS (Tabela 12), com diferença entre os tratamentos sanitizantes, apresentando menos EPS após o tratamento com água quente.

Tabela 12 - Comparação entre a quantificação de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies antes e após as higienizações. Sob todas as condições de tempo, temperatura e superfícies testadas.

	TRATAMENTOS		
	Antes do Tratamento	Hipoclorito de Sódio	Água quente 85°C
TOTAL	47,600±55,227 a	33,861±9,147 b	30,738±10,764 c

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

4.6 RELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE EPS ANTES DO TRATAMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIE

Conforme a Tabela 13, podemos observar que os coeficientes de correlação linear de Pearson entre as quantificações de EPS e biofilmes multiespécies com 4 e 12 horas foi negativa, demonstrando que, à medida que o número de UFC nos biofilmes aumentou, a quantidade de EPS foi diminuindo. O R^2 corrobora esta relação fraca, indicando que cerca de 95% da variabilidade do EPS deve ser explicada por outros fatores que não a formação de biofilmes. Com 24 horas a correlação foi muito próxima de zero ($r=0,0840$), demonstrando que não existe relação entre as variáveis.

Tabela 13 - Comparação entre a quantificação de EPS e a formação de biofilmes multiespécies sob todas as condições de tempo, temperatura e superfícies testadas.

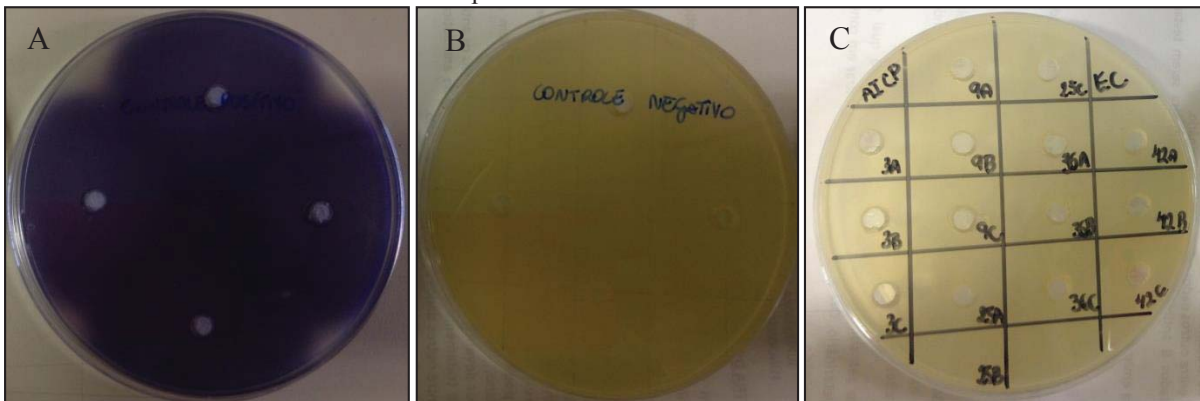
	TEMPO	r^*	R^{2**}
FORMAÇÃO DE BIOFILMES	4 horas	- 0,2360	5,57%
	12 horas	- 0,2300	5,29%
	24 horas	0,0840	0,71%

Legenda: r^* = coeficiente de correlação de Pearson; R^{2**} = coeficiente de determinação.

4.7 RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS AUTOINDUTORAS 1 PELA CEPA BIOSSENSORA *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

Neste trabalho não foi possível detectar a presença de moléculas biossensoras nos biofilmes monoespécie e multiespécie, em nenhuma das condições propostas. No entanto, pode-se constatar que o método empregado foi capaz de detectar as moléculas nos controles positivos utilizados, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Resultado das incubações do controle positivo (A), controle negativo (B) e amostras (C) após 24 horas de contato com a cepa biossensora *Chromobacterium violaceum*.



5 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se a produção de biofilmes monoespécie e multiespécie pelos principais microrganismos encontrados na indústria avícola, *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *S. Enteritidis* (SE24) e *Campylobacter jejuni* (CJ134). Destes, apenas o *Campylobacter jejuni* (CJ134) foi avaliado somente quanto à formação multiespécie.

Observando-se a média de formação destes microrganismos nota-se que houve crescimento dos mesmos tanto nos biofilmes monoespécies quanto nos biofilmes multiespécies. Nos biofilmes monoespécies a média de formação total após 24 horas de incubação foi de $16,885 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ e, nos biofilmes multiespécies, em todas as condições ambientais testadas, incluindo superfícies, temperaturas e tempos de incubação foi $7,745 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Para Ronner e Wong (1993), considera-se biofilme um número mínimo de 10^3 UFC ($3 \log_{10} \text{UFC}$) aderidas por cm^2 . Neste trabalho obtivemos, nas médias totais, valores substancialmente superiores ao mínimo considerado pelos autores.

S. Enteritidis (SE24) foi a bactéria mais formadora de biofilme, tanto em condição monoespécie quanto em condição multiespécie. Oliveira (2016) avaliou esta mesma cepa, a SE 24, quanto à formação de biofilme monoespécie nas mesmas condições de tempo, temperatura e superfícies utilizadas neste trabalho. Obteve-se resultado semelhante, com maior formação de biofilme quando comparada com a outra estirpe e crescimento em temperaturas de refrigeração.

A produção de biofilmes é um dos mecanismos mais importantes que melhoram a capacidade dos microrganismos de resistir a fatores adversos e colonizar o meio ambiente (LIRA et al., 2016). Segundo Forsythe (2013) a temperatura ótima de multiplicação da *Salmonella* está em torno de 38°C e a mínima 5°C . No entanto, nesta pesquisa houve formação de biofilme a 3°C (abaixo da temperatura mínima de crescimento estabelecida na literatura) e a 9°C , como observado em Webber (2016) e Oliveira (2016). Silva (2014) constatou em seu trabalho que a SE24 possui os genes *spiA* e *agfA* em seu perfil genético, que estão envolvidos na formação de biofilmes e também na virulência da *S. Enteritidis* (DONG et al., 2011).

As temperaturas de refrigeração utilizadas neste experimento mimetizam as temperaturas preconizadas em abatedouros avícolas: $3 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C) e $9 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura da sala de cortes, máximo de 12°C) (BRASIL, 1998). As temperaturas maiores simularam a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), o crescimento ótimo para mesófilos ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) e a temperatura de enriquecimento seletivo para *Salmonella* e *C. jejuni* ($42^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$).

A presença de biofilmes nas diversas superfícies sob temperaturas de refrigeração revela um problema para a indústria de alimentos, pois microrganismos sabidamente mesófilos, como *Salmonella* e *Escherichia* (FORSYTHE, 2013; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014) conseguiram, através do biofilme, garantir sua sobrevivência em baixas temperaturas. Zhou et al. (2014) estudaram os efeitos do pH, da temperatura e da salinidade sobre o EPS de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, e observaram uma maior formação de biofilmes em temperaturas inferiores à temperatura ótima de crescimento da bactéria. Segundo os autores o biofilme pode ser formado a baixa temperatura, pois o microrganismo “entendeu” que a aglomeração em colônias seria a melhor prevenção contra o estresse ambiental. Na indústria avícola isso significa possibilidade de crescimento durante o resfriamento de carcaças, como a água do *chiller* nos tanques de aço inoxidável.

O *Campylobacter jejuni* (CJ134) foi o único microrganismo que não formou biofilme em nenhuma das condições de tempo, superfície e temperaturas testados.

Vários estudos tem demonstrado a capacidade deste microrganismo formar biofilmes em diversas temperaturas e tempos (KALMOKOFF, 2006; ICA et al., 2012; NGUYEN; TURNER; DYKES, 2010). O fato de não conseguirmos quantificá-lo neste trabalho pode ser devido ao microrganismo ser fastidioso e levar desvantagem em comparação às outras bactérias menos exigentes. Acredita-se que, devido às condições adversas, as células adquiriram a forma cocoide, sendo denominadas “viáveis, mas não cultiváveis” (VBNC). Por isso, não pode ser excluída a capacidade do *C. jejuni* conseguir formar biofilme em interação com os demais microrganismos. Existe a possibilidade do mesmo ter adotado um estado VBNC, que impede sua quantificação por técnicas tradicionais. GEHLEN (2016) observou a formação de biofilmes monoespécies da cepa *C. jejuni* (CJ134) em placas poliestireno nas mesmas temperaturas avaliadas nesta pesquisa. O microrganismo foi classificado como fracamente formador de biofilmes, independente das temperaturas, caldos e ambientes com e sem microaerofilia testados.

L. monocytogenes é um patógeno psicrófilo e está normalmente envolvido em surtos ocasionados pelo consumo de alimentos refrigerados (GARRIDO; GARCÍA-JALÓN, 2010). No entanto, houve dificuldade de formação de biofilme por este patógeno em temperatura de refrigeração. Moltz e Martin (2005) avaliaram a influência da temperatura (4°C, 20°C e 37°C) na formação de biofilmes por *L. monocytogenes* estirpe LCDC. Foi demonstrada a capacidade de adesão ao aço inoxidável em todas as temperaturas testadas. Contudo, notou-se que, após 20 h de incubação a 20°C ou 37°C, a densidade celular foi de aproximadamente 10^6 e, somente após 4 dias de incubação a 4°C, a densidade celular foi de 10^5 UFC por cupom. Isto demonstra

que, apesar de ter ocorrido formação de biofilme a baixa temperatura, necessitou maior tempo de incubação para que a quantificação desse microrganismo fosse semelhante às temperaturas mais elevadas. Este fato pode estar relacionado à fase de adaptação do microrganismo à temperaturas mais baixas, necessitando de um tempo maior na fase lag antes de produzir biofilmes. Zhao, Doyle e Zhao (2004) observaram também que, quando associados a outros microrganismos em exclusão competitiva, em biofilmes em aço inoxidável, *L. monocytogenes* leva desvantagem em temperaturas de refrigeração.

Em outros trabalhos realizados com as mesmas cepas de *Listeria monocytogenes* (L4), *S. Enteritidis* (SE24), *E. coli* (C7) e *C. jejuni* (CJ134) foi observada a capacidade destes microrganismos formarem biofilme monoespécie em poliestireno a 3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C (GEHLEN et al., 2013; DIEDRICH et al., 2013, GEHLEN, 2016).

Schaeffer et al. (2016) afirma que a composição do biofilme varia com a estirpe e com as condições ambientais. Até o presente momento não havia sido estudada a interação entre os quatro microrganismos que utilizamos. A comunidade bacteriana em biofilme é uma estrutura heterogênea que possui zonas mais ou menos habitadas pelas bactérias e com diferentes densidades de matriz. Assim, existem áreas com maior ou menor disponibilidade de nutrientes. Este fator pode ter favorecido um desenvolvimento mais expressivo de certas bactérias em relação às outras (CERCA; JEFFERSON, 2012).

Em nosso trabalho todas as superfícies foram passíveis de adesão bacteriana. Na formação de biofilmes monoespécies não houve diferença entre a adesão nas distintas superfícies e os microrganismos aderiram de forma semelhante os corpos de prova (Tabela 5). Nos biofilmes multiespécies os polímeros foram as superfícies que proporcionaram maior adesão (Tabela 6). A SE24 aderiu sem diferença estatística em todas as superfícies estudadas, e as demais bactérias diferiram quanto à adesão em pelo menos uma das superfícies.

Diversos trabalhos tem demonstrado a adesão de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em condições similares às executadas nesta pesquisa, reforçando a capacidade destes microrganismos patogênicos aderirem em superfícies de grande importância para a indústria de alimentos.

As propriedades do material (topografia da superfície, rugosidade, química e energia de superfície), as características das bactérias (carga superficial, hidrofobicidade e apêndices) e o ambiente circundante (tipo de meio, temperatura, pH, tempo de exposição e concentração bacteriana) são responsáveis pelas diferenças na adesão às superfícies por parte dos microrganismos (AZEREDO, HENRIQUES, NOVELLO, 2012; HOCEVAR et al., 2014). Além das próprias características intrínsecas ao microrganismo e à natureza da superfície, já foi

demonstrado que, em biofilmes multiespécies, os microrganismos possuem taxas de adesão diferentes que quando em biofilme monoespécie. Essa interação adiciona uma camada extra de complexidade na composição, desenvolvimento da estrutura e fenótipos destes tipos de biofilmes (ALMEIDA; AZEVEDO, 2014).

Nesta investigação comparou-se a formação de biofilmes monoespécie e multiespécie no tempo de 24 horas de incubação (Tabelas 7 e 8 e Figuras 6 e 7). A formação total de biofilme após 24 horas de incubação foi significativamente maior para os biofilmes monoespécies ($16,885 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$). Na literatura, as diferenças nas formações entre os biofilmes monoespécies e multiespécies apresentam resultados divergentes. O biofilme multiespécie pode proporcionar aos microrganismos efeitos antagônicos, tais como competição por nutrientes e inibição do crescimento, ou efeitos sinérgicos, como coordenar melhor a utilização de nutrientes ou suportar condições adversas (ELIAS; BANIN, 2012).

Norwood e Gilmour (2001) estudaram a formação de biofilmes individuais de duas cepas de *L. monocytogenes* (FM876 e Scott A) e biofilmes multiespécies em consórcio com *Staphylococcus xylosus* DP5H e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 no aço inoxidável a 4°C, 18°C e 30°C. Em consonância com nosso trabalho, os autores verificaram que ambas estirpes de *L. monocytogenes* apresentaram maior adesão nas monoculturas que em biofilmes mistos. No entanto, as diferenças foram significantes apenas a 4°C e 30°C para FM876 e 30°C para Scott A. A maior adesão nos biofilmes monoespécie foi justificada pela competição com os microrganismos *Staphylococcus xylosus* e *Pseudomonas fragi* na comunidade mista. Além da competição por nutrientes, *Staphylococcus xylosus* produz compostos antagônicos e a matriz polimérica extracelular produzida por este microrganismo afeta a adesão da *L. monocytogenes* no aço inoxidável.

Durante a formação de biofilmes multiespécies, três situações podem ocorrer: diminuição na taxa de adesão quando comparado ao biofilme monoespécie, aumento da adesão em relação à cultura pura e nenhuma modificação na taxa de adesão. A ocorrência de um destes fatos dependerá dos microrganismos envolvidos e das superfícies de adesão (McEldowney e Fletcher, 1987). Quando vários microrganismos interagem na matriz do biofilme, como em nosso trabalho, a estrutura, a função da comunidade e outros mecanismos aumentam a complexidade, em comparação com biofilmes de uma única estirpe (SANCHEZ-VIZUETE et al., 2015).

Røder et al. (2015) obtiveram um resultado diferente ao deste trabalho, pois aproximadamente 20% das comunidades multiespécies cultivadas a 15°C apresentaram aumento na formação de biofilme em comparação aos biofilmes monoespecies. Os autores

ênfâtizaram que as interações multiespécies são complexas e a complexidade aumenta à medida que aumenta o número de espécies na comunidade.

O tipo de superfície é um fator que influencia nas taxas de adesão de biofilmes mistos ou simples. A capacidade de coagregação de algumas espécies é altamente dependente dos componentes da superfície celular que permitiriam a adesão de uma espécie à outra (ELIAS; BANIN, 2012). Nesta investigação, podemos observar que, dentre as superfícies testadas, o aço inoxidável exibiu diferença significativa na comparação entre biofilmes monoespécie e multiespécie, sendo maior no primeiro. Jahid et al. (2015) também observaram diferença na adesão de biofilmes monoespécie e multiespécie em função da superfície de adesão. Os autores notaram que biofilmes de monocultura aderiram significativamente mais à superfície da alface do que os biofilmes mistos. No entanto, não houve diferença entre os biofilmes na taxa de adesão no aço inoxidável. Os autores concluíram que a alface proporcionou ao biofilme uma relação antagônica, provavelmente pela competição de nutrientes, enquanto o aço inoxidável proporcionou uma interação neutra.

A organização espacial dentro dos biofilmes também influencia nas taxas de adesão. Os microrganismos não estão organizados aleatoriamente dentro de um biofilme multiespécie, os mesmos seguem um padrão que determinará seu comportamento dentro da comunidade (SANCHEZ-VIZUETE et al., 2015). Segundo Elias e Banin (2012) existem três tipos de disposição dos microrganismos nas comunidades: microcolônias, onde cada espécie encontra-se ‘isolada’ da outra; coagregação, onde as várias espécies estão envolvidas e distribuídas em todo o biofilme; e a estrutura em camadas, onde ocorre uma estratificação na comunidade, estando uma espécie sobre a outra.

No entanto, deve-se ressaltar que ainda não foi esclarecido o que determina a escolha de uma dessas três arquiteturas pelos microrganismos durante a formação dos biofilmes, e se o tipo de exposição espacial traria à comunidade alguma propriedade fenotípica diferente (ELIAS E BANIN, 2012).

ênfatiza-se que, apesar dos biofilmes multiespécies terem obtidos massas globais inferiores aos biofilmes monoespécies, muitas vezes o ganho com relação à proteção ao stress e aos sanitizantes são maiores nas comunidades mistas (BURMØLLE et al., 2014; JAHID et al., 2015).

Os resultados observados em nosso trabalho são relevantes para a indústria de alimentos, uma vez que superfícies de ampla utilização em utensílios e equipamentos foram facilmente aderidas por microrganismos. Isso pode acarretar a contaminação dos alimentos e perigo à saúde do consumidor, sendo tanto um problema para a saúde pública como prejuízos

econômicos à indústria. As interações ocorridas nos biofilmes multiespécies devem ser melhor esclarecidas, a fim de se aprimorar o controle durante a higienização na indústria alimentícia.

A produção de EPS foi avaliada nos biofilmes multiespécies em 4, 12 e 24 horas de incubação. Nesta pesquisa avaliou-se a presença de carboidratos como constituinte majoritário do EPS formado nos biofilmes multiespécies.

O papel da matriz de EPS nos biofilmes monoespécies tem sido bastante explorado pela comunidade acadêmica. No entanto, pouco se sabe sobre sua função no desenvolvimento de comunidades mistas. Para esses biofilmes, a organização das diferentes espécies pode ser importante para a função da comunidade e, portanto, a matriz desempenha um papel vital na sua organização estrutural (PERIASAMY et al., 2015).

Os resultados da produção de EPS nos biofilmes multiespécies, submetidos a diferentes temperaturas, estão dispostos nas Tabelas 09, 10 e 11. Notou-se que, em relação às temperaturas, o polietileno foi a superfície onde houve maior destaque na quantificação de EPS. Uma maior expressividade na produção de EPS provavelmente está relacionada à maior formação de biofilmes observada nesta superfície.

A hidrofobicidade do material em contato com as bactérias contribui para que as mesmas adiram de forma diferente entre as superfícies. Esta é a primeira fase da formação do biofilme, denominada adesão reversível. Após a fase de interação entre o microrganismo e a superfície, inicia-se a segunda fase da formação do biofilme, onde ocorre a excreção de substâncias poliméricas extracelulares, e a adesão se torna irreversível. A matriz de EPS reforça as interações dos microrganismos entre si e entre as superfícies inicialmente aderidas, contribuindo, assim, na formação da microcolônias nas superfícies (COSTERTON et al., 1995).

Segundo Ghafoor, Hay e Rehm (2011) o aumento na produção de EPS intensifica as interações célula-célula, bem como aumento da biomassa do biofilme. Logo, a produção de polissacarídeos de uma espécie individual tem um impacto significativo no desenvolvimento dos biofilmes multiespécies e nas propriedades de tais comunidades (SARAVANAN et al., 2015).

Notou-se que não houve um padrão entre as temperaturas, superfícies e produção EPS. Destacando-se as temperaturas de 3°C e 9°C nas superfícies de polietileno e poliuretano. De acordo com Myszka e Czaczyk (2011), a temperatura é um dos fatores determinantes na síntese de EPS, juntamente com o fornecimento de carbono e/ou nitrogênio, valor de pH, limitação de oxigênio e estágio de crescimento celular.

A maior produção de EPS observada nas temperaturas de refrigeração pode estar relacionada ao fato de que uma das principais funções da matriz é proteger as células bacterianas

contra condições ambientais estressantes. Logo, a sua expressão “*in vitro*” é favorecida quando o meio é pobre em nutrientes e/ou a temperatura não é a ótima para o crescimento da espécie (SEBASTIÃO, 2010). Segundo Kokare et al. (2009) a matriz funciona como abrigo e barreira térmica para as bactérias que residem no biofilme, reduzindo assim, o estresse ambiental direto sobre as mesmas.

No aço inoxidável, nas primeiras horas de incubação dos cupons, houve maior produção de EPS a 25°C. Após o tempo máximo de incubação (24 horas) não houve diferença significativa entre as temperaturas. Acredita-se que, por ser o aço inoxidável uma superfície mais difícil de aderir, foi necessária uma maior produção de EPS mesmo sem estar em uma temperatura crítica.

Na maioria dos casos, as temperaturas mais altas obtiveram menor produção de substância polimérica extracelular. Considera-se que, por estarem numa faixa ótima de crescimento dos microrganismos utilizados no presente experimento, as bactérias “consideraram” que não havia necessidade de produzir um EPS muito espesso, já que as condições ambientes não estavam adversas para o crescimento. Para Nevot et al. (2008) o rendimento de EPS foi máximo em temperaturas de incubação inferiores a 10°C. Na temperatura ótima de crescimento dos microrganismos estudados (18°C), a quantidade de EPS produzida foi quatro vezes menor do que em temperaturas subótimas, sendo a produção de EPS desprezível em temperaturas acima de 25°C.

Diversos trabalhos têm observado a produção de EPS aumentada em temperaturas subótimas de crescimento dos microrganismos, enfatizando o papel crioprotetor dos mesmos (GORRET et al., 2001; NICHOLS, BOWMAN e GUEZENNEC, 2005). Sutherland (1972) afirma que com a diminuição da temperatura, a taxa de crescimento e a biossíntese da parede celular diminuem, ocasionando num aumento na disponibilidade de moléculas precursoras para a biossíntese de EPS. Este mecanismo explicaria a formação de EPS em temperaturas adversas para o crescimento dos microrganismos.

Observou-se que houve uma tendência na diminuição do EPS ao decorrer do tempo de incubação. Possivelmente isto ocorreu pelo fato de que, com o passar do tempo, as células se multiplicaram, acarretando uma escassez de alimentos, sendo necessária a utilização da matriz como fonte de nutrientes. Quando isto ocorre, proteínas com atividade enzimática são liberadas no interior do biofilme, hidrolisando os biopolímeros em pequenos produtos, que são absorvidos e utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos (AZEREDO; CERCA, 2012; ZANGH et al., 2015).

Não foi possível esclarecer a relação entre as superfícies, temperaturas e produção da matriz extracelular. Biofilmes multiespécies são complexos, e as diversas condições aos quais os microrganismos são expostos afetam de forma significativa a matriz e a estrutura do biofilme. Diferenças estruturais entre proteínas e polissacarídeos afetam na hidrofobicidade e hidrofiliabilidade da matriz, sugerindo uma influência durante a adesão das células às superfícies (HOOD; ZOTOLLA, 1995; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Deve-se salientar que a análise do EPS realizada nesta pesquisa foi em relação ao constituinte carboidrato. Não pode ser descartada a possibilidade de que, em certas temperaturas e superfícies, poderia haver outros componentes em maior expressão e que não foram quantificados pela metodologia empregada.

Fagerlund et al. (2016) avaliaram a formação de biofilmes e a composição da matriz polimérica extracelular de *Staphylococcus* spp. associadas à alimentos. Foram identificadas 8 estirpes formadoras de biofilmes, *S. capitis* (2), *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. lentus* (2), e *S. saprophyticus* (2). Destas, três produziram EPS majoritariamente de carboidratos e cinco produziram EPS majoritariamente formados por proteínas, sendo as primeiras mais tolerantes ao efeito do cloreto de benzalcônio tanto em suspensão quanto em biofilme. Os autores concluíram, então, que a matriz do biofilme de *Staphylococcus* spp. associados a alimentos variam em relação à natureza (proteína ou polissacarídeo), e isso pode afetar a sensibilidade em relação ao desinfetante utilizado. Ou seja, em um mesmo gênero pode haver diferença entre a composição do EPS.

Em nosso trabalho, avaliaram-se indiretamente dois métodos de sanitização, um método físico através da utilização da água aquecida a 85°C e um método químico através da utilização do hipoclorito de sódio a 2%. Os trabalhos que visam avaliar a eficácia dos sanitizantes frente aos biofilmes microbianos geralmente quantificam a população sobrevivente aos sanitizantes após os tempos de exposição (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; PAN et al., 2006; PAK; CHEN, 2015; OLIVEIRA, 2015; WEBBER, 2015; GEHLEN, 2016). Neste projeto, para este fim, quantificou-se o EPS restante após os tratamentos de sanitização. A diminuição do EPS pós-tratamento em comparação com o controle indicaria que os tratamentos foram capazes de romper a matriz e, possivelmente, teriam entrado em contato com as comunidades multiespécies. Observou-se, após os tratamento com água quente a 85°C e hipoclorito de sódio a 2%, diminuiu-se a quantificação do EPS (Tabela 12). A maior redução obtida foi após a exposição dos cupons em água a 85°C.

Na indústria avícola, água quente a 85°C é utilizada para higiene operacional de utensílios, como facas de corte (BRASIL, 1998). Vários trabalhos tem demonstrado que este

procedimento é eficaz na remoção dos biofilmes (OLIVEIRA, 2015; WEBBER, 2015). Segundo Andrade (2008), a letalidade da água quente frente aos microrganismos consiste na alteração de DNA e RNA, e no extravasamento dos constituintes do citoplasma devido a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática .

No trabalho realizado por Charlebois et al. (2017) verificou-se que o tipo de biofilme, se em comunidades simples ou mistas e a forma de incubação dos mesmos, anaerobiose ou aerobiose, refletem na eficiência dos sanitizantes frente as comunidades sésseis. Os autores investigaram a eficiência do hipoclorito de sódio, monopersulfato de potássio, cloreto de amônia quaternária, peróxido de hidrogênio e glutaraldeído em biofilmes monoespécie de *Clostridium perfringens* ou dupla espécie com *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*. Constatou-se que o hipoclorito de sódio foi o sanitizante mais eficaz nos biofilmes monoespécies. Em geral, comparando-se os biofilmes monoespécie e dupla espécie, notou-se que os biofilmes monoespécies eram mais tolerantes aos sanitizantes testados. Quanto à forma de incubação, biofilmes monoespécie cultivados em anaerobiose, foram mais tolerantes ao hipoclorito de sódio e ao cloreto de amônia quaternária do que os biofilmes dupla espécie com *S. aureus* ou *E. coli*. Logo, este trabalho demonstrou que as diversas condições em que são expostos os microrganismos irão influenciar em sua resistência aos sanitizantes. Sendo necessário levar em conta estes fatores na eleição do sanitizante adequado. Logo, este trabalho demonstrou que as diversas condições em que são expostos os microrganismos irão influenciar em sua resistência aos sanitizantes. Sendo necessária levar em conta estes fatores na eleição do sanitizante adequado.

A diferença na eficácia dos sanitizantes pode estar relacionada aos diferentes mecanismos de adesão. As bactérias que formam biofilmes produzem uma matriz extracelular que é na maioria das vezes de natureza polianiónica. Segundo Kumar e Anand (1998), o cloro é citado como um dos desinfetantes capaz de despolimerizar o EPS, facilitando o desprendimento dos biofilmes das superfícies. Os fatores que afetam a eficiência do cloro na penetração dos biofilmes são a retenção de matéria orgânica e mineral na matriz extracelular (SAMRAKANDI; ROQUES; MICHEL, 1997).

Um estudo realizado por Samrakandi, Roques e Michel (1997) demonstrou que a eficiência do cloro varia de acordo com a composição do EPS. E que o meio de cultura influencia na composição da matriz. Observou-se menor eficiência do cloro nos biofilmes formados em meio com sacarose e glicerol, possivelmente pela maior produção de polissacarídeos observada nestes meios.

Quanto mais substâncias orgânicas no EPS, maior será a reação do cloro com estas e menor será a quantidade de cloro disponível para desinfecção. Apesar dos métodos de desinfecção utilizados neste trabalho demonstrarem que houve rompimento da matriz polimérica extracelular, acredita-se que, caso não haja remoção total desta matriz nas superfícies, ela servirá como nova fonte de adesão, facilitando a aderência de outros microrganismos e incentivando a formação de novos biofilmes (Gibson et al., 1999; LOMANDER 2004).

A escolha do método adequado para sanitização na indústria de alimentos deve levar em consideração as características dos microrganismos frequentemente encontrados no ambiente. A combinação de métodos físicos e químicos pode ser uma boa alternativa para englobar a variedade de microrganismos presentes nos biofilmes multiespécies.

A comunicação celular, *quorum sensing* (QS), também foi um parâmetro avaliado. Durante a formação dos biofilmes, as bactérias secretam moléculas que são responsáveis por sua comunicação. Já foi demonstrado que o *quorum sensing* regula uma ampla gama de funções, tais como bioluminescência, motilidade, fatores de virulência e produção de biofilme (TALAGRAND-REBOUL; JUMAS-BILA; LAMY, 2017).

Sabendo disto, investigou-se a presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* nas comunidades mistas sésseis e planctônicas, em todas as superfícies e temperaturas previamente utilizadas para formação dos biofilmes. Nas análises efetuadas não foram encontradas moléculas autoindutoras nas amostras.

Um dos fatores que podem ter influenciado é o fato de que, em outros trabalhos (NIEVAS, 2012; POMINI, 2005; VASAVI, 2013) em que se estudara a produção de moléculas de *quorum sensing*, o tempo de incubação e o volume de meio para o crescimento dos microrganismos eram superiores aos utilizados no presente trabalho. Esper (2010), por exemplo, reativou as cepas de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *B. cereus* ATCC 14597 em tubos contendo 10 mL de caldo LB e os incubou a 35°C por 24 horas. Em seguida, os cultivos puros e mistos foram transferidos para erlenmeyers contendo 1L de caldo LB e incubados sob agitação de 100 rpm a 35°C/24h, e a partir daí iniciou-se a extração para análise dos extratos pelos biossensores. A produção de moléculas autoindutoras (AI's) é proporcional à densidade bacteriana (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994), logo, um tempo de incubação maior e uma maior disponibilidade de nutrientes irá favorecer o crescimento dos microrganismos e conseqüentemente facilitar a detecção das moléculas AI's. Porém, o objetivo em nosso estudo foi verificar se nas condições propostas havia produção de autoindutores, não estimular a produção das mesmas.

As bactérias secretam diferentes tipos de AHL's que se diferem quanto ao comprimento da cadeia carbônica, saturação e substituição no terceiro carbono quer pelo grupo oxo ou hidroxilo. As cadeias são compostas de quatro a dezoito carbonos, as variações existentes asseguram que as AHLs sejam reconhecidas por diferentes proteínas do tipo LuxR (READING; SPERANDIO, 2006; WANG et al., 2011; YIN et al., 2012). Steindler e Venturi (2007) afirmam que a variedade de AHL's pode ser um dos fatores que influenciam em sua detecção, uma vez que algumas bactérias podem produzir homoserinas com estruturas que não são detectáveis pelos biossensores. O *Chromobacterium violaceum* CV026 consegue detectar com maior precisão o C6-AHL, além do C6-3-oxo-AHL e C8-AHL (seis vezes menos ativo do que C6-AHL), C8-3-oxo-AHL (11 vezes menos ativo) e C4-AHL (30 vezes menos ativo). As moléculas C4-3-oxo-AHL e as AHL's com cadeias de mais de 10 carbonos são menos eficientes na indução da produção da violaceína, sendo que todos os 3-hidroxi-AHLs não são detectados pela estirpe CV026 (MCCLEAN et al., 1997). A presença de autoindutores na amostra abaixo do limite de sensibilidade do biossensor também pode ser apontada com um dos fatores responsáveis pela presença dos AHL's não terem sido detectada pelo CV026.

Assim, recomenda-se que, nos trabalhos futuros, sejam utilizados mais de um biossensor para detecção de AHL, a fim de que se tenha uma margem de detecção maior (STEINDLER; VENTURI, 2007). Algumas técnicas analíticas também poderiam ser utilizadas para complementar a detecção de moléculas de QS. Cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a rotulagem isotópica são métodos comumente usados (YANG et al., 2006). Estas técnicas apresentam maior estabilidade que as cepas biossensores. Takagi (2011) também avaliou a presença de AHL através do bioensaio com a cepa *Chromobacterium violaceum* CV026. Os resultados sugeriram que não havia AHL presentes nas amostras, sendo possível sua detecção apenas no controle positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. No entanto, dados obtidos pela análise das amostras por cromatografia líquida com detector de espectrômetro de massa (LC-MS iontrap), revelaram um pico característico do anel principal da estrutura da AHL que apresentou a relação massa carga m/z 102, sugerindo os seguintes compostos: AHL-C14, AHL-3-oxo-C14 e AHL-C10. Assim, pode-se concluir que, apenas com os resultados obtidos não se deve afirmar que não havia AHL nas amostras analisadas, pois sua presença em quantidades traço poderia não ter sido detectada pelo microrganismo biossensor.

6 CONCLUSÃO

O estudo da formação de biofilmes multiespécies e das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), bem como formas de higienização de superfícies, é de fundamental importância para a indústria produtora de alimentos. Com visto na importância que se tem dado nos últimos anos ao estudo de formação de biofilmes, espera-se que este trabalho venha somar com as informações disponíveis na literatura.

A partir dos dados obtidos, conclui-se que:

- Os microrganismos estudados formam mais biofilmes quando em monoespécie do que em interações multiespécies, provavelmente pela ausência de competição;
- A capacidade destes microrganismos, considerados mesófilos, se desenvolverem e aderirem em temperaturas próximas a 0°C corrobora a importância dos biofilmes para sobrevivência em ambientes adversos;
- A manutenção dos alimentos na cadeia do frio proporciona menor adesão se comparada às temperaturas mais altas, podendo ser uma ferramenta junto a outras estratégias para retardar a adesão dos microrganismos;
- Os polímeros foram as superfícies com maior adesão pelos microrganismos em biofilmes multiespécies, e no polietileno houve maior produção de EPS, principalmente nas temperaturas de refrigeração;
- Os tratamentos de sanitização utilizados foram capazes de romper a matriz de EPS, com melhor remoção pela água aquecida a 85°C;

As moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* não puderam ser identificadas pelos métodos utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual de 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf> Acesso em: 09 fev. 2017

ALMEIDA, A. P. **Avaliação higiênico-Sanitária da Carne de Frango de corte de estabelecimentos que abatem e/ou comercializam no município de Patos – PB.** Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Patos- PB, 2011.

ALMEIDA, C.; AZEVEDO, N. F. Multi-species biofilms. In PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; CERCA, N.; AZEREDO, J. **Clinical Biofilms – Current Concepts and Advanced Techniques**, Braga (Portugal): Universidade do Minho – DEB, 2014. ISBN: 978-989-97478-4-5, p. 63-75.

ALTHAUS, R. A., CANTERI, M. G., GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. **Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica**, Parte 1, Ponta Grossa, p. 280 - 281, 2001.

ALVES, J.; OLIVEIRA, T. C. R. M. de. Presença de *Campylobacter* spp. em cortes refrigerados de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2829-2836, nov./dez. 2013.

ANDRADE, N. J. de. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 2008.

ASAD, S.; OPAL, S. M. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell to-cell communication during invasive bacterial infection. **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 1, 2008

AVILES, B.; KLOTZ, C.; EIFERT, J.; WILLIAMS, R.; PONDER, M. Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella* enterica sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 252-259, 2013.

AZEREDO, J.; CERCA, N. A matriz dos biofilmes: o truque para sobreviver nas mais hostis condições ambientais. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. F. **Biofilmes na saúde, no ambiente e na indústria.** Braga (Portugal): Universidade do Minho (2012), p. 23- 25.

AZEREDO, J.; HENRIQUES, A.; NOVELLO, J. Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. F. **Biofilmes na saúde, no ambiente e na indústria.** Braga (Portugal): Universidade do Minho (2012), p. 279- 286.

BAN, G.-H.; KANG, D.-H. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. **Food Microbiology**, v.55, p. 47-54, 2016.

BARBOSA, J. **Avaliação da adesão de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em facas de desossa e resistência a diferentes formas de desinfecção.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS, 2012.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **Int. Microbiol.** v. 8, 2005.

BERESFORD, T. P.; et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4, p. 259-274, 2001.

BOARI, C. A.; et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciênc Tecnol Alim**, v. 29, n. 4, p. 886-95, 2009.

BONSAGLIA, E. C. R. **Produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu, SP, 2012.

BRASIL. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determinar que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. Estabelecer o prazo até as respectivas revalidações dos registros para que os produtos aqui abrangidos e anteriormente registrados se adequem ao novo regulamento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 17041-3, 5 set 1988. Seção I.

BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria Ministerial 193. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 de setembro de 1994.

BRASIL, Portaria nº 210, de novembro de 1998. Regulamenta a Inspeção Tecnológica e Higiênica Sanitária de Carne de Aves. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Brasília - DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**; Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA nº 275, 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**; Brasília, DF, 23 outubro 2003.

BRASIL, MAPA. Instrução Normativa nº70, de 06 out. 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.9, 10 out. 2003, Seção 1, 2003a.

BRASIL, MAPA. Instrução Normativa nº78, de 3 de novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.9, 10 out. 2003, Seção 1, 2003b.

BRASIL, MAPA. Circular nº 175, de 16 de maio de 2005. Disponível em:<
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Qualidade%20dos%20alimentos/Circular%20175.doc>. Acesso em: 04 ago. 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2016 Disponível em:<
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2017

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; McQUILLAN, A.J. Laboratory scale Clean-in-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, p. 254-262, 2006.

CARANDINA, D. C. F. **Avaliação de biofilmes formados por isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes.** Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, 2013.

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.

CARLI, S. de.; et al. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. **Poultry science**, p. pev256, 2015.

CASARIN, L. S. **Avaliação de interações físico-químicas envolvidas na adesão de patógenos alimentares em superfícies metálicas de equipamentos utilizados na produção de alimentos.** Tese (Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Porto Alegre, RS, Brasil, 2014.

Centers for Disease Control and Prevention. **Reports of *Salmonella* Outbreak Investigations from 2015.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2015.html>> Acesso em: 03 ago. 2015

CHARLEBOIS, A.; JACQUES, M.; BOULIANNE, M.; ARCHAMBAULT, M. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. **Food Microbiology**, v. 62, p. 32-38, 2017.

CHENG, F.; MA, A.; LUO, J.; ZHUANG, X.; ZHUANG, G. N-acylhomoserine lactone-regulation of genes mediating motility and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pathovar *tabaci* 11528. **Microbiology Open**, p. 1- 14, 2017.

- CHIA, T. W. R.; GOULTER, R. M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food microbiology**, v. 26, n. 8, p. 853-859, 2009.
- COSTERTON, B.; DIRCKX, P. **Quorum sensing**. Center for Biofilm Engineering. Disponível em: <<http://www.biofilm.montana.edu/resources/images/multicellularextracellular/quorum-sensing.html>>. Acesso em: 06 dez. 2015
- COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 435-464, 1987.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Introduction to microbial biofilms, p. 1-11. *In*: LAPPIN-SCOTT, H. M.; COSTERTON, J. W. **Microbial biofilms**. Cambridge University Press, 2003.
- DALTON, T.; DOWD, S. E.; WOLCOTT, R. D.; SUN, Y.; WATTERS, C.; GRISWOLD, J. A.; RUMBAUGH, K. P. An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. **PLoS one**, v. 6, n. 11, p. e27317, 2011.
- DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; DOVE, S. L.; KOLTER, R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol.** v.37, p.424-32, 2000.
- DANTAS, S. T. A. **Transferência de *Salmonella enteritidis* por contaminação cruzada e formação de biofilme em diferentes superfícies de corte**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP- 2014.
- DIAS, P. A. ***Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica* em aves silvestres e frangos de corte**. Tese (Doutorado em Ciências; área de concentração: Sanidade Animal). Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de veterinária. Pelotas –RS, 2015.
- DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552–1561, 2008.
- DIEDRICH et al. Formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças alimentares e de origem avícola. **Anais do VI Congresso Latino Americano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**. Gramado, v.27, eds. 218/ 219, 2013 (1 CD ROM).
- DONG, H.; PENG, D.; JIAO, X. et al. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. **Microbiology**, v. 157, p.1798-1805, 2011.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 9, 2002.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; DURÁN, M.; BROCCHI, M.; CORDI, L.; TASIC, L.; NAKAZATO, G. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology advances**, v.34, n.5, p. 1030-1045, 2016.

ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiol.**, v. 36, p. 990–1004, 2012.

FAGERLUND, A.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; MIKKELSEN, M. I.; MØRETRØ, T. Biofilm Matrix Composition Affects the Susceptibility of Food Associated Staphylococci to Cleaning and Disinfection Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 856, 2016.

FERNANDES, M. DA S. **Enterococcus spp. e Bacillus cereus isolados do processamento de ricota: patogenicidade, formação de biofilmes multiespécie e detecção de autoindutores AI-2.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2014.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol.** v. 8, p. 623-633, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Technical Meeting on Salmonella and Campylobacter in chicken meat.** Rome, 2009. Disponível em: <<http://www.worldvet.org/node/5236>>. Acesso em: 12 set. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5 Salmonella.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm#content>> .Acesso em: 09 jun. 2015

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book, **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.** Second Edition. [*Salmonella* species, pp. 9 - 13], 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos.** In:___ Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996, cap. 4, p. 33-82.

FSAI (Food Safety Authority of Ireland). Control of Campylobacter species in the food chain. 2002 Disponível em < <https://www.fsai.ie/assets/0/86/204/d5a67d16-a051-4952-8efa-e7236ddd2bc5.pdf>> Acesso em: 20 set. 2015

FSAI (Food Safety Authority of Ireland). **Recommendations for a Practical Control Programme for *Campylobacter* in the poultry production and slaughter chain.** 2011 Disponível em: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Campylobacter%20control%20programme%20FINAL.pdf> Acesso em: 01 set. 2015

FSAI (Food Safety Authority of Ireland). ***Campylobacter* decreases slightly, *Salmonella* down, *Listeria* up – EFSA and ECDC say.** 2014 Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/140219> Acesso em: 03 ago. 2015

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the luxR-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269-275, 1994.

FUQUA, C.; WINANS, S. C. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 2, p. 435-440, 1996.

GAO, M.; COGGIN, A.; YAGNIK, K.; TEPLITSKI, M. Role of specific quorum-sensing signals in the regulation of exopolysaccharide ii production within *Sinorhizobium meliloti* spreading colonies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

GARRET, T. R. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 1, p. 1049–1056, 2008.

GARRIDO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALÓN, I. The problem of Listeriosis and ready-to-eat products: prevalence and persistence. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Formatex, Badajoz**, p. 1182-1189, 2010.

GAZETA RUSSA. 2012. Disponível em: <http://gazetarussa.com.br/articles/2012/08/13/frangos_infectados_com_listeriose_sao_devolvidos_ao_brasil_15175>. Acesso em: 02 jun. 2015.

GEHLEN, S. S.; ZANIN, J. C. B.; TROIAN, L.; DIEDRICH, L. N.; MORETTE, K. L.; CISCO, I. C.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. Formação de biofilme em poliestireno a 36°C, 25°C, 9°C e 3°C por cepas de *Salmonella* spp. isoladas de salame e linguiça. **Anais do VI Congresso Latino Americano e XII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos.** Gramado, v.27, eds. 218/ 219, 2013 (1 CD ROM).

GEHLEN, S. S. Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2016.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 2ªed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

- GHAFOOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, n. 15, p. 5238-5246.
- GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; ÖLMEZ, H. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.
- GIÃO, M. S.; KEEVIL, C. W. Hydrodynamic shear stress to remove *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel and polytetrafluoroethylene surfaces. **J Appl Microbiol**, v. 114, p. 256–265, 2013.
- 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. **J. Appl. Microbiol.**, v. 87, n. 1, p. 41–48, 1999.
- GONÇALVES, K. D. O.; YAMANAKA, E. H. U.; ALMEIDA, A. P. I.; CHANO, L. D. J.; RIBEIRO, A. B. Pesquisa de *Campylobacter* spp. em carnes de frango comercializadas na cidade de Campo Mourão-PR. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 23, n. 2, p. 211-216, abr./jun. 2012.
- GORRET, N.; MAUBOIS, J. L.; ENGASSER, J. M.; GHOUL, M. Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 788- 796, 2001.
- GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B.F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 1165-1171, 2007.
- GRIMONT, P. A. D; WEILL, F.X.; **Antigenic Formulae do the *Salmonella* Serovars**. Paris, França: Instituto Pasteur, 2007. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella [online], 9 ed. Disponível em:
<<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms-index.html>> Acesso em: 25 set. 2015.
- GUPTA, A. Biofilm Quantification and Comparative Analysis of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) & MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration) Value for Different Antibiotics against *E. coli*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 2, p. 198-224, 2015.
- HOCEVAR, M.; JENKO, M.; GODECK, M.; DROBNE, D. An overview of the influence of stainless-steel surface properties on bacterial adhesion. **Materiali in tehnologije**, v. 48, n. 5, p. 609-617, 2014.
- HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food control**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.
- IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.

ICA, T.; CANER, V.; ISTANBULLU, O.; NGUYEN, H. D.; AHMED, B.; CALL, D. R.; BEYENAL, H. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. **Appl Environ Microb**, v.78, p.1033–1038, 2012.

IMMIG, J. O. **Higienização na indústria de alimentos**. Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2013.

ISO 18593. 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.

JAHID, I. K.; HAN, N.; ZHANG, C-Y.; HÁ, S-D. Mixed culture biofilms of *Salmonella* Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce show enhanced resistance of their sessile cells to cold oxygen plasma. **Food Microbiology**, v. 46, p. 383-394, 2015.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. 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.

JUNG, J-H.; CHOI, N-Y.; LEE, S-Y. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. **Food microbiology**, v. 34, n. 1, p. 70-80, 2013.

KAAKOUSH, N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 687-720, 2015.

KALMOKOFF, M.; LANTHIER, P.; TREMBLAY, T. L.; FOSS, M.; LAU, P. C.; SANDERS, G.; AUSTIN, J.; KELLY, J.; SZYMANSKI, C. M. Proteomic Analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 Biofilms Reveals a Role for the Motility Complex in Biofilm Formation. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 12, p. 4312-4320, 2006.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSE, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 52, p. 123-127, 2006.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnonology**, v. 8, p. 159-168, 2009.

KOSTAKI, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BRAXOU, E.; NYCHAS, G. J.; GIAOURIS, E. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78 n. 8, p. 2586–2595, 2012.

KUBOTA, H.; SENDA, S.; NOMURA, N.; TOKUDA, H.; UCHIYAMA, H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 381-386, 2008.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, 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.

LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J. G.; NIJLAND, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 813-823, 2010.

LANG, J.; FAURE, D. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. **Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production**, p. 37, 2015.

LEMOS, A.L.S.C. **Biofilmes**. CTC- TecnoCarnes. Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de Carnes do Ital. v. XII, n.1, jan/fev. 2002.

LI, H.; LI, X.; WANG, Z.; FU, Y.; AI, Q.; DONG, Y.; YU, J. Autoinducer-2 regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation and virulence production in a dose-dependent manner. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 192, 2015.

LI, J.; FENG, J.; MA, L.; DE LA FUENTE NÚÑEZ, C.; GÖLZ, G.; LU, X. Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 253, p. 20-28, 2017.

LINDSAY, D.; von Holy; A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiol.** v. 14, p. 383-390, 1997.

LIRA, M. C.; GIVISIEZ, P. E. N.; SOUSA, F. G. C. de.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. de.; SPRICIGO, D. A.; GEBREYES, W. A.; OLIVEIRA, C. J. B. de. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. **J Infect Dev Ctries**; v. 10, n. 9, p. 932-938, 2016.

LOMANDER, A.; SCHREUDERS, P.; RUSSEK-COHEN, E.; ALI, L. Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 275–283, 2004.

LÓPEZ - ALONSO. V.; ORTIZ, S.; MARTÍNEZ- SUÁREZ, J. V. Genome sequences of five disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two Iberian pork-processing plants. **Genome Announc**, v. 3, n. 2, p. e00077-15, 2015.

MARDER, E. P.; CIESLAK, P. R.; CRONQUIST, A. B.; DUNN, J.; LATHROP, S.; RABATSKY-EHR, T.; RYAN, P.; SMITH, K.; TOBIN-D'ANGELO, M.; VUGIA, D. J.; ZANSKY, S.; HOLT, K. G.; WOLPERT, B. J.; LYNCH, M.; TAUXE, R.; GEISSLER, A. L. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013–2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 66, p.397–403, 2017.

- MARQUES, S. C. **Caracterização bioquímica de bactérias psicrotróficas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras), 2008.
- MARQUES, V. F.; MOTTA, C. C. da; SOARES, B. da S.; MELO, D. A. de; COELHO, S. de M. de O, COELHO, I. da S.; BARBOSA, H. S.; SOUZA, M. M. S. de. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 118–124, 2017.
- MARTÍN-ESPADA, M. C.; D'ORS, A., BARTOLOMÉ, M. C.; PEREIRA, M.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Peracetic acid disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on polystyrene surfaces and comparison between methods to measure it. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 58-61, 2014.
- MCCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M; STEWART, G. S. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl-homoserine lactones. **Microbiology**, v.143, p.3703-3711, 1997.
- MCEIDOWNEY, S.; FLETCHER, M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. **Arch Microbiol**, v. 148, p. 57- 62, 1987.
- MENEGARO, A.; FLORES, A. F.; SIMER, P. SILVA, F. I. da; SBARDELOTTO, P. R. R.; PINTO, E. P. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Sci. Agrar. Parana.**, v. 15, n. 2, p. 171-174, 2016.
- MINHARRO, S.; NASCIMENTO, C. A.; GALLETI, J. P.; MERISSE, T. J.; FEITOSA, A. C. F.; SANTOS, H. D.; ANDRADE, M. A. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serovars isolated from edible offal and carcasses of slaughtered poultry in the state of Tocantins, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2661-2670, 2015.
- MOLTZ, A. G.; MARTIN, S. E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 92–97, 2005.
- MONTGOMERY, N. L.; BANERJEE, P. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms by pulsed ultraviolet light. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7 ed. Ed. Elsevier, 2014.
- NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, n. 1, p. 11-13, 2010.
- NESSE, L. L.; BERG, K.; VESTBY, L. K., OLSAKER, I.; DJØNNE, B. *Salmonella* Typhimurium invasion of HEp-2 epithelial cells *in vitro* is increased by N-

acylhomoserine lactone quorum sensing signals. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 44, 2011.

NEVOT, M.; DERONCELE', V.; MONTES, M. J.; MERCADE, E. Effect of incubation temperature on growth parameters of *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 and its production of extracellular polymeric substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 255–263, 2008.

NGUYEN, V. T.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. Effect of temperature and contact time on *Campylobacter jejuni* attachment to, and probability of detachment from, stainless steel. **J Food Prot.**, v. 73, n. 5, p. 832-838, 2010.

NICHOLS, C. M.; BOWMAN, JOHN P.; GUEZENNEC, J. Effects of incubation temperature on growth and production of Exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71 n. 7, p. 3519-3523, 2005.

NIEVAS, F.; BOGINO, P.; SORROCHE, F.; GIORDANO, W. Detection, characterization, and biological effect of *quorum sensing* signaling molecules in peanut-nodulating Bradyrhizobia. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2851-2873, 2012.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 320-324, 2001.

PEGUES, D.; MILLER, S. “*Salmonella* Species, Including *Salmonella* Typhi,” In: BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. **Principles and practice of infectious diseases**. Elsevier Health Sciences, 2014.

OLIVEIRA, A. L. de; ROCHA, D. A.; FINKLER, F.; DE MORAES, L. B.; BARBIERI, N. L.; PAVANELO, D. B.; HORN, F. Prevalence of ColV Plasmid-Linked Genes and In Vivo Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 8, p. 679-685, 2015.

OLIVEIRA, A. P. de. **Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis de surtos de doenças transmitidas por alimentos**. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2016.

OLIVEIRA, A. P. DE.; WEBBER, B.; POTTKER, E. S.; MARTELO, E.; DAROIT, L.; PILOTTO, F.; SANTOS, L. R. DOS.; RODRIGUES, L. B. Adesão e remoção de biofilmes de *Salmonella enteritidis* provenientes de surtos de DTA em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano. In: Simpósio de Alimentos, v. 9, p. 1-6, Passo Fundo. **Anais do IX SIAL 2015**. Disponível em: < <http://www.upf.br/sial/images/anais/2015/tecnologia/t01.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2015

OLIVER, J. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. **The Journal of Microbiology**. v. 43, p. 93-100, 2005.

OMS. Organização Mundial da Saúde. ***Salmonella* (non-typhoidal)**. 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 26 out. 2015

OMS. Organização Mundial da Saúde. **World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe**. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>>. Acesso em: 19 ago. 2015

ONBASLIA, D.; ASLIMB, B. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas* spp. strains. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 1, p. 64-67, 2009.

ORSI, R. H., WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p. 5273–5287, 2016.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577-588, 2007.

PAN, Y.; BREIDT, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, n. 12, 2006.

PANDINI, J. A.; PINTO, F.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. XX, n.X, p. 1-6, 2014.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. D.; SILVA, C. A. D. S.; SOARES, N. D. F. F.; SILVA, E. A. M. D. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PARK, Y. J.; CHEN, J. Control of the biofilms formed by curli-and cellulose-expressing shiga toxin–producing *Escherichia coli* using treatments with organic acids and commercial sanitizers. **Journal of food protection**, v. 78, n. 5, p. 990-995, 2015.

PARSEK, M. R.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L.; CRONAN, J. E., GREENBERG, E. P. Acyl homoserine-lactone *quorum sensing* signal generation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 96, p. 4360–4365, 1999.

PAVLICKOVA, S.; KLANCNIK, A.; DOLEZALOVA, M.; MOZINA, S. S.; HOLKO, I. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2017.

PEI, R.; LAMAS-SAMANAMUD, G. R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing *quorum quenching* Enzymes. **Appl Environ Microbiol.**, v. 80, n. 17, p. 5340-5348, 2014.

PENTEADO, F. R. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. Publ. UEPG **Biol. Health Sci.**, Ponta Grossa, v.17, n.1, p. 37-45, 2011.

PERDONCINI, G. **Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de aves após o pré-resfriamento por imersão.** Especialização (Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária. Porto Alegre, RS, 2012.

PERDONCINI, G. **Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em etapas do processamento de frangos de corte.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na com ênfase em Sanidade Avícola). Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Porto Alegre, RS, 2015.

PERDONCINI, G.; SIERRA-ARGUELLO; Y. M.; LIMA, L. M.; TRINDADE, M. M.; GOMES, M. J. P.; SANTOS, L. R. D.; NASCIMENTO, V. P. D. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 349-352, 2015.

PEREIRA, C. S.; THOMPSON, J. A.; XAVIER; K. B. AI-2-mediated signalling in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 156-181, 2013.

PERIASAMY, S.; NAIR, H.; LEE, K. W. K.; ONG, J.; GOH, J. Q. J.; KJELLEBERG, S.; RICE, S. A. *Pseudomonas aeruginosa* PAOI exopolysaccharides are important for mixed species biofilm community development and stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 851, 2015.

PORTARIA nº 210, de 10/ 11/1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento]. **Diário Oficial da União**, 26 nov. 1998b, 1998b. Seção 1, p.226.

PRAKASH, B., VEEREGOWDA, M.; KRISHNAPPA, G. **Biofilms: A survival strategy of bacteria.** Current science, v. 85, n. 9, 2003.

PRATES, D. da F.; FERNANDES, M. da S. XIII Higiene e Segurança de Alimentos. *In*: FERNANDES, M. da S.; GARCIA, R. de K. de A. **Princípios e Inovações em Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Rio de Janeiro: Editora AMCGUEDES, 2015.

RAVN, L.; CHRISTENSEN, A. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Methods for detection acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies for AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v.44, p.239-251, 2001.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 254, n. 1, p. 1-11, 2006.

RINAUDI, L. V.; GONZALEZ, J. E. The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7216–7224, 2009.

RØDER, H. L.; RAGHUPATHI, P. K.; HERSCHEID, J.; BREJNROD, A.; KNØCHEL, S.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. **Food Microbiology**, v. 51, p.18-24, 2015.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. D.; TAGLIARI, V. Z.; RIZZO, N. N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A. P. D.; NASCIMENTO, V. P. D. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1082-1085, 2010.

RODRIGUES, L. B.; DOS SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; TRENHAGO, G.; DE OLIVEIRA, A. P.; DO 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. 01-07, 2013.

RONNER, A.; WONG, A. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, 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.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento-Edição nº**, v. 33, p. 35, 2004.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, cap. 36, p. 343-363, 2001.

RYU, J.-H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247-254, 2005.

SAMRAKANDI, M. M.; ROQUES, C.; MICHEL, G. Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 751-758, 1997.

SANCHEZ-VIZUETE, P.; ORGAZ, B.; AYMERICH, S.; LE COQ, D.; BRIANDET, R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 705, 2015.

SANDERS, S. Q.; BOOTHE, D. H., FRANK, J. F.; ARNOLD, J. W. Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. **J Food Prot.**, v.70, n.6, p.1379-1385, 2007.

SANDERS, S. Q.; FRANK, J. F.; ARNOLD, J. W. Temperature and nutrient effects on *Campylobacter jejuni* attachment on multispecies biofilms on stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 8, n. 2, p. 271-278, 2008.

SCHAEFER, A. L.; HANZELKA, B. L.; EBERHARD, A.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 10, p. 2897-2901, 1996.

SCHAEFFER, C. R.; HOANG, T.-M. N.; SUDBECK, C. M.; ALAWI, M.; TOLO, I. E.; ROBINSON, D. A.; HORSWILL, A. R.; ROHDE, H.; FEYA, P. D. Versatility of biofilm matrix molecules in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates and importance of polysaccharide intercellular adhesin expression during high shear stress. **mSphere**, v. 1, n. 5, 2016.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Dev.** v.15,p. 1468-1480 2001.

SEBASTIÃO, F. de A. **Isolamento, caracterização bioquímica e molecular por PCR-RFLP e análise dos polissacarídeos produzidos na formação de biofilme de *Flavobacterium columnare* em peixes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP. 2010.

SEGHIR, A.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; SARI-BELKHARROUBI, L.; BOUCHERIT, K. Infectious risk related to the formation of multi-species biofilms (*Candida* – bacteria) on peripheral vascular catheters. **Journal of Medical Mycology**, 2017.

ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ, L.; MOŤKOVÁ, P.; ŠILHA, D.; VYTRÁSOVÁ, J. Detection of biofilm formation by selected pathogens relevant to the food industry. **Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne**, v. 64, n. 3, p. 169-175, 2014.

SILVA, C. F. da; GEHLEN, S. S.; WEBBER, B.; DIEDRICH, L. N.; PILOTTO, F.; DOS SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. Salmonella Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1229, 2014.

SILVA, D. B. da. **Atuação de ozônio sobre biofilme de *Listeria monocytogenes* em tubulação de aço inoxidável.** Dissertação (Ciências dos Alimentos, área de concentração em Tecnologia de leite) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

SILVA, I. D. M. M. D.; BALIZA, M.; SANTOS, M. P.; REBOUÇAS, L. T.; SANTOS, V. A. D.; SILVA, R. M. D.; EVÊNCIO-NETO, J. Presença de "*Escherichia coli*" em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997. 295p

SIMÕES, A. M. M. **Avaliação da contaminação por *Campylobacter spp.* em peitos de frango embalados em atmosfera protetora e em superfícies do ambiente fabril.** Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa (2010).

- SIMÕES, L. C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M. J. Intergeneric coaggregation among drinking water bacteria: Evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1259-1263, 2008.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 4, p. 338-345, 2006.
- 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.
- SREY, S. JAHID, I. K. HÁ, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.
- STEINDLER, L.; VENTURI, V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. **FEMS Microbiology Letters**, 266, p. 1-9, 2007.
- SUN, Z.; HE, X.; BRANCACCIO, V. F.; YUAN, J.; RIEDEL, C. U. Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. In *Advances in Microbial Physiology* ed. Rose, A.H. and Tempest, D.W. p. 143. London, New York, **Academic Press**, 1972.
- SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, 2001.
- TAKAGI, E. H. **Caracterização molecular e fenotípica de amostras bacterianas pertencentes ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus*- *Acinetobacter baumannii***. Tese (Doutorado Farmácia: Área de Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2011.
- TALAGRAND-REBOUL, E.; JUMAS-BILAK, E.; LAMY, B. The social life of *Aeromonas* through biofilm and *quorum sensing* systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 37, 2017.
- TAPP III, W. N.; GRAGG, S. E.; BROOKS, J. C.; MILLER, M. F.; BRASHEARS, M. M. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* after application of various sanitizing treatments to harvesting knives. **Journal of food protection**, v. 76, n.2, p. 200-204, 2013.
- TEH, A. H. T.; LEE, S. M.; DYKES, G. A. The Influence of Prior Modes of Growth, Temperature, Medium, and Substrate Surface on Biofilm Formation by Antibiotic-Resistant *Campylobacter jejuni*. **Current microbiology**, v. 73, n. 6, p. 859-866, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRAVIER, L.; GUADAGNINI, S.; GOUIN, E.; DUFOUR, A.; CHENAL-FRANCISQUE, V.; COSSART, P.; LECUIT, M. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003131, 2013.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VAID, R.; LINTON, R. H.; MORGAN, M. T. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. **Food Microbiology**, v. 27, p. 979–984, 2010.

VASAVI, H. S.; ARUN, A. B.; REKHA, P. D. Inhibition of *quorum sensing* in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 12, p. 954-959, 2013.

VASCONCELLOS, G. de S. F. M. de; HAMATY, M. H. R. de C.; NASCIMENTO, R. S. do. **Surtos de Salmonelose em Produtos de Origem Aviária**. Gerenciamento em Saúde Animal e Saúde Pública. Universidade de São Paula- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2014.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8-16, 2014.

VIANA, E. de S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotóxicas isoladas de leite**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2006.

VIVIAN, R. C. **Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. Isolada de abatedouro avícola**. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2014.

WANG, C.; YAN, C.; FUQUA, C.; ZHANG, L. H. Identification and characterization of a second quorum-sensing system in *Agrobacterium tumefaciens* A6. **Journal of bacteriology**, v. 196, n. 7, p. 1403-1411, 2014.

WANG, J.; QUAN, C.; WANG, X.; ZHAO, P.; FAN, S. Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on *N*-acyl homoserine lactones. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 479–490, 2011.

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.; DO NASCIMENTO, V. P.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B. The use of vortex and ultrasound techniques for the in vitro removal of *Salmonella* spp. Biofilms. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1332, 2015.

WHITE, C. E.; WINANS, S. C. Cell–cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1483, p. 1135-1148, 2007.

WIRTANEN, G.; ALANKO, T.; MATILLA- SANDHOLM, T. Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**. v. 5, n. 6, p. 319-326, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Campylobacter. 2011** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 05 set. 2015

YANG, Q.; DEFOIRDT, T. *Quorum sensing* in *Vibrio harveyi* positively regulates flagellar motility, an essential virulence factor. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 960–968, 2015.

YANG, Q.; HAN, Y.; TINH, N. T. N.; HIEN, N. T.; BOSSIER, P. Detection of *quorum sensing* signal molecules in *Edwardsiella ictaluri* Ei-151. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 4, p. 581-586, 2012.

YARON, S.; RÖMLING, U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. **Microbial Biotechnology Special Issue**, v. 7, p. 496–516, 2014.

YIN, W-F.; PURMAL, K.; CHIN, S.; CHAN, X-Y.; KOH, C-L.; SAM, C-K.; CHAN, K-G. *N*-Acyl Homoserine Lactone production by *Klebsiella pneumoniae* isolated from human tongue surface. **Sensors**, vol. 12, p. 3472-3483, 2012.

ZAN, J.; LIU, Y.; FUQUA, C.; HILL, R. T. Acyl-homoserine lactone *quorum sensing* in the *Roseobacter clade*. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 1, p. 654-669, 2014.

ZHANG, P.; SHEN, Y.; GUO, J. S.; LI, C.; WANG, H.; CHEN, Y. P.; FANG, F. Extracellular protein analysis of activated sludge and their functions in wastewater treatment plant by shotgun proteomics. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

ZHAO, T.; DOYLE M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3996–4003, 2004.

ZHOU, L.; XIA, S.; ZHANG, Z.; YE, B.; XU, X. GU, Z.; WANG, X. Effects of pH, temperature and salinity on extracellular polymeric substances of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with *N*-(3-Oxooctanoyl)-L-Homoserine Lactone addition. **Journal of Water Sustainability**, v. 4, n. 2, p. 91-100, 2014.

APÊNDICE A – Artigo científico

Temperaturas de refrigeração propiciam maior formação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) em biofilmes multiespécies

N. S. M. de Aquino¹, L. B. Rodrigues¹, B. Webber², S. Gehlen²

¹- Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Passo Fundo, Brasil.

²- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

A formação de biofilmes na indústria de alimentos ocorre principalmente nas superfícies de equipamentos e utensílios. Os biofilmes proporcionam aos microrganismos maior proteção frente à ação de sanitizantes, dificultando a higienização. Objetivou-se avaliar a quantificação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e os efeitos dos tratamentos de higienização em biofilmes multiespécie. Os resultados demonstraram que todos os microrganismos foram capazes de aderir às superfícies analisadas, com exceção do *C. jejuni*. Os polímeros propiciaram maior adesão que o aço inoxidável e houve habilidade de formação de biofilmes em temperaturas de refrigeração. A quantificação de EPS foi maior em temperaturas críticas, provavelmente por ser utilizado como barreira contra o estresse térmico. Notou-se que a água a 85°C e o hipoclorito de sódio a 2% foram eficazes no rompimento da matriz, com menor quantificação de EPS após o uso da água a 85°C. Os dados obtidos reforçam a importância do estudo de biofilmes para auxiliar a indústria, destacando os pontos cruciais que devem ser trabalhados a fim de evitar a contaminação de alimentos. A modificação de superfícies pode ser uma estratégia para inibir a adesão microbiana, já que o polietileno, o poliuretano e o aço inoxidável, obtidos diretamente de abatedouro de aves, possibilitaram elevada quantificação.

Palavras-chave: Alimentos. Aves. Biofilme. EPS. Higienização. *Quorum sensing*.

INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes nos equipamentos e nos utensílios é uma das principais causas responsáveis pela contaminação dos alimentos no ambiente de processamento. Biofilmes são definidos como comunidades microbianas, compostas por seres da mesma espécie (monoespécie) ou de espécies diferentes (multiespécies), envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), aderidas a superfícies bióticas ou abióticas. Essa matriz confere ao biofilme uma estrutura tridimensional e proporciona resistência à ação de antibióticos e sanitizantes. Isso contribui para que as células sésseis sejam de 500 (COSTERTON et al., 1995) a 1000 (DRENKARD, 2003) vezes mais resistentes que as células planctônicas. Assim, comunidades bacterianas tornam-se ainda mais difíceis de eliminar durante os processos de higienização na indústria.

O Brasil, por ser o maior exportador de carne de aves, precisa manter os padrões de higiene e qualidade como prioridades na indústria avícola (ABPA, 2016). Apesar dos controles estabelecidos, casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido reportados com relação ao consumo de frango, ovos e subprodutos. Dentre os principais microrganismos envolvidos estão *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni*. Além destes, os microrganismos *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* também têm sido isolados de abatedouros avícolas. No ambiente de processamento, se as condições forem favoráveis, estes microrganismos poderão estar aderidos às superfícies formando biofilmes monoespécies ou multiespécies. Geralmente, devido à variedade de microrganismos encontrados nas diversas matrizes alimentares, na indústria ocorre em sua maioria, a formação de biofilmes multiespécies. A interação entre os microrganismos torna os estudos sobre as comunidades mistas mais complexos. As cepas envolvidas, os tipos de superfícies e as condições ambientais são fatores que afetam a formação de biofilmes.

Partindo do pressuposto que estes microrganismos estariam formando biofilmes no ambiente avícola, objetivou-se induzir a formação de biofilmes multiespécies em três superfícies diferentes. Avaliou-se, nestes biofilmes, a quantificação de EPS e os efeitos dos processos de higienização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Universidade de Passo Fundo, nos laboratórios de Fermentações e Aulas Práticas do Curso de Engenharia de Alimentos, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada do PPGBioexperimentação e no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário.

Amostras para formação de biofilmes multiespécies

Os microrganismos selecionados, bem como suas origens e fontes, estão dispostos no Quadro 1. *Campylobacter jejuni* estava estocado em caldo Bolton com 20% de glicerol e os demais em Caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol. Os microrganismos foram reativados e a suas purezas foram verificadas através de isolamento em meio seletivo e testes bioquímicos específicos.

Quadro 1- Microrganismos selecionados para a formação de biofilmes mono e multiespécies.

Microrganismo	Características
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Origem: Proveniente de surtos de infecção alimentar SE 24 - coprocultura de paciente envolvido em surto de DTA. Fonte: (OLIVEIRA et al., 2015)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Origem: Superfícies de abatedouro avícola L4 - isolada de superfície de esteiras de transporte de poliuretano após tratamento com água quente. Fonte: (RODRIGUES et al., 2013)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Origem: Provenientes de abatedouro avícola CJ134 - isolada de carcaça após pré-resfriamento após imersão. Fonte: (PERDONCINI, 2015)
<i>Escherichia coli</i>	Origem: Superfícies de abatedouro avícola C7 - isolada de superfície de esteiras de transporte de poliuretano após tratamento com água quente. Fonte: (RODRIGUES, 2010)

Formação de biofilmes multiespécies

Os tempos de incubação para a formação dos biofilmes (4, 12 e 24 horas) simulam os períodos de higiene pré-operacional e operacional em abatedouros de aves. As superfícies utilizadas como corpos de prova foram cupons de aço inoxidável AISI 316, poliuretano e polietileno, confeccionados nas dimensões de 1 cm x 1 cm e 0,1 cm (espessura), com área de 1 cm². Os materiais utilizados para elaboração dos cupons foram obtidos do ambiente de processamento de cortes de aves. Antes dos ensaios de formação dos biofilmes, os corpos de prova foram submetidos aos seguintes procedimentos: limpeza manual com auxílio de esponja, água e detergente neutro líquido; enxágue com água destilada; imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora em temperatura ambiente; enxágue com água destilada e esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Após as etapas de higienização, os corpos de prova foram imersos em microplacas de 12 poços contendo 3 mL de Caldo Triptona de Soja sem glicose (TSB w/o Dextrose) e aproximadamente 10³ UFC/mL de culturas individuais de cada microrganismo. A população inoculada foi verificada, em todos os experimentos, por semeadura em placas contendo Ágar

Padrão para Contagem (PCA) a partir de diluições seriadas decimais. As microplacas foram incubadas a $42\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$, simulando as temperaturas do ambiente de processamento e as temperaturas ótimas dos microrganismos (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; KUSUMANINGRUM et al., 2003).

Tratamento dos cupons após as incubações

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%, por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas.

Avaliação dos procedimentos de higienização

Os cupons livres de células planctônicas foram inoculados em recipientes com 5 mL de água estéril aquecida a 85°C , por 3 minutos, e em solução de hipoclorito de sódio a 2% (Divosan TC 86, *Diversey*®) por 10 minutos, conforme recomendações do fabricante. Após a aplicação dos tratamentos, os cupons foram imersos em 5 mL de Água peptonada 0,1% com neutralizantes (*Tween* 80, lecitina de soja e tiosulfato de sódio) durante 1 minuto, a fim de cessar o efeito dos sanitizantes. Para a desadesão das células sésseis, os cupons foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água peptonada 0,1% e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997; WEBBER, 2015).

Quantificação da formação biofilmes

As quantificações dos biofilmes foram realizadas nos cupons do grupo controle e após os tratamentos de higienização descritos na etapa anterior. Após a desadesão das células sésseis (JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997; WEBBER, 2015), realizaram-se diluições seriadas decimais e o plaqueamento foi pelo método de contagem em gota (*drop-plate*), que consiste na inoculação de cinco gotas de $10\mu\text{L}$ de cada diluição e leitura após 24 horas de incubação a 36°C (MILES & MISRA, 1938). As diluições foram plaqueadas em meios específicos: *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* – mCCDA suplementado para contagem de *C. jejuni*; *Eosin Methylene Blue Agar* – EMB para contagem de *E. coli*; *Xylose Lysine Desoxycholate Agar* – XLD para contagem de *S. Enteritidis*; e *Ágar Listeria Palcam* suplementado, para contagem de *L. monocytogenes*. O mCCDA, foi incubado a 42°C

em microaerofilia, durante 56 horas de incubação. Após o tempo de incubação dos meios, realizou-se a contagem e aplicou-se a seguinte fórmula aos resultados:

$$UFC.cm^{-2}=(VD/VA).M.(D/A) \quad (1)$$

sendo: VD: volume do diluente utilizado (5 mL); VA: volume da alíquota utilizada na inoculação (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 (cm²). Os valores foram expressos em log₁₀.UFC.cm⁻² (CARELI, 2005; GIBSON, 1999, ISO 18593:2012).

Quantificação da produção de EPS

Para a quantificação de EPS utilizou-se o protocolo adaptado de Jin et al. (2013). Após a etapa de sonicação para desadesão dos biofilmes (JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997; WEBBER, 2015), transferiu-se os 5mL de cada tubo para tubos de centrífuga de 50 mL, aquecidos por 15 minutos a 100°C. Após esfriar a temperatura ambiente por 20 minutos, foi adicionado 40 µL de pronase E e incubou-se por 1 h a 37° C. A cada um dos tubos adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético 85% e a mistura foi resfriada em água a 5°C durante 30 minutos. Após esta etapa, centrifugou-se a amostra a 17.000 g durante 20 min, e ao sobrenadante contendo EPS foi adicionado 5mL etanol. A mistura foi mantida a -20°C durante 1 h e em seguida centrifugada a 17.000 g durante 20 minutos novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com dois volumes de 5 mL de etanol a 95% e centrifugado a 17.000 g durante 20 min. O precipitado final foi dissolvido em 1 mL de água destilada estéril e armazenado a -20°C. O total de EPS, expressos em µg/mL, foi estimado em cada amostra pelo método fenol-sulfúrico. Como padrão utilizou-se uma curva de solução de glicose em diferentes concentrações para relacionar com os valores encontrados nas amostras (DUBOIS et al., 1956).

Análise estatística

Os resultados obtidos na quantificação dos biofilmes e do EPS foram analisados por meio da análise de variância e a comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade (p <0.05). A correlação de Pearson foi utilizada para relacionar a produção de EPS e a formação de biofilmes multiespécies. Realizou-se a análise estatística utilizando o software SPSS 23 (IBM, 2015).

RESULTADOS

Média da formação dos biofilmes multiespécies

A formação dos biofilmes multiespécies em todas as condições ambientais testadas, incluindo superfícies, temperaturas e tempos de incubação, foi $7,745 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$. Observou-se diferença estatística em todos os microrganismos testados (Tabela 1). O microrganismo *S. Enteritidis* (SE24) destacou-se como a cepa mais formadora de biofilmes. Não observou-se crescimento da cepa CJ134 em nenhuma das condições avaliadas.

Tabela 1. Formação de biofilmes multiespécies por *S. Enteritidis* (SE24), *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7) e *C. jejuni* (CJ134) em todas as superfícies, tempos e condições ambientais testadas. Média das triplicatas.

CEPA	ORIGEM	MÉDIA DE FORMAÇÃO*
L4	Superfície de indústria avícola	1,413 ^a
C7	Superfície de indústria avícola	2,826 ^b
SE24	DTA	3,505 ^c
CJ134	Carcaça de frango após resfriamento	0,000 ^{d#}
TOTAL		7,745

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). * Resultados em $\log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$. # Não foi detectado nos ensaios de quantificação.

Influência das temperaturas na formação dos biofilmes

Conforme a Tabela 2 observa-se que os microrganismos desenvolveram-se semelhante nas temperaturas avaliadas. *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7) multiplicaram-se estatisticamente iguais em 9°C e 36°C. A 25°C e 42°C não houve diferença entre a formação de biofilmes das cepas *S. Enteritidis* (SE24) e *E. coli* (C7). *L. monocytogenes* (L4) não foi detectada a 3°C, e a 36°C ocorreu a maior produção de biofilmes. Não foi possível quantificar o microrganismo *C. jejuni* (CJ134).

Tabela 2. Formação de biofilmes multiespécies pelas cepas de *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7) e *S. Enteritidis* (SE24) e *C. jejuni* (CJ134), em todas as superfícies e tempos testados, nas diferentes temperaturas de incubação. Médias das triplicatas.

CEPAS	TEMPERATURAS*				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
L4	0,000 ^{aA}	0,274 ^{aA}	1,881 ^{bA}	3,193 ^{cA}	1,717 ^{bA}
C7	0,529 ^{aB}	0,479 ^{aA}	3,568 ^{bB}	4,266 ^{bcA}	5,291 ^{cB}
SE24	1,194 ^{aC}	1,182 ^{aB}	4,520 ^{bB}	5,749 ^{cB}	4,882 ^{bcB}
CJ134	0,000 ^{aA#}	0,000 ^{aA#}	0,000 ^{aC#}	0,000 ^{aC#}	0,000 ^{Ac#}
TOTAL	1,723	1,935	9,969	13,208	11,890

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). *Resultados em \log_{10} .UFC.cm². # Não foi detectado nos ensaios de quantificação.

Influência das superfícies na formação dos biofilmes

Observou-se a adesão dos microrganismos em todas as superfícies testadas. O polietileno e o poliuretano foram as superfícies que proporcionaram maior adesão, como pode ser observado na Tabela 3. O microrganismo *L. monocytogenes* (L4) aderiu sem diferença estatística nestas superfícies. O polietileno foi a superfície de maior adesão para a cepa *E. coli* (C7). Com relação à *S. Enteritidis* (SE24), as taxas de adesão foram iguais em todas as superfícies. Não foi possível quantificar o *C. jejuni* (CJ134).

Tabela 3. Formação de biofilmes multiespécies por *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *S. Enteritidis* (SE24) e *C. jejuni* (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável, sob todas as condições ambientais testadas.

CEPAS	Médias das triplicatas.		
	SUPERFÍCIES*		
	Polietileno	Poliuretano	Aço Inoxidável
L4	2,134 ^{aA}	1,502 ^{aAB}	0,602 ^{bA}
C7	4,220 ^{aB}	2,527 ^{bB}	1,733 ^{bB}
SE24	3,980 ^{aB}	3,476 ^{aC}	3,060 ^{aC}
CJ134	0,000 ^{aC#}	0,000 ^{aD#}	0,000 ^{aA#}
TOTAL	10,334 a	7,506 ab	5,394 b

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). * Resultados em \log_{10} .UFC.cm². # Não foi detectado nos ensaios de quantificação.

Os resultados da quantificação do EPS nos biofilmes multiespécies antes da higienização podem ser observados nas Tabelas 4, 5 e 6.

O polietileno foi a superfície que possibilitou maior produção de EPS, principalmente na temperatura de 3°C, após 4 e 12 horas, e de 9°C após 24 horas de incubação. O poliuretano e o aço inoxidável foram iguais estatisticamente na maioria das condições. No aço inoxidável destaca-se a temperatura de 25°C após 4 horas de incubação (139,898 $\mu\text{g/mL}$).

Comparação entre a quantificação de EPS nos biofilmes antes e após a higienização dos cupons

Após a higienização dos cupons houve diminuição na quantificação do EPS (Tabela 7), com diferença entre os tratamentos de higienização, apresentando menos EPS após o tratamento com água quente.

Tabela 7. Comparação entre a quantificação de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies antes e após as higienizações. Sob todas as condições de tempo, temperatura e superfícies testadas.

	TRATAMENTOS		
	Antes do Tratamento	Hipoclorito de Sódio	Água quente 85°C
TOTAL	47,600±55,227 a	33,861±9,147 b	30,738±10,764 c

Tabela 4. Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 04 horas de incubação.

SUPERFÍCIES	TEMPERATURAS				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
PE	349,974 aA	14,761 bA	9,265 bA	13,625 bA	23,189 bA
PU	31,471 aB	30,481 aB	39,349 bA	36,051 abB	39,752 bB
INOX	42,280 aB	36,271 aB	139,898 bB	33,376 aB	32,973 aC

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

PE: Polietileno, PU: Poliuretano, INOX: Aço Inoxidável

Tabela 5. Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 12 horas de incubação.

SUPERFÍCIES	TEMPERATURAS				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
PE	136,784 aA	45,578 bA	43,526 bA	55,106 cA	32,716 dA
PU	33,742 aB	43,013 bAB	28,649 aB	29,089 aB	14,541 cB
INOX	31,654 aB	40,705 aB	57,158 bC	31,727 aB	37,590 aC

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

PE: Polietileno, PU: Poliuretano, INOX: Aço Inoxidável

Tabela 6. Produção de EPS ($\mu\text{g/mL}$) nos biofilmes multiespécies formados em polietileno, poliuretano e aço inoxidável nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36° e 42°C após o período de 24 horas de incubação.

SUPERFÍCIES	TEMPERATURAS				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
PE	60,089 aA	99,004 abA	49,316 aA	30,958 aA	63,717 abA
PU	33,706 aB	27,000 bB	32,826 aB	50,195 cB	36,564 aB
INOX	34,146 aB	36,857 aB	31,361 acB	39,935 aAB	11,134 bC

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

PE: Polietileno, PU: Poliuretano, INOX: Aço Inoxidável

Relação entre a produção de EPS antes do tratamento e a formação de biofilmes multiespécie

Conforme a Tabela 8, podemos observar que os coeficientes de correlação linear de Pearson entre as quantificações de EPS e biofilmes multiespécies com 4 e 12 horas foi negativa, demonstrando que, à medida que o número de UFC nos biofilmes aumentou, a quantidade de EPS foi diminuindo. O R^2 corrobora esta relação fraca, indicando que cerca de 95% da variabilidade do EPS deve ser explicada por outros fatores que não a formação de biofilmes. Com 24 horas a correlação foi muito próxima de zero ($r=0,0840$), demonstrando que não existe relação entre as variáveis.

Tabela 8. Comparação entre a quantificação de EPS e a formação de biofilmes multiespécies sob todas as condições de tempo, temperatura e superfícies testadas.

	TEMPO	r	R^2
FORMAÇÃO DE BIOFILMES	4 horas	- 0,2360	5,57%
	12 horas	- 0,2300	5,29%
	24 horas	0,0840	0,71%

Legenda: r^* = coeficiente de correlação de Pearson; R^{**} = coeficiente de determinação.

DISCUSSÃO

Para os microrganismos as vantagens da formação de biofilmes são inúmeras. Dentre elas pode-se citar: proteção contra antibióticos (MARQUES et al., 2017), sanitizantes (RYU; BEUCHAT, 2005; WANG et al.; 2014) e ambientes dinâmicos (SCHAEFFER et al., 2016; SEGHIR et al., 2017). A presença de biofilmes na indústria de alimentos está relacionada principalmente à adesão dos microrganismos em superfícies abióticas. Estas entram em contato com as matérias-primas e/ou alimentos processados. Neste ambiente, as comunidades nos biofilmes são, em sua maioria, formadas por numerosas espécies de microrganismos constituindo, assim, biofilmes multiespécies. Isso ocorre devido à grande quantidade de matérias-primas utilizadas e às cargas microbianas presentes nestas matérias-primas (GIAOURIS et al., 2014).

A formação de biofilmes multiespécie em nosso trabalho, em todas as condições ambientais testadas, incluindo superfícies, temperaturas e tempos de incubação foi $7,745 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Para Ronner e Wong (1993), considera-se biofilme um número mínimo de 10^3 UFC ($3 \log_{10} \text{UFC}$) aderidas por cm^2 . *S. Enteritidis* (SE24) foi a bactéria mais formadora de biofilme. A produção de biofilmes é um dos mecanismos mais importantes para adaptação dos

microrganismos em condições adversas (LIRA et al., 2016). Segundo Forsythe (2013) a temperatura ótima de multiplicação da *Salmonella* está em torno de 38°C e a mínima 5°C. No entanto, nesta pesquisa houve formação de biofilme a 3°C (abaixo da temperatura mínima de crescimento estabelecida na literatura) e a 9°C. Silva (2014) constatou em seu trabalho que a SE24 possui os genes *spiA* e *agfA* em seu perfil genético, que estão envolvidos na formação de biofilmes e também na virulência da *S. Enteritidis* (DONG et al., 2011).

A presença de biofilmes nas diversas superfícies sob temperaturas de refrigeração revela um problema para a indústria de alimentos, pois microrganismos sabidamente mesófilos, como *Salmonella* e *Escherichia* (FORSYTHE, 2013; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014) conseguiram, através do biofilme, garantir sua sobrevivência em baixas temperaturas. Zhou et al. (2014) estudaram os efeitos do pH, da temperatura e da salinidade sobre o EPS de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, e observaram uma maior formação de biofilmes em temperaturas inferiores à temperatura ótima de crescimento da bactéria. Segundo os autores o biofilme pode ser formado a baixa temperatura, pois o microrganismo “entendeu” que a aglomeração em colônias seria a melhor prevenção contra o estresse ambiental. Na indústria avícola isso significa possibilidade de crescimento durante o resfriamento de carcaças, como a água do *chiller* nos tanques de aço inoxidável.

O *Campylobacter jejuni* (CJ134) foi o único microrganismo que não formou biofilme em nenhuma das condições de tempo, superfície e temperaturas testados. Vários estudos tem demonstrado a capacidade deste microrganismo formar biofilmes em diversas temperaturas e tempos (KALMOKOFF, 2006; ICA et al., 2012; NGUYEN; TURNER; DYKES, 2010). O fato de não conseguirmos quantificá-lo neste trabalho pode ser devido ao microrganismo ser fastidioso e levar desvantagem em comparação às outras cepas. Acredita-se que, devido às condições adversas, as células adquiriram a forma cocoide, sendo denominadas “viáveis, mas não cultiváveis” (VBNC). Por isso, não pode ser excluída a capacidade do *C. jejuni* conseguir formar biofilme em interação com os demais microrganismos. Existe a possibilidade do mesmo ter adotado um estado VBNC, que impede sua quantificação por técnicas tradicionais. *L. monocytogenes* é um patógeno psicrófilo e está normalmente envolvido em surtos ocasionados pelo consumo de alimentos refrigerados (GARRIDO; GARCÍA-JALÓN, 2010). No entanto, em nosso trabalho, houve dificuldade de formação de biofilme por este patógeno em temperatura de refrigeração. Moltz e Martin (2005) avaliaram a influência da temperatura (4°C, 20°C e 37°C) na formação de biofilmes por *L. monocytogenes* estirpe LCDC. Foi demonstrada a capacidade de adesão ao aço inoxidável em todas as temperaturas testadas. Contudo, notou-se que, após 20 h de incubação a 20°C ou 37°C, a densidade celular foi de aproximadamente

10^6 e, somente após 4 dias de incubação a 4°C, a densidade celular foi de 10^5 UFC por cupom. Isto demonstra que, apesar de ter ocorrido formação de biofilme a baixa temperatura, necessitou maior tempo de incubação para que a quantificação desse microrganismo fosse semelhante às temperaturas mais elevadas. Este fato pode estar relacionado à fase de adaptação do microrganismo às temperaturas mais baixas, necessitando de um tempo maior na fase lag antes de produzir biofilmes. Zhao, Doyle e Zhao (2004) observaram também que, quando associados a outros microrganismos em exclusão competitiva, em biofilmes em aço inoxidável, a *L. monocytogenes* leva desvantagem em temperaturas de refrigeração.

Schaeffer et al. (2016) afirma que a composição do biofilme varia com a estirpe e com as condições ambientais. Até o presente momento não havia sido estudada a interação entre os quatro microrganismos que utilizamos. A comunidade bacteriana em biofilme é uma estrutura heterogênea que possui zonas mais ou menos habitadas pelas bactérias e com diferentes densidades de matriz. Assim, existem áreas com maior ou menor disponibilidade de nutrientes. Este fator pode ter favorecido um desenvolvimento mais expressivo de certas bactérias em relação às outras (CERCA; JEFFERSON, 2012).

Neste trabalho todas as superfícies foram passíveis de adesão bacteriana. Os polímeros foram as superfícies que proporcionaram maior adesão. A SE24 aderiu sem diferença estatística em todas as superfícies estudadas, e as demais bactérias diferiram quanto à adesão em pelo menos uma das superfícies.

Diversos trabalhos tem demonstrado a adesão de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em condições similares às executadas nesta pesquisa, reforçando a capacidade destes microrganismos patogênicos aderirem em superfícies de grande importância para a indústria de alimentos.

As propriedades do material (topografia da superfície, rugosidade, química e energia de superfície), as características das bactérias (carga superficial, hidrofobicidade e apêndices) e o ambiente circundante (tipo de meio, temperatura, pH, tempo de exposição e concentração bacteriana) são responsáveis pelas diferenças na adesão às superfícies por parte dos microrganismos (AZEREDO, HENRIQUES, NOVELLO, 2012; HOCEVAR et al., 2014). Além das próprias características intrínsecas ao microrganismo e à natureza da superfície, já foi demonstrado que, em biofilmes multiespécies, os microrganismos possuem taxas de adesão diferentes que quando em biofilme monoespécie. Essa interação adiciona uma camada extra de complexidade na composição, desenvolvimento da estrutura e fenótipos destes tipos de biofilmes (ALMEIDA; AZEVEDO, 2014).

Durante a formação de biofilmes multiespécies, três situações podem ocorrer: diminuição na taxa de adesão quando comparado ao biofilme monoespécie, aumento da adesão em relação à cultura pura e nenhuma modificação na taxa de adesão. A ocorrência de um destes fatos dependerá dos microrganismos envolvidos e das superfícies de adesão (McEldowney e Fletcher, 1987). Quando vários microrganismos interagem na matriz do biofilme, como em nosso trabalho, a estrutura, a função da comunidade e outros mecanismos aumentam a complexidade, em comparação com biofilmes de uma única estirpe (SANCHEZ-VIZUETE et al., 2015).

A produção de EPS foi avaliada nos biofilmes multiespécies em 4, 12 e 24 horas de incubação. Os EPS são formados por inúmeras substâncias orgânicas, sendo as principais carboidratos, proteínas, substâncias húmicas, ácidos urônicos e ácidos nucleicos. Dentre os constituintes, os carboidratos apresentam-se em maior volume (SUTHERLAND, 1997; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Nesta pesquisa avaliou-se a presença de carboidratos como constituinte majoritário do EPS formado nos biofilmes multiespécies.

O papel da matriz de EPS nos biofilmes monoespécies tem sido bastante explorado pela comunidade acadêmica. No entanto, pouco se sabe sobre sua função no desenvolvimento de comunidades mistas. Para esses biofilmes, a organização das diferentes espécies pode ser importante para a função da comunidade e, portanto, a matriz desempenha um papel vital na sua organização estrutural (PERIASAMY et al., 2015).

Os resultados da produção de EPS nos biofilmes multiespécies, submetidos a diferentes temperaturas, estão dispostos nas Tabelas 09, 10 e 11. Notou-se que, em relação às temperaturas, o polietileno foi a superfície onde houve maior destaque na quantificação de EPS. Uma maior expressividade na produção de EPS provavelmente está relacionada à maior formação de biofilmes observada nesta superfície.

A hidrofobicidade do material em contato com as bactérias contribui para que as mesmas adiram de forma diferente entre as superfícies. Esta é a primeira fase da formação do biofilme, denominada adesão reversível. Após a fase de interação entre o microrganismo e a superfície, inicia-se a segunda fase da formação do biofilme, onde ocorre a excreção de substâncias poliméricas extracelulares, e a adesão se torna irreversível. A matriz de EPS reforça as interações dos microrganismos entre si e entre as superfícies inicialmente aderidas, contribuindo, assim, na formação da microcolônias nas superfícies (COSTERTON et al., 1995).

Segundo Ghaffoor, Hay e Rehm (2011) o aumento na produção de EPS intensifica as interações célula-célula, bem como aumento da biomassa do biofilme. Logo, a produção de polissacarídeos de uma espécie individual tem um impacto significativo no desenvolvimento

dos biofilmes multiespécies e nas propriedades de tais comunidades (SARAVANAN et al., 2015).

Notou-se que não houve um padrão entre as temperaturas, superfícies e produção EPS. Destacando-se as temperaturas de 3°C e 9°C nas superfícies de polietileno e poliuretano. De acordo com Myszka e Czaczyk (2011), a temperatura é um dos fatores determinantes na síntese de EPS, juntamente com o fornecimento de carbono e/ou nitrogênio, valor de pH, limitação de oxigênio e estágio de crescimento celular.

A maior produção de EPS observada nas temperaturas de refrigeração pode estar relacionada ao fato de que uma das principais funções da matriz é proteger as células bacterianas contra condições ambientais estressantes. Logo, a sua expressão “*in vitro*” é favorecida quando o meio é pobre em nutrientes e/ou a temperatura não é a ótima para o crescimento da espécie (SEBASTIÃO, 2010). Segundo Kokare et al. (2009) a matriz funciona como abrigo e barreira térmica para as bactérias que residem no biofilme, reduzindo assim, o estresse ambiental direto sobre as mesmas.

No aço inoxidável, nas primeiras horas de incubação dos cupons, houve maior produção de EPS a 25°C. Após o tempo máximo de incubação (24 horas) não houve diferença significativa entre as temperaturas. Acredita-se que, por ser o aço inoxidável uma superfície mais difícil de aderir, foi necessária uma maior produção de EPS mesmo sem estar em uma temperatura crítica.

Na maioria dos casos, as temperaturas mais altas obtiveram menor produção de substância polimérica extracelular. Considera-se que, por estarem numa faixa ótima de crescimento dos microrganismos utilizados no presente experimento, as bactérias “consideraram” que não havia necessidade de produzir um EPS muito espesso, já que as condições ambientes não estavam adversas para o crescimento. Para Nevot et al. (2008) o rendimento de EPS foi máximo em temperaturas de incubação inferiores a 10°C. Na temperatura ótima de crescimento dos microrganismos estudados (18°C), a quantidade de EPS produzida foi quatro vezes menor do que em temperaturas subótimas, sendo a produção de EPS desprezível em temperaturas acima de 25°C.

Diversos trabalhos têm observado a produção de EPS aumentada em temperaturas subótimas de crescimento dos microrganismos, enfatizando o papel crioprotetor dos mesmos (GORRET et al., 2001; NICHOLS, BOWMAN e GUEZENEC, 2005). Sutherland (1972) afirma que com a diminuição da temperatura, a taxa de crescimento e a biossíntese da parede celular diminuem, ocasionando num aumento na disponibilidade de moléculas precursoras para

a biossíntese de EPS. Este mecanismo explicaria a formação de EPS em temperaturas adversas para o crescimento dos microrganismos.

Observou-se que houve uma tendência na diminuição do EPS ao decorrer do tempo de incubação. Possivelmente isto ocorreu pelo fato de que, com o passar do tempo, as células se multiplicaram, acarretando uma escassez de alimentos, sendo necessária a utilização da matriz como fonte de nutrientes. Quando isto ocorre, proteínas com atividade enzimática são liberadas no interior do biofilme, hidrolisando os biopolímeros em pequenos produtos, que são absorvidos e utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos (AZEREDO; CERCA, 2012; ZANGH et al., 2015).

Não foi possível esclarecer a relação entre as superfícies, temperaturas e produção da matriz extracelular. Biofilmes multiespécies são complexos, e as diversas condições aos quais os microrganismos são expostos afetam de forma significativa a matriz e a estrutura do biofilme. Diferenças estruturais entre proteínas e polissacarídeos afetam na hidrofobicidade e hidrofiliabilidade da matriz, sugerindo uma influência durante a adesão das células às superfícies (HOOD; ZOTOLLA, 1995; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Deve-se salientar que a análise do EPS realizada nesta pesquisa foi em relação ao constituinte carboidrato. Não pode ser descartada a possibilidade de que, em certas temperaturas e superfícies, poderia haver outros componentes em maior expressão e que não foram quantificados pela metodologia empregada.

Fagerlund et al. (2016) avaliaram a formação de biofilmes e a composição da matriz polimérica extracelular de *Staphylococcus* spp. associadas à alimentos. Foram identificadas 8 estirpes formadoras de biofilmes, *S. capitis* (2), *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. lentus* (2), e *S. saprophyticus* (2). Destas, três produziram EPS majoritariamente de carboidratos e cinco produziram EPS majoritariamente formados por proteínas, sendo as primeiras mais tolerantes ao efeito do cloreto de benzalcônio tanto em suspensão quanto em biofilme. Os autores concluíram, então, que a matriz do biofilme de *Staphylococcus* spp. associados a alimentos variam em relação à natureza (proteína ou polissacarídeo), e isso pode afetar a sensibilidade em relação ao desinfetante utilizado. Ou seja, em um mesmo gênero pode haver diferença entre a composição do EPS.

Neste trabalho, avaliaram-se indiretamente dois métodos de sanitização, um método físico através da utilização da água aquecida a 85°C e um método químico através da utilização do hipoclorito de sódio a 2%. Os trabalhos que visam avaliar a eficácia dos sanitizantes frente aos biofilmes microbianos geralmente quantificam a população sobrevivente aos sanitizantes após os tempos de exposição (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; PAN et al., 2006; PAK; CHEN,

2015; OLIVEIRA, 2015; WEBBER, 2015; GEHLEN, 2016). Neste projeto, para este fim, quantificou-se o EPS restante após os tratamentos de sanitização. A diminuição do EPS pós-tratamento em comparação com o controle indicaria que os tratamentos foram capazes de romper a matriz e, possivelmente, teriam entrado em contato com as comunidades multiespécies. Observou-se, após os tratamento com água quente a 85°C e hipoclorito de sódio a 2%, diminuiu-se a quantificação do EPS. A maior redução obtida foi após a exposição dos cupons em água a 85°C.

Na indústria avícola, água quente a 85°C é utilizada para higiene operacional de utensílios, como facas de corte (BRASIL, 1998). Vários trabalhos tem demonstrado que este procedimento é eficaz na remoção dos biofilmes (OLIVEIRA, 2015; WEBBER, 2015). Segundo Andrade (2008), a letalidade da água quente frente aos microrganismos consiste na alteração de DNA e RNA, e no extravasamento dos constituintes do citoplasma devido a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática.

No trabalho realizado por Charlebois et al. (2017) verificou-se que o tipo de biofilme, se em comunidades simples ou mistas e a forma de incubação dos mesmos, anaerobiose ou aerobiose, refletem na eficiência dos sanitizantes frente as comunidades sésseis. Os autores investigaram a eficiência do hipoclorito de sódio, monopersulfato de potássio, cloreto de amônia quaternária, peróxido de hidrogênio e glutaraldeído em biofilmes monoespécie de *Clostridium perfringens* ou dupla espécie com *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*. Constatou-se que o hipoclorito de sódio foi o sanitizante mais eficaz nos biofilmes monoespécies. Em geral, comparando-se os biofilmes monoespécie e dupla espécie, notou-se que os biofilmes monoespécies eram mais tolerantes aos sanitizantes testados. Quanto à forma de incubação, biofilmes monoespécie cultivados em anaerobiose, foram mais tolerantes ao hipoclorito de sódio e ao cloreto de amônia quaternária do que os biofilmes dupla espécie com *S. aureus* ou *E. coli*. Assim, em nesta investigação, pode-se justificar o fato de que, apesar do hipoclorito de sódio ter rompido a matriz, sua eficiência foi menor que a água a 85°C, já que o trabalho de Charlebois et al. (2017) demonstra uma menor eficiência do mesmo em biofilmes multiespécies.

A diferença na eficácia dos sanitizantes pode estar relacionada aos diferentes mecanismos de adesão. As bactérias que formam biofilmes produzem uma matriz extracelular que é na maioria das vezes de natureza polianiónica. Segundo Kumar e Anand (1998), o cloro é citado como um dos desinfetantes capaz de despolimerizar o EPS, facilitando o desprendimento dos biofilmes das superfícies. Os fatores que afetam a

eficiência do cloro na penetração dos biofilmes são a retenção de matéria orgânica e mineral na matriz extracelular (SAMRAKANDI; ROQUES; MICHEL, 1997).

Um estudo realizado por Samrakandi, Roques e Michel (1997) demonstrou que a eficiência do cloro varia de acordo com a composição do EPS. E que o meio de cultura influencia na composição da matriz. Observou-se menor eficiência do cloro nos biofilmes formados em meio com sacarose e glicerol, possivelmente pela maior produção de polissacarídeos observada nestes meios.

Quanto mais substâncias orgânicas no EPS, maior será a reação do cloro com estas e menor será a quantidade de cloro disponível para desinfecção. Apesar dos métodos de desinfecção utilizados neste trabalho demonstrarem que houve rompimento da matriz polimérica extracelular, acredita-se que, caso não haja remoção total desta matriz nas superfícies, ela servirá como nova fonte de adesão, facilitando a aderência de outros microrganismos e incentivando a formação de novos biofilmes (GIBSON et al., 1999; LOMANDER et al., 2004).

A escolha do método adequado para sanitização na indústria de alimentos deve levar em consideração as características dos microrganismos frequentemente encontrados no ambiente. A combinação de métodos físicos e químicos pode ser uma boa alternativa para englobar a variedade de microrganismos presentes nos biofilmes multiespécies.

O estudo da formação de biofilmes multiespécies e das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), bem como formas de higienização de superfícies, é de fundamental importância para a indústria produtora de alimentos. *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* formaram biofilmes em todas as condições propostas, com exceção da *L. monocytogenes*, que não formou biofilmes a 3°C. A capacidade destes microrganismos, considerados mesófilos, se desenvolverem e aderirem em temperaturas próximas a 0°C corrobora a importância dos biofilmes para sobrevivência em ambientes adversos. Os polímeros foram as superfícies com maior adesão pelos microrganismos em biofilmes multiespécies, e o polietileno propiciou maior produção de EPS, principalmente nas temperaturas de refrigeração.

Os resultados observados em nosso trabalho são relevantes para a indústria de alimentos, uma vez que superfícies de ampla utilização em utensílios e equipamentos foram facilmente aderidas por microrganismos. Isso pode acarretar a contaminação dos alimentos e perigo à saúde do consumidor, sendo tanto um problema para a saúde pública como prejuízos econômicos à indústria. As interações ocorridas nos biofilmes multiespécies devem ser melhor esclarecidas, a fim de se aprimorar o controle durante a higienização na indústria alimentícia.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) que financiou um projeto maior, no qual este estudo está inserido, sob Edital Fapergs n. 01/2013, Programa Pesquisador Gaúcho - PQG, termo de outorga 1997-2551/13-2SIAFEM.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual de 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf> Acesso em: 09 fev. 2017

ALMEIDA, C.; AZEVEDO, N. F. Multi-species biofilms. *In* PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; CERCA, N.; AZEREDO, J. **Clinical Biofilms – Current Concepts and Advanced Techniques**, Braga (Portugal): Universidade do Minho – DEB, 2014. ISBN: 978-989-97478-4-5, p. 63-75, 2012.

ANDRADE, N. J. de. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.

AZEREDO, J.; CERCA, N. A matriz dos biofilmes: o truque para sobreviver nas mais hostis condições ambientais. *In*: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. F. **Biofilmes na saúde, no ambiente e na indústria**. Braga (Portugal): Universidade do Minho, p. 23- 25, 2012.

AZEREDO, J.; HENRIQUES, A.; NOVELLO, J. Adesão microbiana a superfícies bióticas e abióticas. *In*: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. F. **Biofilmes na saúde, no ambiente e na indústria**. Braga (Portugal): Universidade do Minho, p. 279- 286, 2012.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA nº 275, 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**; Brasília, DF, 23 outubro 2003.

- 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.
- CHARLEBOIS, A.; JACQUES, M.; BOULIANNE, M.; ARCHAMBAULT, M. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. **Food Microbiology**, v. 62, p. 32-38, 2017.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, R.; LAPPINSCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- DONG, H.; PENG, D.; JIAO, X. et al. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. **Microbiology**, v. 157, p.1798-1805, 2011.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1213-1219, 2003.
- FAGERLUND, A.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; MIKKELSEN, M. I.; MØRETRØ, T. Biofilm Matrix Composition Affects the Susceptibility of Food Associated Staphylococci to Cleaning and Disinfection Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 856, 2016.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol.** v. 8, p. 623-633, 2010.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- GARRIDO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALÓN, I. The problem of Listeriosis and ready-to-eat products: prevalence and persistence. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Formatex, Badajoz**, p. 1182-1189, 2010.
- GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; 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 Sci.**, v.97, n.3, 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. **J. Appl. Microbiol.**, v. 87, n. 1, p. 41-48, 1999.

GORRET, N.; MAUBOIS, J. L.; ENGASSER, J. M.; GHOUL, M. Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 788- 796, 2001.

HOCEVAR, M.; JENKO, M.; GODECK, M.; DROBNE, D. An overview of the influence of stainless-steel surface properties on bacterial adhesion. **Materiali in tehnologije**, v. 48, n. 5, p. 609-617, 2014.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food control**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.

IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.

ICA, T.; CANER, V.; ISTANBULLU, O.; NGUYEN, H. D.; AHMED, B.; CALL, D. R.; BEYENAL, H. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. **Appl Environ Microb**, v.78, p.1033–1038, 2012.

IMMIG, J. O. **Higienização na indústria de alimentos**. Trabalho de Conclusão- Curso de graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do SUL- Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2013.

GHAFOOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, n. 15, p. 5238-5246.

GEHLEN, S. S. Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2016.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. 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.

KALMOKOFF, M.; LANTHIER, P.; TREMBLAY, T. L.; FOSS, M.; LAU, P. C.; SANDERS, G.; AUSTIN, J.; KELLY, J.; SZYMANSKI, C. M. Proteomic Analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 Biofilms Reveals a Role for the Motility Complex in Biofilm Formation. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 12, p. 4312-4320, 2006.

KIM, T. J.; CORBITT, M. P.; SILVA, J. L.; WANG, D. S.; JUNG, Y-S.; SPENCER, B. Optimization of hot water treatment for removing microbial colonies on fresh blueberry surface. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, 2011.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnonology**, v. 8, p. 159-168, 2009.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, 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.

LINDSAY, D.; von Holy, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiol.** v. 14, p. 383-390, 1997.

LIRA, M. C.; GIVISIEZ, P. E. N.; SOUSA, F. G. C. de.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. de.; SPRICIGO, D. A.; GEBREYES, W. A.; OLIVEIRA, C. J. B. de. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. **J Infect Dev Ctries**; v. 10, n. 9, p. 932-938, 2016.

LOMANDER, A.; SCHREUDERS, P.; RUSSEK-COHEN, E.; ALI, L. Evaluation of c lorines' impact on biofilms on scratc ed stainless steel surfaces. **Bioresource Technology**, V. 94, p. 275–283, 2004.

MARQUES, V. F.; MOTTA, C. C. da; SOARES, B. da S.; MELO, D. A. de; COELHO, S. de M. de O, COELHO, I. da S.; BARBOSA, H. S.; SOUZA, M. M. S. de. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 118–124, 2017.

McEidowney, S.; Fletcher, M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. **Arch Microbiol**, v. 148, p. 57- 62, 1987.

MENEGARO, A.; FLORES, A. F.; SIMER, P. SILVA, F. I. da; SBARDELOTTO, P. R. R.; PINTO, E. P. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Sci. Agrar. Parana.**, v. 15, n. 2, p. 171-174, 2016.

MOLTZ, A. G.; MARTIN, S. E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 92–97, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7 ed. Ed. Elsevier, 2014.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, n. 1, p. 11-13, 2010.

NEVOT, M.; DERONCELE, V.; MONTES, M. J.; MERCADE, E. Effect of incubation temperature on growth parameters of *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 and its production of extracellular polymeric substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 255–263, 2008.

NGUYEN, V. T.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. Effect of temperature and contact time on *Campylobacter jejuni* attachment to, and probability of detachment from, stainless steel. **J Food Prot.**, v. 73, n. 5, p. 832-838, 2010.

NICHOLS, C. M.; BOWMAN, JOHN P.; GUEZENNEC, J. Effects of incubation temperature on growth and production of Exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71 n. 7, p. 3519-3523, 2005.

OLIVEIRA, A. P. DE.; WEBBER, B.; POTTKER, E. S.; MARTELO, E.; DAROIT, L.; PILOTTO, F.; SANTOS, L. R. DOS.; RODRIGUES, L. B. Adesão e remoção de biofilmes de *Salmonella enteritidis* provenientes de surtos de DTA em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano. In: Simpósio de Alimentos, v. 9, p. 1-6, Passo Fundo. **Anais do IX SIAL 2015**. Disponível em: < <http://www.upf.br/sial/images/anais/2015/tecnologia/t01.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2015

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577-588, 2007.

PAN, Y.; BREIDT, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, n. 12, 2006.

PARK, Y. J.; CHEN, J. Control of the biofilms formed by curli-and cellulose-expressing shiga toxin-producing *Escherichia coli* using treatments with organic acids and commercial sanitizers. **Journal of food protection**, v. 78, n. 5, p. 990-995, 2015.

PERDONCINI, G. **Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em etapas do processamento de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na com ênfase em Sanidade Avícola). Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Porto Alegre, RS, 2015.

PERIASAMY, S.; NAIR, H.; LEE, K. W. K.; ONG, J.; GOH, J. Q. J.; KJELLEBERG, S.; RICE, S. A. *Pseudomonas aeruginosa* PAOI exopolysaccharides are important for mixed species biofilm community development and stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 851, 2015.

PORTARIA nº 210, de 10/ 11/1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento]. **Diário Oficial da União**, 26 nov. 1998b, 1998b. Seção 1, p.226.

RODRIGUES, L. B.; DOS SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; TRENHAGO, G.; DE OLIVEIRA, A. P.; DO 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. 01-07, 2013.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. D.; TAGLIARI, V. Z.; RIZZO, N. N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A. P. D.; NASCIMENTO, V. P. D. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1082-1085, 2010.

RONNER, A.; WONG, A. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, 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.

SAMRAKANDI, M. M.; ROQUES, C.; MICHEL, G. Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 751-758, 1997.

SANCHEZ-VIZUETE, P.; ORGAZ, B.; AYMERICH, S.; LE COQ, D.; BRIANDET, R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 705, 2015.

SCHAEFFER, C. R.; HOANG, T.-M. N.; SUDBECK, C. M.; ALAWI, M.; TOLO, I. E.; ROBINSON, D. A.; HORSWILL, A. R.; ROHDE, H.; FEYA, P. D. Versatility of biofilm matrix molecules in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates and importance of polysaccharide intercellular adhesin expression during high shear stress. **mSphere**, v. 1, n. 5, 2016.

SEBASTIÃO, F. de A. **Isolamento, caracterização bioquímica e molecular por PCR-RFLP e análise dos polissacarídeos produzidos na formação de biofilme de *Flavobacterium columnare* em peixes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP. 2010.

SEGHIR, A.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; SARI-BELKHARROUBI, L.; BOUCHERIT, K. Infectious risk related to the formation of multi-species biofilms (*Candida* – bacteria) on peripheral vascular catheters. **Journal of Medical Mycology**, 2017.

SILVA, C. F. da; GEHLEN, S. S.; WEBBER, B.; DIEDRICH, L. N.; PILOTTO, F.; DOS SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1229, 2014.

SREY, S. JAHID, I. K. HÁ, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. In *Advances in Microbial Physiology* ed. Rose, A.H. and Tempest, D.W. p. 143. London, New York, **Academic Press**, 1972.

WANG, R.; KALCHAYANAND, N.; KING, D. A.; LUEDTKE, B. E.; BOSILEVAC, J. M.; ARTHUR, T. M. Biofilm formation and sanitizer resistance of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from "high event period" meat contamination. **J Food Prot.**, v. 77, n. 11, p.1982-1987, 2014.

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.; DO NASCIMENTO, V. P.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B. The use of vortex and ultrasound techniques for the in vitro removal of *Salmonella* spp. Biofilms. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1332, 2015.

ZHAO, T.; DOYLE M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3996–4003, 2004.

ZHOU, L.; XIA, S.; ZHANG, Z.; YE, B.; XU, X. GU, Z.; WANG, X. Effects of pH, temperature and salinity on extracellular polymeric substances of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with N-(3-Oxooxtanoyl)-L-Homoserine Lactone addition. **Journal of Water Sustainability**, v. 4, n. 2, p. 91-100, 2014.