

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies de *Salmonella* Enteritidis,
Campylobacter jejuni, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de
procedimentos de higienização

Dissertação de Mestrado

Sara Souza Gehlen

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis,
Campylobacter jejuni, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de
procedimentos de higienização

Autora: Sara Souza Gehlen

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na Área de Sanidade Avícola

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento
Coorientadora: Laura Beatriz Rodrigues

Porto Alegre
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Gehlen, Sara Souza

Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies de *Salmonella Enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização / Sara Souza Gehlen.

-- 2016.
105 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.
Coorientadora: Laura Beatriz Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Biofilmes multiespécies na indústria avícola.
2. Procedimentos de higienização. I. do Nascimento, Vladimir Pinheiro, orient. II. Rodrigues, Laura Beatriz, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sara Souza Gehlen

DINÂMICA DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES MULTIESPÉCIES DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS, *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *ESCHERICHIA COLI* E EFEITOS DE PROCEDIMENTOS DE HIGIENIZAÇÃO

Aprovado em

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Membro da Comissão

Profª. Dra. Luciana Ruschel dos Santos

Membro da Comissão

Dedico esta dissertação à minha querida coorientadora, Professora Laura Beatriz Rodrigues, e também dedico ao meu namorado Paulo, amado companheiro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, pelas bênçãos de proteção, força, coragem e decisão, ao longo de toda minha vida, que me impulsionaram a concluir esta etapa.

Agradeço à minha amada família, pai, mãe e manas, que me apoiaram na decisão desta escolha e rezaram para que eu superasse todos os desafios.

Agradeço ao meu namorado, Paulo, por me apoiar do início ao fim deste projeto. Agradeço, de coração, por todas as palavras de incentivo e calma, por todo companheirismo, carinho e amor, que muito foram responsáveis por me motivar a seguir em frente.

Agradeço ao meu orientador, Professor Vladimir Pinheiro do Nascimento, por conceder a oportunidade de participar deste projeto de mestrado e pela confiança para que esse projeto fosse realizado.

Agradeço à minha coorientadora, professora Laura Beatriz Rodrigues, pela eterna orientação, desde a iniciação científica, graduação, até a esta etapa de mestrado. Sou eternamente grata por todo apoio, conselhos, preocupação, incentivo, amizade, carinho e compreensão, pelos momentos sérios até os momentos de descontração, como nas tradicionais festas juninas na casa da Prô Laura, pelo exemplo de pessoa acolhedora e profissional dedicada; tudo isso, foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Sou grata à Universidade de Passo Fundo pela oportunidade de realizar a etapa de experimentação em sua sede. Grata também à equipe GEMicro da UPF, da qual tive o prazer de participar. Meu muito obrigada a todos os bolsistas, mestrandos, professores, estagiários, funcionárias da Bacteriologia, que integram este grupo, e que foram essenciais para que este projeto fosse realizado. Em especial, agradeço à colega de mestrado Nyelle, por toda amizade e ajuda, pelo acolhimento em sua casa, pelos momentos de gargalhada até a seriedade na bancada.

Agradeço à Professora Luciane Daroit, pelo auxílio e dedicação na análise estatística deste projeto.

Agradeço aos professores do CDPA, Professor Hamilton e Professor Tadeu, por estarem sempre disponíveis para dúvidas, conselhos e por todo conhecimento transmitido, ao longo do primeiro ano de mestrado.

Agradeço aos colegas do CDPA, por toda a amizade, companheirismo, aprendizado, trocas de ideias, momentos de estudo e bancada, e até das horas de descontração com chimarrão e rapadura da mãe da Luisa.

Agradeço a concessão da bolsa CAPES.

Agradeço ao fomento do CNPq, que subsidiou este projeto de mestrado.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para conclusão deste projeto.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

Albert Einstein

RESUMO

A carne de frango pode servir de veículo para inúmeros microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, entre outros, potencialmente capazes de desencadear doenças transmitidas por alimentos. Estes microrganismos podem se aderir em superfícies bióticas e abióticas, formando biofilmes. Microrganismos, na forma de biofilme, são mais resistentes a adversidades ambientais, como falta de nutrientes e variações de temperatura, além de serem mais resistentes à sanitizantes químicos e físicos. Na indústria avícola, procedimentos de higienização, incluindo limpeza e desinfecção, são fundamentais para reduzir o número de microrganismos a um nível seguro. A sanitização, pelo uso de água quente, detergentes e sanitizantes, é a última etapa do procedimento de higienização com a finalidade de garantir um produto de boa qualidade higiênico-sanitária. Porém, falhas na etapa de higienização levam a permanência de resíduos de alimentos nos equipamentos e sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies de processamento e iniciam a formação de biofilmes. Na primeira etapa deste estudo, foi realizada uma triagem entre as amostras de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni* quanto à capacidade de formação de biofilme monoespécie em placa de poliestireno, pela coloração de cristal violeta. As amostras foram classificadas como: não aderentes, fracamente, moderadamente e fortemente formadoras de biofilmes nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C e foram selecionadas 4 cepas formadoras de biofilme de cada espécie. Na segunda etapa, as 4 cepas selecionadas foram testadas individualmente quanto a sua resistência aos sanitizantes peróxido de hidrogênio a 0,3% e hipoclorito de sódio a 2%, para avaliar a eficácia destes sanitizantes em células na fase planctônica. A maioria das cepas foram resistentes ao peróxido de hidrogênio a 0,3%, com exceção de *C. jejuni*. Quanto ao hipoclorito de sódio a 2%, apenas a amostra de *Listeria monocytogenes* foi resistente. Na terceira etapa, 4 cepas selecionadas foram testadas quanto a formação de biofilme multiespécie, nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polietileno, coletadas de matadouro-frigorífico avícola, nas temperaturas de 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, e nos intervalos de tempo 0, 4, 12 e 24 horas, utilizando microbiologia convencional. Além disso, perante a formação de biofilme, foi avaliada a eficácia dos procedimentos de higienização mimetizados nas diferentes condições ambientais, verificando a sensibilidade destes biofilmes frente aos tratamentos com água quente a 85°C, hipoclorito de sódio a 2% e peróxido de hidrogênio a 0,3%. As cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes* foram capazes de formar biofilme multiespécie, com maior prevalência de *S. Enteritidis*, considerando todas as temperaturas testadas. As superfícies de polietileno e poliuretano proporcionaram formação de biofilme estatisticamente semelhantes, onde o polietileno foi a superfície mais difícil de higienizar. O aço inoxidável proporcionou menos adesão interespécie e foi mais facilmente higienizado. Os sanitizantes hipoclorito de sódio a 2% e a água quente a 85°C possuíram eficácia semelhante nas superfícies testadas. O peróxido de hidrogênio não demonstrou eficácia na higienização das superfícies. Estes resultados são de grande relevância para estimular novas estratégias de higienização diante de biofilmes em matadouro-frigoríficos avícolas e para instigar outros estudos de formação de biofilme multiespécie.

Palavras-chave: Biofilmes multiespécies, temperaturas de incubação, superfícies, procedimentos de higienização.

ABSTRACT

The poultry meat can serve as a vehicle for numerous pathogens such as Salmonella, Campylobacter spp, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, among others, potentially capable of triggering foodborne illness. These microorganisms can adhere to biotic and abiotic surfaces forming biofilms. Microorganisms in biofilms are more resistant to environmental adversities, such as starvation of nutrients and temperature variations as well as being more resistant to physical and chemical sanitizers. In the poultry industry, cleaning procedures, including cleaning and disinfection are essential to reduce microorganisms to a safe level. The sanitization, by the use of hot water, detergents and chemical and physical sanitizers is the last step of the cleaning procedure in order to ensure product of good sanitary conditions. However, failures in sanitizing step lead to permanence of food residues in equipment and under certain conditions, microorganisms adhere interact with the surfaces of processing and trigger the biofilms formation. In the first step of this study, screening was performed for the strains of Salmonella Enteritidis, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Campylobacter jejuni as monospecies biofilm formation capacity in the polystyrene plate by crystal violet staining. Strains were classified in: nonadherent weakly, moderately and strongly forming biofilms in temperature of 3°C, 9°C, 25°C, 36°C and 42°C and selected 4 strains forming biofilms by species. In the second step, the 4 selected strains were tested individually as their resistance to the sanitizers of hydrogen peroxide at 0.3% and sodium hypochlorite at 2% for the effectiveness of these sanitizers with cells in planktonic phase. Most strains were resistant to hydrogen peroxide at 0.3%, with the exception of C. jejuni, which was sensitive to action this sanitizer. As for the sodium hypochlorite at 2%, only L. monocytogenes was resistance and the rest of the strains were sensitive to the action of sanitizing. In the third stage, the 4 selected strains were tested for the formation of multispecies biofilms on the surfaces of: stainless steel, polyurethane and polyethylene collected from poultry slaughterhouse, incubated at temperatures of 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, and the time slots 0, 4, 12 and 24 hours, using conventional microbiology. Moreover, the effectiveness of simulated hygiene procedures in the different environmental conditions was evaluated by checking the sensitivity of the biofilms to the treatments with hot water at 85°C, sodium hypochlorite at 2% and hydrogen peroxide at 0.3%. The strains of S. enteritidis, E. coli and L. monocytogenes were able to form multi-species biofilm, with higher prevalence of S. Enteritidis, considering all temperatures tested. The surfaces of polyethylene and polyurethane provided statistically similar biofilm formation, where the polyethylene was the hardest surface to sanitize. Stainless steel interspecies provided less adhesion and is more easily sanitized. Sanitizers sodium hypochlorite at 2% and hot water at 85 ° C possessed similar efficacy at the tested surfaces. Hydrogen peroxide has not demonstrated efficiency in the cleaning of surfaces. These results are of great importance to promote new strategies for cleaning before biofilms in poultry slaughterhouses and to instigate other multispecies biofilm formation studies.

Keywords: Multispecies biofilms, incubation temperatures, surfaces, cleaning procedures

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de biofilme monoespécie por <i>S. Enteritidis</i> (SE24), <i>E. coli</i> (C7), <i>L. monocytogenes</i> (L4) em placa de poliestireno em diferentes temperaturas.....	60
Figura 2. Formação de biofilme monoespécie por amostras de <i>C. jejuni</i> em placa de poliestireno na temperatura de 3°C.....	61
Figura 3. Formação de biofilme monoespécie por amostras de <i>C. jejuni</i> em placa de poliestireno na temperatura de 9°C.....	62
Figura 4. Formação de biofilme monoespécie por amostras de <i>C. jejuni</i> em placa de poliestireno na temperatura de 25°C.....	62
Figura 5. Formação de biofilme monoespécie por amostras de <i>C. jejuni</i> em placa de poliestireno na temperatura de 36°C.....	63
Figura 6. Formação de biofilme monoespécie por amostras de <i>C. jejuni</i> em placa de poliestireno na temperatura de 42°C.....	63
Figura 7. Formação de biofilme de <i>S. Enteritidis</i> (SE24) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.....	67
Figura 8. Formação de biofilme de <i>E. coli</i> (C7) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.....	68
Figura 9. Formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> (L4) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.....	69
Figura 10. Formação total de biofilme de <i>S. Enteritidis</i> (SE24), <i>E. coli</i> (C7), <i>L. monocytogenes</i> (L4) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.	70
Figura 11. Média de Sobrevivência dos biofilmes multiespécies formado por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável após diferentes procedimentos de higienização.	73
Figura 12. Sobrevivência individual dos biofilmes multiespécies formado por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável utilizando diferentes procedimentos de higienização.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resistência das cepas de <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>C. jejuni</i> frente aos sanitizantes em diferentes tempos e concentrações.	64
Tabela 2. Média das repetições da formação de biofilmes por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) em todas as superfícies e condições ambientais testadas.	65
Tabela 3. Média das repetições da formação de biofilmes pelas <i>S. Enteritidis</i> sob diferentes temperaturas de incubação em todas as superfícies testadas	66
Tabela 4. Média de formação de biofilmes pelas cepas de <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) sob diferentes temperaturas de incubação obtidas pelas médias das repetições, em todas as superfícies testadas.....	66
Tabela 5. Média total de formação de biofilmes por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.....	71
Tabela 6. Média de formação de biofilmes de cada cepa de <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.....	71
Tabela 7. Média total dos tratamentos de remoção do biofilme multiespécies formado por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134) nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano. Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.....	72
Tabela 8. Média dos tratamentos de remoção do biofilme multiespécies formado por <i>S. Enteritidis</i> (SE24) <i>L. monocytogenes</i> (L4), <i>E. coli</i> (C7), <i>C. jejuni</i> (CJ134). Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

WHO	<i>World Health Organization</i>
DTA	Doença Transmitida por Alimento
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
VBNC	Viável mas não cultivável
UFC	Unidade Formadora de Colônia
pH	Potencial hidrogeniônico
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
EPS	Substância polimérica extracelular
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
v/v	Porcentagem volume por volume
nm	Nanômetro
μL	Microlitro
Log ₁₀	Logarítimo na base 10
cm ²	Centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Patógenos de importância em saúde pública transmitidos por alimentos de origem avícola.....	19
2.1.1	<i>Salmonella</i> Enteritidis	20
2.1.2	<i>Escherichia coli</i>	24
2.1.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	28
2.1.4	<i>Campylobacter jejuni</i>	31
2.2	Biofilmes na Indústria Avícola.....	35
2.2.1	Biofilmes monoespécie e multiespécies	39
2.2.3	Superfícies de adesão	44
2.3	Higienização na Indústria Avícola.....	46
2.3.1	Métodos químicos de desinfecção	49
2.3.2	Métodos físicos de desinfecção	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1	Biofilmes monoespécie por <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> em microplaca de poliestireno	52
3.1.1	Amostragem.....	52
3.1.2	Preparação do inóculo	53
3.1.3	Ensaio de formação dos biofilmes monoespécie em microplaca de poliestireno.....	54
3.1.4	Interpretação dos resultados	54
3.2	Teste da eficácia dos sanitizantes em células planctônicas.....	55
3.3	Biofilme multiespécie de <i>S. Enteritidis</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> em aço inoxidável, poliuretano e polietileno e tratamentos de remoção.....	56
3.3.1	Amostragem.....	56
3.3.2	Preparação de corpos de prova	56
3.3.3	Formação do biofilme	57
3.3.4	Avaliação dos procedimentos de higienização	58
3.3.5	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS	60
4.1	Biofilmes monoespécie por <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> em microplaca de poliestireno	60

4.2	Teste da eficácia dos sanitizantes em células planctônicas.....	64
4.3	Biofilme multiespécies pela interação de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> , em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polietileno, e tratamentos de remoção	65
4.3.1	Quantificação das amostras	65
4.3.2	Efeito das temperaturas na formação do biofilme	66
4.3.3	Adesão microbiana às diferentes superfícies	71
4.3.4	Tratamentos de higienização	72
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES.....	87
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2015), o Brasil manteve a posição de maior exportador e segundo maior produtor de carne de frango no mundo, de acordo com o Departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2015). A produção brasileira de carne de frango atingiu 12,69 milhões de toneladas em 2014, representando 14,74% da produção mundial de carne de frango, que corresponde, atualmente, a 86,077 milhões de toneladas.

A avicultura brasileira é responsável por empregar mais de 3,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, contribuindo por movimentar mais de 8 bilhões de dólares em 2015 (ABPA, 2015). A importância social da avicultura se verifica também pela presença de indústrias no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, sendo em muitas cidades a produção de frangos a principal atividade econômica. O Rio Grande do Sul é o terceiro maior estado exportador de carne de frango do Brasil, representando 14,24% da produção brasileira, atrás somente dos estados do Paraná e de Santa Catarina (ABPA, 2015).

O uso de métodos para o controle de qualidade são rotina para as empresas avícolas brasileiras, permitindo à população adquirir um produto de boa qualidade a baixos custos, o que reflete na conquista de novos mercados no país e no exterior. Portanto, há necessidade de manutenção constante da sanidade dos plantéis avícolas como, também, das condições higiênico-sanitárias dentro dos matadouro-frigorífico (SALLE & MORAES, 2009).

Apesar dos controles estabelecidos, casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido reportados com relação ao consumo de carne de frango e ovos (WHO, 2013). Segundo dados da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS), foram registrados no Brasil, nos anos de 2000 a 2015, 10.666 surtos de DTA com 155 óbitos. Apesar de 58,5% dos surtos não possuírem agentes etiológicos identificados, o gênero *Salmonella* spp. permanece como principal patógeno identificado, com 14,4% dos casos, seguido de *Staphylococcus aureus* com 7,7% e da *Escherichia coli* com 6,5% dos casos (BRASIL, 2015).

Nos Estados Unidos, o gênero *Salmonella* spp. foi o principal patógeno isolado e identificado em surtos de DTA, com cerca de 2 mil casos de hospitalizações e 30 casos de morte (CRIM, 2015). O gênero *Campylobacter* spp. e *Listeria* spp. correspondem ao

segundo e terceiro no *ranking* de óbitos causados por patógenos causadores de diarreia, enquanto que bactérias do gênero *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) não-O157, apresentaram uma redução nas hospitalizações, não sendo responsáveis por mortes em casos de DTA. A maioria destes patógenos envolvidos em doenças de origem alimentar são capazes de se aderir e formar biofilmes sobre a maioria dos materiais e sob quase todas as condições ambientais encontradas em unidades de produção de alimentos (BRIDIER et al., 2015).

O termo biofilme refere-se aos microrganismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, e uma vez constituído, o biofilme age como ponto de contaminação constante, liberando fragmentos ou células, o que pode comprometer a qualidade microbiológica dos produtos (AZEVEDO & CERCA, 2012; COSTERTON et al., 1995; FUSTER-VALLS, 2008). Os biofilmes podem ser constituídos por bactérias da mesma espécie (monoespécie) ou de espécies diferentes (multiespécies) e, na sua formação, são envolvidos por uma matriz polimérica extracelular, a qual auxilia na sua fixação nas superfícies. Essa matriz confere ao biofilme uma estrutura tridimensional e proporciona maior resistência à ação de antibióticos e sanitizantes, quando comparado à células planctônicas (AZEVEDO & CERCA, 2012; COSTERTON et al., 1995). Biofilmes representam grande preocupação em relação às condições higiênico-sanitárias dos matadouros-frigoríficos avícolas e a falhas nos procedimentos de higienização e limpeza, constituindo uma potencial persistência de bactérias fonte de contaminação dos alimentos (AZEVEDO & CERCA, 2012).

O procedimento de higienização nos matadouros-frigoríficos de aves consiste fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanitizantes. A escolha do sanitizante correto nas indústrias de alimentos é fator primordial para a qualidade, já que a sanitização é a última etapa do processo de higienização e visa reduzir os microrganismos até níveis aceitáveis, para obtenção de um produto final seguro para a saúde dos consumidores (MORAES et al., 1997; SILVA et al., 2014). A sanitização deve seguir as concentrações recomendadas pelo fabricante e também pelas legislações vigentes, já que uma subdosagem poderia contribuir para uma possível resistência bacteriana ao sanitizante e uma superdosagem, bem menos comum em indústrias de alimentos, pode trazer contaminação química do produto, evitando sua comercialização (DAVIDSON & HARRISON, 2002; SILVA et al., 2014).

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a dinâmica de formação de biofilmes monoespécie em poliestireno e multiespécies em superfícies de matadouro-

frigorífico avícola de uma amostra de *Salmonella* Enteritidis, oriunda de um surto de DTA, uma amostra de *Escherichia coli* e uma amostra de *Listeria monocytogenes*, ambas oriundas de superfícies de matadouro-frigorífico avícola, e uma amostra de *Campylobacter jejuni*, isolada de carcaça de frangos após a refrigeração por imersão, em matadouro-frigorífico avícola. Nesse sentido, a habilidade de formação de biofilmes foi avaliada em aço inoxidável, polietileno e poliuretano nas temperaturas de $42\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$, e nos intervalos de tempo 0, 4, 12 e 24 horas. Além disso, perante a formação de biofilme multiespécies, foi avaliada a eficácia dos procedimentos de higiene operacional e pré-operacional, mimetizados nas diferentes condições ambientais, verificando a sensibilidade destes biofilmes frente aos tratamentos com água quente a 85°C , hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Patógenos de importância em saúde pública transmitidos por alimentos de origem avícola

A incorporação de modernas tecnologias nas áreas de nutrição, manejo, sanidade e genética resultaram no avanço da avicultura e, conseqüentemente, na importância da carne de frango como uma fonte de proteína animal de custo acessível para a população. A intensificação na produção de carne de frango possibilitou também a ascensão do Brasil como um dos maiores produtores no mundo (UBPA, 2015).

Assim, como outros produtos destinados à alimentação humana, a carne de frango pode servir de veículo para inúmeros microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, entre outros, potencialmente capazes de desencadear doenças de origem alimentar (BRASIL, 2015; RODRIGUES et al., 2009; SIGARINI, 2009; WHO, 2016). Por definição, doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como doenças, de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo por meio da ingestão de alimentos ou água. São consideradas um problema emergente e com grande impacto em saúde pública, pois alguns dos patógenos envolvidos adquiriram maior resistência a antimicrobianos e sanitizantes ao longo dos anos (FORSYTHE, 2013; WHO, 2009).

Os patógenos envolvidos em doenças de origem alimentar são capazes de se aderir e formar biofilmes na maioria dos materiais e sob quase todas as condições ambientais encontradas em unidades de produção alimentar (BRIDIER et al., 2015). Desta forma, falhas na biossegurança das granjas, nas operações de abate, industrialização ou acondicionamento do produto final podem favorecer a contaminação e a disseminação de vários microrganismos (BERCHIERI JR, 2009; JOHNSON, 1998).

As aves podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente estes patógenos nas fezes, podendo causar contaminações de grande importância nos matadouros-frigoríficos. O *Campylobacter* spp., estirpes de *E. coli* e *L. monocytogenes* são relatados como microrganismos comensais das aves e, por isso, pode ser difícil erradicá-los dos matadouros-frigoríficos (BARNES, 2008; SHANE & STERN, 2008). Já *salmonelas* paratíficas podem causar doença em aves jovens, mas há poucos relatos em aves adultas, que geralmente desenvolvem imunidade e disseminam o patógeno nos aviários (GAST, 2008). Devido a estes fatores, o controle de tais microrganismos se

tornaram um grande desafio para as indústrias de alimentos no mundo, assim como para os órgãos da vigilância sanitária (FORSYTHE, 2013; NALÉRIO et al., 2009). Apesar dos grandes avanços tecnológicos na produção de carne de frango, a contaminação microbiana das carcaças tem sido causa frequente de barreiras sanitárias no comércio internacional de carne de frango (GUAHYBA BISNETO, 2012).

Atualmente, existem políticas sanitárias relacionadas com a presença destes microrganismos em alimentos, em todo o mundo, protocoladas pela Comissão do *Codex Alimentarius*, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016), entre outros. A avaliação de riscos de agentes microbiológicos em alimentos acontece por meio do Grupo de Especialistas da FAO/WHO sobre Avaliação de Risco Microbiológico (JE-MRA). O *Codex Alimentarius* elaborou padrões, diretrizes e recomendações que descrevem processos e procedimentos para o preparo seguro dos alimentos. A aplicação desses padrões tem como objetivo prevenir, eliminar ou reduzir os perigos nos alimentos até níveis aceitáveis (FORSYTHE, 2013). Uma das ferramentas mundialmente conhecidas para controle destes agentes é o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que deve estar presente em toda a indústria alimentícia, inclusive na indústria avícola.

Devido à possível alta incidência de patógenos como *Salmonella* spp., *Escherchia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni*, em carne de aves e seus derivados, estes têm merecido atenção especial dos pesquisadores. Condições de umidade, temperatura, presença de matéria orgânica e tipo de superfície que compõe as plantas de processamento industrial, aliadas à habilidade destes patógenos em produzir biofilmes, podem desencadear a colonização de superfícies e equipamentos, além de dificultar a eliminação destes patógenos pelos métodos de higienização tradicionais (GIAOURIS, 2015; UHITIL et al., 2004). Por isso, as diversas etapas envolvidas na produção, processamento e armazenamento de carne de frango podem ser importantes fontes de contaminação ao produto processado e, conseqüentemente, ao consumidor final (FORSYTHE, 2013).

2.1.1 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bastonete Gram negativo, anaeróbico facultativa, não formadora de esporos (TORTORA et al., 2012). A

maioria das espécies são móveis, com flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Fermenta a glicose produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Possuem como temperatura ótima de crescimento aproximadamente 38°C e a temperatura mínima de 5°C (TORTORA et al, 2012). São relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2013).

Há duas espécies de *Salmonella*, a *S. bongori* e *S. enterica*. Esta última é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A *S. enterica* subespécie *enterica* está associada a mamíferos e aves. No ano 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL) (GRIMONT & WEILL, 2007). Caracterizam-se os diferentes sorovares do gênero com base em suas fórmulas antigênicas, 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 (FORSYTHE, 2013; GRIMONT & WEIL, 2007). Devido à identificação completa ser muito longa, os nomes das espécies e subespécies não são indicados, sendo descrito apenas o gênero e o sorovar, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis (BACK, 2010; BERCHIERI JR & FREITAS NETO, 2009; GAST, 2008). Embora a maioria dos sorovares possam ser considerados humanos, apenas cerca de 200 têm sido associados com doenças em humanos (FORSYTHE, 2013).

As salmoneloses aviárias podem ser classificadas em três enfermidades distintas: pulorose, tifo e paratifo aviário. A pulorose, antigamente conhecida como diarreia branca bacilar, é causada pela *Salmonella* Pullorum, causa doença clínica em aves jovens. O tifo aviário, causado pela *Salmonella* Gallinarum, é mais comum em aves adultas, principalmente aves de fundo de quintal e poedeiras. (BACK, 2010; BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009; GAST, 2008). A salmonelose paratífica, ou paratifo aviário, refere-se à infecção pelos demais sorovares de *Salmonella enterica* subespécie *entérica* (BACK, 2010). Entre os diversos sorovares isolados de aves, apresentando ou não sinais da doença, o Enteritidis, seguido pelo Typhimurium, assim como Heidelberg, Agona, Anatum, Cubana, Hadar, Mbandaka, Montevideo e Senftenberg, entre outros, foram identificados (ANDREATTI FILHO; OKAMOTO, 2013). Geralmente, esses sorovares colonizam o trato intestinal das aves sem causar alterações clínicas, visto que não são específicos de aves. No entanto, por serem adaptados a esse hospedeiro, conseguem persistir no intestino e conseqüentemente contaminar ovos e carcaças (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

Infecções em humanos por *Salmonella* são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde contabilizou, em 2010, cerca de 80 milhões de pessoas doentes e cerca de 22 mil mortes causadas por *Salmonella* não tifoide em todo o mundo (WHO, 2015). Nos Estados Unidos, o gênero *Salmonella* spp. foi o principal patógeno isolado e identificado em surtos de DTA, com cerca de 2 mil casos de hospitalizações e 30 casos de morte entre o período de 2006 e 2013 (CRIM, 2015). Segundo dados da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS), foram registrados no Brasil, entre 2000 a 2014, 1564 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocasionados por *Salmonella* spp., sendo o agente etiológico mais associado aos surtos, ficando atrás somente dos casos onde não se pode identificar o microrganismo causador (BRASIL, 2014).

Durante as 3 últimas décadas, a *Salmonella* Enteritidis (SE) tem emergido como um dos mais significativos patógenos de origem alimentar. A Organização Mundial da Saúde, através do banco de dados online *Global Foodborne Infections Network* (GFN), monitora os 15 principais sorotipos de *Salmonella* isolados no mundo desde 2001 (WHO, 2016). O sorovar *S. Enteritidis* esteve em primeiro lugar no ranking dos 15 sorotipos mais isolados de alimentos, animais e homem na Europa em 2014. Já nas Américas, este sorovar ficou como o segundo colocado entre os sorovares mais isolados de humanos. No Brasil, a *S. Enteritidis* ficou em primeiro lugar no ranking de sorovar mais isolado de humanos e o segundo mais isolado de alimentos no ano de 2012, estando também entre entre os 15 sorovares mais isolados do ambiente e animais. (WHO, 2016).

A *S. Enteritidis* foi identificada como causadora da maioria das salmoneloses alimentares investigadas pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) do Rio Grande do Sul entre os períodos de 2007 a 2014. De acordo com os dados da CEVS, os sorovares mais prevalentes no RS são Enteritidis, Typhimurium, Panama, Newport e Corvallis, embora grande parte dos isolados de *Salmonella* registrados no estado não estarem sorotipificados (BRASIL, 2014). Considera-se que a maioria dos surtos estão associados a contaminações cruzadas e tratamento térmico inadequado, principalmente em residências, restaurantes e padarias (BRASIL, 2014). Apesar das estatísticas, órgãos responsáveis pela vigilância epidemiológica no Brasil, ainda falham em subnotificação de casos, falta de isolamento do agente etiológico e ainda pelo fato de que a maioria dos quadros de gastroenterite não chegam a ser tratados em hospitais.

Os principais alimentos implicados na transmissão de *S. Enteritidis* são os ovos, carne de aves e seus derivados, frutas e vegetais consumidos crus. Uma análise de risco

realizada pela FAO/ OMS (2002), observou que a incidência de salmonelose em humanos, transmitidas por ovos e carne de frango, teve uma relação linear com a prevalência observada em frangos. Isto significa que, quando a prevalência de *Salmonella* é reduzida em 50% de frangos, a incidência de salmonelose em humanos também deve ser reduzida em 50% (FORSYTHE, 2013). A contaminação das carcaças de frango pode decorrer pela presença da bactéria no ambiente de criação, que se dissemina via material fecal durante a operação de abate, caso haja falhas na higienização (CARDOSO, 2013).

Mundialmente, existem inúmeros programas e ferramentas de vigilância e controle de *Salmonella* spp. em alimentos. A vigilância envolve a coleta, análise e o monitoramento de tendências de patógenos alimentares. Dentre alguns programas de vigilância, destacam-se o *Foodborne Disease Active Surveillance Network* – FoodNet (Rede de Vigilância de Doenças de Origem Alimentar), nos Estados Unidos, vinculados ao *Center Control and Prevention* – CDC (Centro de Prevenção e Controle de Enfermidades), que relata dados sobre os surtos de DTAs; e o programa *Global salm-surv* (GSS), agora conhecido como *WHO Global Foodborne Infections Network* – GFN (Rede Global de Infecções Transmitidas por Alimentos), monitora mundialmente os 15 principais sorovares de *Salmonella* isolados de humanos, animais, alimento e ambiente. Como controle, destaca-se o *Codex Alimentarius*, vinculado à Organização Mundial da Saúde, que determina padrões mínimos de higiene para proteger a saúde do consumidor e assegurar práticas justas no comércio de alimentos.

No Brasil, apesar das monitorias industriais com o propósito da segurança de alimentos, surtos de DTA por sorovares de *Salmonella* têm sido frequentes, sendo que as aves são uma significativa fonte de contaminação de *salmonelas* para o homem (ANDREATTI FILHO; OKAMOTO, 2013). Há vários programas que auxiliam no monitoramento e controle de *Salmonella* em aves vivas e produtos de origem animal no Brasil. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), criado pela Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994, normatizou as ações de acompanhamento sanitário das aves e estabeleceu a cooperação entre as instituições públicas e privadas (BRASIL, 1994). Quanto à salmoneloses aviárias, a Instrução Normativa Nº 78, de 3 de novembro de 2003 que complementa o PNSA, instrui que os núcleos e estabelecimentos avícolas devem cumprir a seguinte certificação: livres de *S. Gallinarum* (Tifo Aviário) e *S. Pullorum* (Pulorose); livres ou controlados para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; e, livres ou controlados para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e vacinados contra *S. Enteritidis* (BRASIL, 2003a).

Com o Programa de Redução de Patógenos disposto na Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003, há Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus oficial em estabelecimentos registrados junto ao SIF (BRASIL, 2003b). Também, há a Norma Interna SDA nº 2, de 11 de outubro de 2013 que aprova o programa exploratório para pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos abatidos em estabelecimentos registrados junto ao Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, também estabelece o controle de *Salmonella* spp. em alimentos prontos para o consumo, obedecendo a ausência de *Salmonella* em 25g de produtos prontos para consumo (BRASIL, 2001).

Apesar de todos os programas de vigilância e controle, a *Salmonella* ainda é um dos enteropatógenos mais preocupantes do mundo. De acordo com Trentin et al. (2013), 80% das infecções humanas, como surtos de DTA causados por *Salmonella*, estão associadas a capacidade de bactérias se aderirem no ambiente, formando biofilmes. Por isso, é essencial o monitoramento desde a criação das aves, abate e processamento de aves, até a obtenção do produto final.

2.1.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um importante membro da microbiota intestinal natural de aves e mamíferos. No entanto, algumas *E. coli* são patogênicas, causando, tipicamente, quadros de diarreia em diversas espécies, inclusive no homem (CDC, 2014). Esta bactéria caracteriza-se por ser um bacilo Gram negativo, pode ser móvel com flagelos peritríquios, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, capaz de fermentar a lactose e glicose (JAY, 2005).

Este gênero, em conjunto com outras bactérias da família Enterobacteriaceae, como as dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme (SILVA & JUNQUEIRA, 1995). O grupo coliforme é utilizado como indicador de contaminação fecal em água e alimentos e também são utilizados como indicador de falhas higiênicas-sanitárias (JAY, 2005; PAULA, 2014). A *E. coli* é a principal espécie no grupo dos coliformes fecais pois é considerada a melhor indicadora

de poluição fecal e de possível presença de outros patógenos entéricos (FORSYTHE, 2013).

A *Escherichia coli* está entre as bactérias mais associadas a surtos de gastroenterite no mundo, juntamente com *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. (WHO, 2010). Em geral, as cepas de *E. coli* podem ser divididas em duas categorias: as causadoras de doença intestinal e as causadoras de doença extra-intestinal (QUINN, 2012). As cepas de *Escherichia coli* causadoras de doença intestinal são divididas em 6 patotipos ou grupos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente adesiva (DAEC) (CDC, 2011; FORSYTHE, 2013).

O grupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), é conhecido também por *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Este grupo está envolvido em um amplo espectro de doenças, sendo a *E. coli* O157:H7 o sorovar de maior importância e também o mais estudado (FARROKL et al., 2013). Os sintomas causados por este sorovar envolvem colite hemorrágica (CH) com fortes dores abdominais e cólicas seguidas de diarreia sanguinolenta; síndrome hemolítica urêmica (SHU) e trombocitopenia trombótica púrpura (TTP) (FORSYTHE, 2013; PAULA, 2014; PRESCOTTS, 2002).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é a principal causa de diarreia do viajante e uma das principais causas de doenças diarreicas em países subdesenvolvidos, especialmente entre as crianças (FORSYTHE, 2013). A ETEC produz duas enterotoxinas distintas, que são responsáveis pela diarreia e caracterizada pela sua estabilidade ao calor, a enterotoxina termoestável (ST) e a enterotoxina termosensível (LT) (PRESCOTTS, 2002). Estima-se que a mesma seja responsável por cerca de 400 milhões de episódios de diarreia por ano em crianças menores de 5 anos de idade, resultando em 300.000 a 500.000 mortes no mundo (WHO, 2015).

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) não produz toxinas, porém causam diarreia e vômito, geralmente em crianças. As EPEC causam um tipo específico de dano celular chamado *attaching-effacing* ou adesão e desaparecimento (AE) nas células intestinais (PRESCOTTS, 2002). Já as *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), além de não produzirem toxinas, são imóveis. Entretanto, a patogenicidade deste grupo se deve a sua grande capacidade de invasão e destruição do tecido do cólon. As *E. coli* enteroagregativas (EAEC), causam diarreia aquosa persistente, principalmente em crianças, com duração de mais de 14 dias. Possuem a capacidade de aderência a células do intestino conhecida como empilhamento de tijolos (FORSYTHE, 2013; PRESCOTTS, 2002). Por fim, o

grupo *E. coli* difusamente adesiva (DAEC), pode aderir em toda a superfície das células intestinais e, geralmente, causam diarreia em crianças subdesenvolvidas imunologicamente ou desnutridas (PRESCOTTS, 2002).

Em todo o mundo, agentes de doenças diarreicas transmitidas por alimentos causaram 230.000 das 420.000 mortes devido a riscos de origem alimentar, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015). Destes, *S. enterica* não tifóide foi responsável por 59000 óbitos, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) por 37.000 óbitos, norovírus por 35000, e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) por 26.000 mortes (WHO, 2015). No Brasil, a *Escherichia coli* está entre os principais patógenos envolvidos em surtos de DTA, sendo responsável por 547 casos de surtos entre os anos de 2000 a 2014 e representa 6,5 % de todos os agentes etiológicos identificados e não identificados nestes surtos (SVS, 2014; SVS, 2015). Entretanto, não há especificação de patótipos identificados em surtos pelo Brasil. Isto ocorre porque as técnicas microbiológicas convencionais para isolamento de *E. coli* não são capazes de detectar sorovares, e os métodos capazes de detectá-los não estão implementados na maioria dos Laboratórios Centrais (LACENs) (PAULA et al., 2014).

Já nas aves, as infecções por *E. coli*, também chamadas colibacilose, são tipicamente doenças sistêmicas ou localizadas, ocorrendo como doença secundária na maioria das vezes (BARNES et al., 2008). A colibacilose é causada tipicamente por *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), incluindo sinais clínicos de colissepticemia, coligranuloma, doença respiratória crônica (CRD), celulite, síndrome da cabeça inchada, peritonite, salpingite, osteomielite e onfalite (BARNES et al. 2008). As APEC são membros do grupo *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC), e há relatos de que o grupo APEC pode representar um risco zoonótico (MITCHELL et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Em matadouro-frigoríficos, contaminações pelo processo de abate são principalmente de origem fecal, devido ao vazamento intestinal ou contaminação externa dos animais que entram na linha de abate. Além disso, *Escherichia coli* patogênicas para as aves (APEC), são um problema comum de condenação total ou parcial de carcaças, quando se trata das lesões de colibacilose e celulite aviária (BARNES, 2008). Em estudo realizado por Aslam et al. (2014) no Canadá, cepas do grupo *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) isoladas de carnes de frangos e perus possuíam genes de virulência semelhantes aos genes de ExPEC isoladas de humanos, sugerindo que os isolados de varejo apresentam potencial de causar infecção em humanos.

Outra situação importante quanto às condições higiênico-sanitárias em matadouro-frigoríficos avícolas é quanto à capacidade de *E. coli* se aderir e se manter nas superfícies de processamento de carnes, formando biofilmes (GIAOURIS, 2015).

Um interessante estudo feito por Silagy et al. (2009) demonstraram a capacidade de transferência de *E. coli* O157:H7 entre superfícies de processamento de alimentos, produtos cárneos e frutas e vegetais crus. Silagy et al. (2009) obtiveram maior produção de biofilme por de *E. coli* O157:H7 em superfícies de aço inoxidável e vidro. Também, detectaram moléculas de comunicação (AI-2) com maior expressão no estágio inicial do biofilme. Além disso, a *E. coli* O157:H7 aderida na superfície de aço inoxidável foi capaz de se transferir aos produtos cárneos (bovino, suíno e aves), frutas e hortaliças cruas testadas. Foi detectada forte adesão do patógeno transferido em melão, alface, cenoura e espinafre ($>10^3$ UFC/cm²), mesmo após a lavagem desses produtos com a água. Os resultados sugerem que a formação de biofilme por *E. coli* O157: H7 em superfícies em contato com alimentos pode ser uma preocupação para o controle eficiente do patógeno, especialmente, em produtos que não necessitam de cozimento antes do consumo (SYLAGI, et al. 2009).

Nos Estados Unidos, a *E. coli* é utilizada como um microrganismo indicador para verificar a adequação de planos de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em matadouros-frigoríficos bovinos, suínos e avícolas. Em 1996, o FSIS (Segurança Alimentar e Serviço de Inspeção) emitiu a Regra Decisiva do Sistema APPCC para Redução de Patógenos. O estabelecimento tipo granja aviária é considerado adequado se nenhum dos últimos 13 testes realizados for superior ao limite de 10^3 UFC/ml, e menos do que três amostras estejam entre 10^2 e 10^3 UFC/ml de *E. coli* (ALTEKRUSE et al., 2009).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP), visa controlar o patotipo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), antigamente conhecida como verotoxigênica, apenas em carne bovina (BRASIL, 2015). Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece limites de coliformes totais e/ou fecais (a 45°C) por grama de alimento, conforme grupo de alimento. No caso de carnes de aves *in natura*, os limites permitidos de coliformes fecais não ultrapassam 10^4 UFC/g de alimento.

Devido a existência de inúmeros grupos de *E. coli* causadoras de gastroenterites, é importante que este patógeno seja constantemente monitorado e identificado em surtos de DTA. O estudo de formação de biofilmes e sua remoção por sanitizantes na indústria

avícola também é importante, pois surtos de DTA são cada vez mais correlacionados com a capacidade de bactérias se aderirem em superfícies, contaminarem os alimentos e conseqüentemente o homem. Além disso, as conseqüências da prevalência de *E. coli* em alimentos indica falhas na higienização e podem se refletir não só na saúde pública como na economia do país.

2.1.3 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria*, pertencente à família *Listeriaceae*, é um bacilo Gram positivo, psicrotrófico, anaeróbio facultativo, que pode ser isolado a partir do solo, vegetação, água, alimentos, homem e muitos reservatórios animais (PRESCOTTS, 2002; HAMON et al., 2006). É móvel quando cultivada entre 20 e 25°C, porém é imóvel ou apresenta fraca motilidade a 37°C (BARANCELLI et al., 2011). Este gênero compreende 17 espécies, incluindo *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri* e outras onze espécies reconhecidas a partir de 2009, que são *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, e *L. cornellensis* (ORSI & WIEDMANN, 2016). Destas, a *L. monocytogenes* é considerada o patógeno de maior relevância para o homem e animais (VARNAM e EVANS, 1996; FORSYTHE, 2013). Além disso, existem 13 diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, mas somente três (1/2a, 1/2b, 4b) tem sido frequentemente isolados em doenças humanas (NADON et al., 2001; GRAY et al., 2004; VERA et al., 2013).

A listeriose, doença causada pela *L. monocytogenes*, em humanos, é responsável por afetar principalmente indivíduos imunocomprometidos, idosos, grávidas e recém-nascidos (PRESCOTTS, 2002). A listeriose manifesta-se como gastroenterite, meningite, encefalite e septicemia. Em mulheres grávidas, caracteriza-se por provocar abortos, natimortos, morte prematura e septicemia neonatal, resultando em morte em 25-30% dos casos (HAMON et al., 2006). A *L. monocytogenes* é também considerada um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados, embora registram-se casos em indivíduos imunocompetentes (BARANCELLI et al., 2011; CRUZ, 2008). Em pessoas saudáveis, a infecção pode ser assintomática ou apresentar-se com sintomas semelhantes a uma gripe, acompanhados ou não de febre (SIGARINI, 2009).

A listeriose resulta, principalmente, da ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* (BARANCELLI et al., 2011). Não há um consenso entre os pesquisadores a respeito da dose infectante, podendo ser inferior a 10^2 UFC/g em alguns casos. Segundo a *Food and Drug Administration – FDA* (2014), a dose infectante pode variar conforme a virulência da cepa e a susceptibilidade da vítima. A presença de *L. monocytogenes* tem sido relatada em diferentes alimentos, como leite cru e/ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais, embutidos de carne, carne de frango, pescados crus ou defumados (PRESCOTTS, 2002; SIGARINI, 2009). Psicrotrófica, *L. monocytogenes* é capaz de multiplicar-se sob refrigeração, o que torna um desafio o seu controle na cadeia de produção de alimentos. A expansão do uso da cadeia de frio na estocagem de alimentos, na indústria, no comércio e nas residências, o uso de alimentos “prontos para consumo”, minimamente processados, refrigerados, representam nichos que favorecem a *L. monocytogenes* (BARANCELLI et al., 2011).

Segundo dados do centro americano de controle e prevenção de doenças, (*Center of Disease Control and Prevention - CDC*), a listeriose está entre os 6 principais patógenos que causam infecções alimentares nos Estados Unidos (EUA), depois de *Campylobacter*, *Salmonella* e *Escherichia coli*. Porém, sua taxa de mortalidade é a mais alta. A última estimativa do CDC realizada em 2014 indicou a ocorrência de 1600 casos de listeriose apenas nos EUA, dos quais 260 destes indivíduos foram a óbito (CDC, 2014a). Atualmente, o número de casos de listeriose registrados nos EUA permanecem invariáveis desde 2006.

Nos Estados Unidos, surtos de listeriose são relatados anualmente principalmente pelo consumo de queijos, produtos com carne de frango e produtos crus (MMWR, 2013). Em 2014, um surto de listeriose foi relatado a partir do consumo de queijos caseiros, onde 5 pessoas de 4 estados diferentes foram hospitalizadas e uma grávida veio a óbito (CDC, 2014b). Neste ano, foram confirmados 18 casos de listeriose em diversos estados dos EUA, com um caso de óbito, em decorrência do consumo de saladas de frango embaladas, contaminadas por *L. monocytogenes* (CDC, 2016; USDA, 2016). Contudo, os produtos, fontes de contaminação, são rastreados e recolhidos pelos órgãos responsáveis pela inspeção sanitária, tanto de supermercados como de restaurantes, obedecendo a política de tolerância zero para presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (*read-to-eat*) e produtos avícolas, conforme estabelecido pelo Serviço de Inspeção e Sanidade de Alimentos (FSIS – *Food Safety and Inspection Service*) dos Estados Unidos desde o ano de 1998 (USDA, 2014).

No Brasil e em outros países em desenvolvimento, não há estatísticas oficiais de casos de listeriose, considerando-se uma doença subdiagnosticada e subnotificada. Na comunidade científica os casos de listeriose relatados são raros e não há associação com o consumo de alimentos contaminados. Hofer et al. (1998), descreveu 3 casos de meningite por *L. monocytogenes*, comprovados bacteriologicamente, em pacientes do Distrito Federal, com um caso de óbito. Hofer et al. (2006) caracterizou a distribuição de sorovares de *L. monocytogenes* isoladas de material clínico de indivíduos doentes e saudáveis, de várias regiões do país e colecionadas no período de 1969 a 2000, conseguindo diferenciar 7 sorovares de *L. monocytogenes* em hemocultivos. Os dados deste estudo evidenciaram a circulação de *L. monocytogenes* na espécie humana, provocando quadros graves de meningite e septicemia, além de revelar a presença deste patógeno em portadores assintomáticos (HOFER et al, 2006).

No Rio Grande do Sul, Schwab e Edelweiss (2003), identificaram *L. monocytogenes* pela técnica de imuno-histoquímica em placentas humanas provenientes de aborto, de parto prematuro e de nascimento a termo, registrados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no ano 2000. A presença de *L. monocytogenes* foi identificada em 33,7% das placentas analisadas, o que sugere que a técnica de imuno-histoquímica pode ser usada para confirmação desta bactéria em placentas.

Infecções causadas por *L. monocytogenes* ocorrem esporadicamente em frangos, perus, aves aquáticas, pombos e outras espécies aviárias. Nas aves, a doença se caracteriza pela forma septicêmica e encefálica, geralmente em aves jovens que se contaminam por via oral. Em geral, a sintomatologia na forma septicêmica envolve emagrecimento e diarreia. Os sinais neurológicos incluem depressão, incoordenação motora, ataxia, torcicolos e opistótonos, (BARNES & NOLAN, 2008). Como a *L. monocytogenes* pode ser isolada a partir de frangos aparentemente saudáveis, é possível que as aves portadoras exerçam um papel importante na disseminação da doença entre aves e mamíferos (FRASER, 1996).

Embora existam pesquisas que comprovam a presença de *L. monocytogenes* em diversos produtos alimentícios, como leite e derivados, legumes *in natura* e carnes contaminadas, reforça-se a necessidade de identificar as fontes de infecção e os possíveis alimentos envolvidos (BARANCELLI et al., 2011; HOFER et al., 2006; SILVA et al., 2007). Em pesquisa realizada pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal em 2014, foram analisadas 1.548 amostras de produtos prontos para consumo, sendo que em 29 (1,87%) foi identificado o patógeno *L. monocytogenes* (BRASIL, 2015).

A *L. monocytogenes*, além de permanecer viável em ambientes refrigerados, também apresenta alta capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilmes, aumentando, dessa forma, a probabilidade de contaminações ambientais (JEONG & FRANK, 1994).

Quanto à legislação brasileira, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece normas para controle de *L. monocytogenes* em alimentos, através da resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, e esta bactéria deve estar ausente em 25g de queijos de média, alta e muito alta umidade. Para produtos cárneos e outros alimentos, não existem limites regulamentados (BRASIL, 2001).

Já o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) que, através da Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009, institui os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo (BRASIL, 2009). Nesta IN, os procedimentos de autocontrole envolvem o conjunto de procedimentos adotados pelo estabelecimento que abrangem as Boas Práticas de Fabricação (BPF), os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), e o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para garantir a inocuidade de dos produtos de origem animal prontos para o consumo. Dentre os produtos analisados, destacam-se produtos cárneos, como salsicha e apresuntado, pescados e lácteos. Na análise são levados em consideração os fatores pH > 4,4, atividade de água > 0,92 e concentração de cloreto de sódio < 10%.

Conforme os dados descritos, percebe-se a importância de estabelecer não só procedimentos de higienização adequados, como também, medidas para controlar contaminações por *L. monocytogenes* na indústria de alimentos e, conseqüentemente, evitar contaminações em humanos. Além disso, não há dados que relacionem as fontes alimentícias envolvidas nos poucos surtos de listeriose que são relatados no país, o que denota a necessidade de programas mais eficientes para detectar patógenos, como ocorre em países como os Estados Unidos.

2.1.4 *Campylobacter jejuni*

O *Campylobacter* é uma bactéria Gram negativa com formato de um fino bastonete encurvado. São bactérias móveis, com flagelos uni ou bipolares, das quais

proporcionam um movimento característico em “serrote” ou “saca-rolha” (AZEVEDO & CERCA, 2012; FORSYTHE, 2013; OLIVER, 2005). São microaerófilos, requerem 3 a 5% de oxigênio e 2 a 10% de dióxido de carbono, mas sua tolerância é dependente da espécie. Seu crescimento ótimo ocorre entre 42°C e 46°C e não se multiplicam em temperatura ambiente ou sob refrigeração (FORSYTHE, 2013).

Morfológicamente, as células de *Campylobacter* de culturas jovens podem ter formato de asa de gaivota. Quando submetidas às condições adversas, como em culturas velhas, as células adquirem a forma cocoide, e neste último caso, são denominadas “viáveis mas não-cultiváveis” (VBNC). Bactérias nesse estado mantêm sua capacidade de virulência, porém diminuem seu metabolismo até que as condições sejam novamente favoráveis (OLIVER, 2005). As bactérias em estado viável mas não-cultivável não podem ser recuperadas quando métodos convencionais são utilizados (FORSYTHE, 2013). É também considerada uma bactéria fastidiosa por causa de sua dificuldade de crescimento e de manutenção em culturas laboratoriais (BRONOWSKI et al., 2014).

Atualmente, são descritas 32 espécies de *Campylobacter* e 13 subespécies, sendo que a espécie termofílica *Campylobacter jejuni* é o agente mais comum associado a gastroenterites em humanos, seguida por *C. coli* e *C. lari* (GONÇALVES et al., 2012; MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2014; SHANE & STERN, 2008).

O *Campylobacter* é encontrado tanto no ambiente quanto no trato gastrointestinal de animais silvestres, além de aves domésticas, bovinos, suínos e animais de estimação. A transmissão para o ser humano ocorre principalmente pela ingestão de carnes de aves cruas ou mal cozidas, produtos lácteos não pasteurizados, água, além de frutas e vegetais crus contaminados (AZEVEDO & CERCA, 2012; FORSYTHE, 2013). A contaminação de carcaças de frangos em matadouro-frigorífico é considerada o principal fator de risco para infecções humanas (CARVALHO et al., 2010; FORSYTHE, 2013; SHANE & STERN, 2008;).

O *Campylobacter* destaca-se como um dos principais agentes etiológicos de diarreia humana e lidera os relatos de DTA registrados nos Estados Unidos e em diversos países da Europa (CDC, 2016; EFSA, 2015). Nos Estados Unidos estimam-se anualmente mais de 1,3 milhões de casos de gastroenterite humana por *Campylobacter jejuni*, índice que já superou os casos de salmonelose (CDC, 2016; SHANE & STERN, 2008). Na Alemanha, a infecção causada pelo *Campylobacter* spp. se enquadra como segunda fonte mais importante de gastroenterite bacteriana aguda (GONÇALVES et al. 2012). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2014, apenas três casos de

DTA por *Campylobacter* spp. foram identificados. Porém, no mesmo período, aproximadamente 60% dos surtos do país tiveram seus agentes etiológicos ignorados ou inconclusivos. Também deve-se considerar a ocorrência de surtos que não foram notificados (BRASIL, 2015b).

A infecção por *Campylobacter*, ou campilobacteriose, se caracteriza por sintomas semelhantes a gripe, incluindo dores abdominais, febre e diarreia, que pode ser profusa, aquosa e frequentemente sanguinolenta, em crianças. Após a ingestão, *Campylobacter* spp. coloniza a mucosa e se adere às células intestinais, dificultando a capacidade de absorção devido à invasão celular e produção de toxina, e também pelo início da resposta inflamatória. Entre as toxinas normalmente produzidas pelo *Campylobacter* spp., cita-se a enterotoxina termossensível, toxina distensora citoletal (CLDT) e as citotoxinas proteicas termossensíveis (FORSYTHE, 2013). A toxina CLDT é a mais estudada, pois é um dos principais fatores de virulência relacionados à patogênese do *C. jejuni* em infecções humanas e animais, e atua causando progressiva distensão e morte em várias linhagens celulares (CARVALHO et al, 2009).

Além disso, a campilobacteriose também é conhecida como um fator precedente associado com o desenvolvimento da síndrome de *Guillan-Barré* (GBS) (FORSYTHE, 2013). A síndrome de *Guillan-Barré* é um distúrbio autoimune do sistema nervoso periférico, caracterizado por fraqueza normalmente simétrica, que pode levar a uma paralisia flácida aguda. Esta síndrome também pode ser causada por outros microrganismos como o Zika vírus, vírus *Epstein-Barr* e vírus influenza A (BERG et al., 2014; CARDOSO et al.; 2015). Em geral, os sintomas gastrointestinais ocorrem de 1 a 3 semanas antes dos sintomas neurológicos. Nos últimos anos, também tem sido demonstrada associação entre a infecção por *C. jejuni*, a GBS e a síndrome de *Muller - Fisher* (MFS), uma rara variante da GBS (CARVALHO et al.; 2010). Outra seqüela relatada é a Síndrome de Reiter, que possui uma manifestação clínica de artrite reativa. (FORSYTHE, 2013).

As carcaças de aves apresentam maior incidência de contaminação por *Campylobacter*. A contaminação ocorre frequentemente devido ao contato com o conteúdo intestinal durante abate, ou de ave para ave por meio dos equipamentos utilizados (ROSA, 2015). Diversas pesquisas brasileiras relatam a incidência de *Campylobacter* em aviários, matadouros-frigoríficos avícolas, além de carne de frango de varejo (FRASÃO et al.; 2015; GONÇALVES et al., 2012; KUANA, 2008; PERDONCINI, 2015; ROSA, 2015). Kuana et al. (2008) analisou lotes de frangos entre

3 e 5 semanas de idade e carcaças em matadouro-frigorífico, quanto a presença de *Campylobacter* spp., e houve positividade em 81,8% dos lotes e 100% das carcaças de frango analisadas. *Campylobacter* foi isolado a partir de 100% das amostras de conteúdo cecal de 80 frangos de corte de criação orgânica, sendo 68,75% correspondente à *C. jejuni* e 31,25% à *C. coli* (FRASÃO et al., 2015). Perdoncini et al. (2015) isolaram *Campylobacter* de 37,1% das carcaças refrigeradas por imersão, as quais 97,5% foram identificados como *C. jejuni* e 2,5% como *C. coli*. Todavia, apesar dos frequentes relatos de incidência deste patógeno em frangos, não há dados estatísticos no Brasil quanto à doença em humanos, principalmente pela falta de investigação deste agente em surtos de DTA.

Outro aspecto importante quanto à fonte de transmissão de *Campylobacter* é a partir da contaminação cruzada com outros alimentos durante o descongelamento e o processamento. Neste aspecto, a carcaça de frango adquire fundamental relevância, pois a água do descongelamento, em contato com alimentos ingeridos *in natura* ou outros utensílios, poderia explicar a origem dos frequentes surtos. Além disso, surtos de campilobacteriose podem estar relacionados com a dose infectante de *Campylobacter* ser relativamente baixa, da qual 500 a 1000 células, facilmente presentes em uma gota de água de degelo de frango cru, pode resultar em doença intestinal no homem (CARVALHO et al.; 2010; FORSYTHE, 2013).

O *Campylobacter* é essencialmente não-patogênico em aves domésticas comerciais. A infecção experimental pode induzir uma diarreia transitória nos pintinhos de um dia após administração oral com isolados entero-invasivos e patogênicos. Geralmente os lotes infectados com *C. jejuni* não apresentam nenhuma anormalidade clínica associada com a infecção. Depois da ingestão do *C. jejuni*, a colonização ocorre no jejuno distal, no ceco e na cloaca, com o microrganismo situado na camada mucosa. (SHANE & STERN, 2008). Por isso, a ocorrência de *Campylobacter* nas aves é considerada natural, pois este microrganismo é um integrante comensal da microbiota intestinal das aves e sua disseminação entre as aves é uma consequência.

Os procedimentos para reduzir a quantidade de infecção por *Campylobacter* spp. em matadouro-frigorífico de frangos podem potencialmente diminuir a taxa da contaminação das carcaças. Entretanto, ressalta-se que a contaminação por *Campylobacter* spp. de produtos das aves domésticas pode ser reduzida, mas não eliminada (SHANE & STERN, 2008). Quanto ao controle de *Campylobacter* spp. e outros patógenos, como *Salmonella* spp., na criação de frangos e em suas carcaças,

algumas medidas são discutidas, como: a competição por exclusão, através do uso de probióticos, na qual os frangos são inoculados com um coquetel de bactérias benéficas não patogênicas, que colonizam os seus intestinos e reduzem a incidência de portadores de *Salmonella* e *Campylobacter*; o desenvolvimento de uma vacina para controle de *C. jejuni*; e o tratamento de frangos com bacteriófagos, os quais reduzem a presença de *Campylobacter* nas carcaças (FORSYTHE, 2013).

Mundialmente, a Comissão do *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, que fazem parte das legislações de monitoramento e controle de riscos microbiológicos de países europeus e Estados Unidos (FAO/WHO, 2009). No Brasil, não existe legislação específica para análise de *Campylobacter* spp. nem por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Fornecimento ou pelo Ministério da Saúde. Ou seja, não há monitoramento obrigatório deste patógeno em granjas avícolas, nem em matadouro-frigorífico e produtos de origem animal, como carne de frangos e produtos derivados prontos para consumo, além de não haver exigência por parte de Órgãos Governamentais voltados à Saúde para isolamento de *Campylobacter* em casos de doença transmitida por alimento.

Para expandir a investigação de infecções por *Campylobacter*, é necessário analisar a ocorrência do patógeno em produtos de origem animal, vegetal e água, e seus potenciais riscos para a saúde humana. O estudo da formação de biofilmes por *Campylobacter* e seu controle em matadouro-frigorífico avícola é importante, pois pode ser uma forma de reduzir os surtos de DTA relacionados a este patógeno. Além disso, como surtos de *Campylobacter* são subnotificados no Brasil, é necessária a implementação de métodos efetivos para detecção deste patógeno em humanos. Portanto, é necessária a elaboração de um sistema de investigação criteriosa, por parte dos Laboratórios credenciados ao MAPA e MS, além da conscientização dos Órgãos Governamentais ligados à Saúde, de que esta zoonose está em nosso meio e precisa ser considerada.

2.2 Biofilmes na Indústria Avícola

A presença de biofilmes é comum na indústria de alimentos, onde grande quantidade de nutrientes está disponibilizada aos microrganismos (ANDRADE, 2008).

São a principal causa de contaminação do produto final, tendo como consequências a rejeição do produto, perdas econômicas e até mesmo doenças, caso agentes patogênicos alimentares estejam envolvidos. Estudos recentes revelam que a composição microbiana dos biofilmes é formada por vários microrganismos e apontam os patogênicos como uma das principais causas de contaminação de produtos alimentares e doenças. Além disso, são ainda causadores de problemas consideráveis de contaminação cruzada e de contaminação pós-processamento. Por estas razões, sua presença na indústria de alimentos é considerada um sério risco a saúde pública (AZEVEDO & CERCA, 2012).

Os biofilmes são definidos como populações microbianas embebidas por uma substância polimérica extracelular (EPS), aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON et al., 1995; NIKOLAEV et al., 2007). O ato de formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas e genotípicas nas células de vida livre ou planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos em ambientes com condições adversas (COSTERTON et al., 1999). Microrganismos na forma de biofilmes são mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização (ANDRADE, 2008; COSTERTON, 1999).

Cada comunidade de biofilme microbiano é única, embora alguns atributos estruturais possam ser considerados comuns a diferentes microrganismos (TOLKER-NIELSEN & MOLIN, 2000). As estruturas que formam o biofilme envolvem canais de água que fornecem passagens para a troca de nutrientes, metabólitos e produtos de resíduos (CORTÉZ et al., 2011; DONLAN, 2002). Além de microrganismos, os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam depósitos onde continuam a crescer, resultando em um cultivo puro ou uma associação (ANDRADE, 2008). A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzida pelas células sésseis é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme (OLIVEIRA et al., 2010). O EPS pode ser constituído de complexos polissacarídeos, substâncias proteicas e glicopeptídeos, lipídeos, lipopolissacarídeos e outros materiais que servem como uma estrutura de suporte que mantém o conjunto (CORTÉZ et al., 2011; COSTERTON et al., 1999).

O biofilme maduro consiste de microcolônias sobre uma superfície. As bactérias componentes destas microcolônias organizadas possuem heterogeneidade funcional, que envolve diferentes estágios de crescimento e de atividade metabólica, e células de diferentes regiões do biofilme, exibindo padrões singulares de expressão de genes

(COSTERTON et al., 1999). Podem apresentar diferentes distribuições espaciais, das quais microrganismos de diversas espécies podem compor estas microcolônias de forma isolada (monoespécie) ou de forma mista ou estratificada (multiespécies) (ELIAS & BANIN, 2012). Quanto maior a densidade microbiana dentro do biofilme pode haver comunicação entre eles, através de sinais célula-célula. Isso pode levar à secreção de moléculas de baixo peso molecular que indicam quando a população atinge um limiar crítico. Este processo, chamado de *quorum sensing*, é responsável pelos estímulos iniciais para formação de biofilmes e pela expressão de fatores de virulência (OLIVEIRA et al., 2010; SCHAUDER & BASSLER, 2001).

Para visualização da estrutura de biofilmes, várias técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos. A partir da microscopia de biofilmes, pôde-se perceber uma arquitetura heterogênea, com uma distribuição variável de células e agregados celulares, polímeros extracelulares e canais de água (COSTERTON et al., 1995). Dentre as principais tecnologias para visualização de biofilmes, destaca-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a microscopia confocal (CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*), e a microscopia de contraste diferencial (DIC- *Differential Interference Contrast*). De acordo com Wimpenny et al. (2000), a microscopia eletrônica de varredura pode ser uma informação útil sobre a superfície estrutural de um biofilme, apresentando mais um dado para o trabalho, enriquecendo a pesquisa sobre biofilmes. Já a microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (CLSM), é uma das técnicas mais sofisticadas que permite diferenciar células viáveis e não viáveis por meio da aplicação de corantes fluorescentes, além de diferenciar espécies microbianas pelo uso de sondas fluorescentes. Além disso, a técnica fornece informações detalhadas sobre a morfologia celular, metabolismo celular, filogenia da célula, química do microambiente, bem como o desenvolvimento da arquitetura física e química da matriz do biofilme e de polímeros associados (COSTERTON et al., 1995).

A formação de biofilmes microbianos ocorre numa sequência de eventos. Inicialmente, ocorre a adsorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos dos alimentos à superfície, formando um filme condicionante. A camada de nutrientes afeta as propriedades físico-químicas da superfície, como a energia livre, a hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam e dão condições à colonização microbiana (FORSYTHE, 2013; OLIVEIRA et al., 2010).

Na etapa seguinte, os microrganismos planctônicos recebem estímulos, como sinais de *quorum sensing* e biodisponibilidade de nutrientes, e se aderem à superfície

condicionada (FORSYTHE, 2013; OLIVEIRA et al., 2010). A adesão das bactérias é inicialmente denominada como reversível, com atuação de forças de interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas, que vão ocasionar uma fraca adesão entre as duas superfícies, a célula bacteriana e a superfície de interesse (COSTERTON et al. 1995; FORSYTHE, 2013). Na adesão chamada irreversível, ocorre uma interposição molecular entre a superfície e flagelos, fímbrias, adesinas e a matriz de EPS. As forças exercidas nas ligações irreversíveis envolvem interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas. A matriz ou EPS fortalece a adesão célula-célula e célula-superfície e também protege as células contra desidratação, fortalecendo o contato (FORSYTHE, 2013; HOOD & ZOTTOLA, 1995).

Os microrganismos, quando na etapa designada irreversível, se multiplicam e dividem-se, aumentando as microcolônias que depois coalescem para formar uma camada de células que cobre a superfície (FORSYTHE, 2013). Durante essa fase, as células produzem polímeros adicionais que aumentam sua fixação e estabilizam a colônia contra variações do ambiente. A adesão continua e a multiplicação das células bacterianas, junto com a formação de EPS e o aumento populacional, conduzem à maturidade dos biofilmes (CHENG et al., 2007; FORSYTHE, 2013). A camada de biofilme pode chegar a ter vários milímetros de espessura em poucos dias. Na etapa final, após a maturação, o biofilme começa a desprender-se, possibilitando a descamação de partículas. As bactérias desprendidas podem contaminar alimentos ou iniciar a formação de um novo biofilme na linha de produção (FORSYTHE, 2013).

Do ponto de vista microbiológico, caso haja falhas nos programas de qualidade e segurança nas indústrias alimentícias e higienização deficiente, microrganismos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e acúmulo de resíduos e microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes. A adesão das bactérias aos alimentos ou às superfícies de processamento podem causar problemas de higiene e perdas econômicas. Também é conhecida a persistência de vários agentes patogênicos alimentares em superfícies de contato com alimentos resultando em sérios problemas de saúde pública ou de ordem econômica (AZEVEDO & CERCA, 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

Biofilmes microbianos também ocasionam o processo denominado corrosão microbiologicamente induzida, prejudicando a transferência de calor entre superfícies e

reduzindo a vida útil dos equipamentos (MANSFELD, 2007). Em sistemas de água potável, por exemplo, os biofilmes podem entupir canalizações levando a diminuição da velocidade e da capacidade de carga, o que implica em maiores gastos de energia (AZEVEDO & CERCA, 2012). Como consequência, há despesas acrescidas de manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos (OLIVEIRA et al., 2010).

2.2.1 Biofilmes monoespécie e multiespécies

Vários tipos de microrganismos podem formar biofilmes, seja eles fungos, bactérias ou protozoários, sob diferentes condições e com comportamentos variáveis (COSTERTON et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2010). Entretanto, nas indústrias de alimentos, são as bactérias que mais frequentemente produzem biofilmes, (OLIVEIRA et al., 2010).

Na indústria de carnes, o perigo de contaminação já existe no abate dos animais. Nesta fase, a presença de matéria fecal dos animais abatidos pode contaminar a carne que vai ser processada com níveis elevados de bactérias, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes* (AZEVEDO & CERCA, 2012). Existem vários estudos que comprovam que estas bactérias patogênicas são capazes de formar biofilmes monoespécie em superfícies de processamento de alimentos, porém, há poucos estudos que avaliem a interação interespécie entre elas, o que denota grande importância para a pesquisa realizada neste trabalho.

Biofilmes constituídos de uma única espécie, conhecidos como biofilmes monoespécie, são menos habituais na natureza. Este tipo de biofilme pode ocorrer quando um microrganismo dominante inicia as etapas de adesão e, ao poucos, via sinais de *quorum sensing*, outros microrganismos vão se aderindo ao biofilme pré-formado (ELIAS & BANIN, 2012). Além disso, estudos *in vitro* de biofilmes monoespécie são fundamentais para caracterizar o nível de organização microbiana, incluindo sinalizações em resposta ao número e identidade de células presentes dentro e circundantes (BURMØLLE et al., 2014). Na área médica, é comum a formação de biofilme bacterianos em dispositivos médicos, como cateteres, sondas uretrais e próteses. Inicialmente, esses biofilmes são compostos de uma única espécie, mas dependendo do dispositivo e por

exposições mais prolongadas, podem levar a formação de biofilmes multiespécies (DONLAN, 2001).

Biofilmes multiespécies, ou mistos, são a forma dominante na natureza e também estão presentes em hospedeiros humanos e animais. As espécies que constituem biofilmes multiespécies e as interações entre esses microrganismos têm influência decisiva no desenvolvimento e forma da comunidade. Em geral, interações interespécies envolvem comunicação, normalmente através de *quorum sensing*, e cooperação metabólica ou competição (ELIAS & BANIN, 2012; YANG et al., 2011).

Interações de cooperação em biofilmes multiespécies, podem resultar no desenvolvimento de vários fenótipos benéficos, da qual os microrganismos beneficiam-se entre si. Dentre este fenótipos, destacam-se as interações de coagregação, onde ocorre um reconhecimento altamente específico que facilita a aderência de bactérias geneticamente distintas (VORNHAGEN et al., 2013). Substâncias estruturais como o EPS e proteínas adesinas são compartilhados entre os microrganismos de espécies distintas mas fisiologicamente compatíveis. Outra característica importante em interações de cooperação envolvem a coagregação de bactérias anaeróbicas e aeróbicas. A cooperação metabólica é outra característica que envolve benefícios entre os microrganismos, onde uma espécie utiliza um metabólito produzido por uma espécie vizinha (ELIAS & BANIN, 2012).

As interações benéficas em biofilmes mistos têm implicações ambientais, industriais e clínicas importantes (ELIAS & BANIN, 2012). Por exemplo, a sobrevivência e crescimento de organismos patogênicos dentro biofilmes também podem ser melhorados pelas interações metabólicas interespecíficas (AKBAS et al., 2015). Além disso, as interações de coagregação entre microrganismos de várias espécies dentro de um biofilme, podem induzir a evolução de espécies, tornando os microrganismos mais resistentes às adversidades e, conseqüentemente, mais patogênicos (ELIAS & BANIN, 2012; HANSEN et al., 2007; YANG et al., 2011). Estas últimas consomem o oxigênio e, assim, proporcionam condições anaeróbicas dentro das camadas mais profundas do biofilme onde bactérias anaeróbicas podem se multiplicar (ELIAS & BANIN, 2012).

Interações que envolvem competição são comuns em biofilmes multiespécies e envolvem concorrência, para limitar fontes de nutrientes ou pela produção de compostos antimicrobianos (por exemplo, bacteriocinas) que inibem o crescimento de outras espécies (GIAOURIS et al., 2014). Algumas bactérias competidoras podem invadir comunidades multiespécies e se aproveitar dos nutrientes deste nicho. Ou, ainda, iniciar

um biofilme e secretar substâncias antimicrobianas que evitem a adesão de certas espécies (ELIAS & BANIN, 2012).

Ademais, a secreção de substâncias antimicrobianas podem enfraquecer as interações cooperativas entre as bactérias de um biofilme misto, reduzir a colonização bacteriana e provocar aumento da dispersão celular (ELIAS & BANIN, 2012). Como exemplo de compostos antimicrobianos sintetizados em interações de competição, pode-se citar os biossurfactantes, enzimas proteases e nucleases, polissacarídeos e enzimas de *quorum quenching*. Estas últimas degradam as moléculas de *quorum sensing*, bloqueiam a comunicação celular bacteriana e evitam com que outras bactérias sejam aderidas (ELIAS & BANIN, 2012; TRENTIN et al., 2013).

A maioria dos sorovares de *Salmonella*, incluído o sorovar Enteritidis, consegue crescer em superfícies de diversos materiais e condições de crescimento, além de formar biofilmes (AZEVEDO & CERCA, 2012; GIAOURIS, 2015). A maioria das cepas deste microrganismo consegue crescer em superfícies e formar biofilmes em materiais de natureza distinta e sob diferentes condições de crescimento. Além disso, sabe-se que *S. Enteritidis* produz uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS) basicamente composta por celulose, e possui finas fímbrias agregativas (*Tafi*, do inglês Thin Aggregative Fimbriae) que facilitam a adesão a superfícies abióticas e fornecem resistência às células contra forças mecânicas (AZEVEDO & CERCA, 2012). O papel de fímbrias e outros antígenos de superfície na persistência ambiental, e como potenciais alvos para estratégias de intervenção no controle de *Salmonella* em processamento de carnes, são enfoque de estudos atuais (GIAOURIS et al., 2015).

Biofilmes de *L. monocytogenes* têm sido encontrados em superfícies plásticas, polipropileno, aço inoxidável, vidro e borrachas, teflon e madeira (JEONG & FRANK, 1994; VLKOVÁ, 2008). O grau de aderência da *L. monocytogenes* nas superfícies varia de acordo com o tipo de superfície, pré-tratamento da superfície, presença de matéria orgânica, sorotipo da bactéria e bactérias ambientais concorrentes (THÉVENOT, 2006; AZEVEDO & CERCA, 2012). Além disso, condições ambientais como alta disponibilidade de nutrientes e concentração de NaCl até 10%, o pH, e a temperatura podem também ter um papel na taxa de adesão bacteriana a uma superfície (JAY, 2005; TRACHOO, 2003). A presença de flagelos em *L. monocytogenes*, também tem sido indicada como um fator importante no início da fixação de células em uma superfície, principalmente pela propriedade adesiva da proteína flagelina (CALY et al. 2009; COSTERTON, 1995). Já a perda da motilidade flagelar resultou em menor fixação inicial

mas provocou um aumento na formação do biofilme (DONLAN, 2002; LEMON et al., 2007; TODHANAKASEM et al., 2008).

Entretanto, tem-se relatado que este microrganismo é bastante dependente de fatores para formar biofilmes, como a superfície alvo, pré-tratamento da superfície alvo, pH, temperatura, e presença de outras espécies. Certas cepas podem não formar biofilmes monoespécie, mas podem formar biofilmes quando uma bactéria colonizadora primária de outra espécie forma um consórcio de biofilmes numa superfície (AZEVEDO & CERCA, 2012; GIAOURIS et al., 2015). Biofilmes microbianos por *L. monocytogenes* são frequentemente relatados e podem estar contribuindo para a perpetuação deste microrganismo na carne de frango e conseqüentemente, trazendo problemas à saúde pública.

Campylobacter jejuni tem mostrado formar biofilmes sob condições similares em superfícies abióticas e ambientes bióticos de hospedeiros animais, envolvendo baixa disponibilidade de nutrientes e alta concentração de oxigênio (SVENSSON et al., 2008). Apesar de ser considerado um microrganismo de crescimento fastidioso e de relativa fragilidade, o *C. jejuni* é comumente encontrado em ambiente aquático sobrevivendo dentro de biofilmes multiespécies (ICA et al., 2012; SVENSSON et al., 2008). Vários estudos relatam resultados análogos quanto à formação de biofilmes por *C. jejuni* sob atmosfera de microaerofilia e aerobiose, e alguns deles, relatam que condições de aerobiose e baixa disponibilidade de nutrientes levam a formação de biofilmes mais rapidamente (BRONOWSKY et al., 2014; JANG et al., 2007; ICA et al., 2012; REUTER et al., 2010; SULAEMAN et al. 2012;). Entretanto, *C. jejuni* pode entrar em um estado viável, mas não cultivável (VBNC) em meios de cultura seletivos, pois biofilmes podem ser formados após *C. jejuni* serem submetidos a condições ambientais adversas, tais como falta de nutrientes, choque osmótico, e flutuações de temperatura e pH (SUNG & KHUN, 2015; MAGAJNA & SCHRAFT, 2015).

C. jejuni compõe parte da microbiota mista de biofilmes em ambientes aquáticos e em muitos tipos de superfícies, tais como pisos, paredes, tubos e drenos, e superfícies de equipamentos, incluindo aço inoxidável e polímeros (SUNG & KHAN, 2015). Por isso, certas espécies de *Campylobacter* podem permanecer no ambiente de processamento de carnes de frango, contaminarem o produto final e conseqüentemente, o próprio consumidor. A formação de biofilmes colabora para justificar o fato deste patógeno permanecer viável em alimentos como a carne de frangos e, portanto, ser considerado o maior causador de surtos de gastroenterite em humanos no mundo.

A capacidade das *E. coli* patogênicas se aderirem e se manterem nas superfícies de processamento, constitui um grande problema de higiene para a indústria da carnes (GIAOURIS, 2015). Cepas de *E. coli* são consideradas um dos modelos para o estudo da adesão e formação de biofilme (BELOIN et al., 2008). Por isso, diversas são as pesquisas a respeito de interações de *E. coli* com superfícies, tanto *in vivo* como *in vitro*, seu comportamento em comunidades de biofilmes mono e multiespécies, formas de controle na indústria e em infecções humanas causadas por biofilmes (ALTEKRUSE et al., 2009; ANDRADE, 2008; BELOIN, 2008; BELLUCO et al., 2016; RODRIGUES, 2009; TRENTIN et al., 2013).

Estudos genéticos de *E. coli* desvenderam um repertório amplo de proteínas adesinas, genes de resistência e fatores de virulência, envolvidos na formação do estilo de vida em biofilme, conferindo maior competitividade com relação ao potencial patogênico das demais espécies bacterianas (BELOIN et al., 2008). Diversos grupos de *E. coli* causadoras de gastroenterite, como EPEC e STEC, e *E. coli* comensal, são capazes de formar biofilmes em diversas condições ambientais, incluindo superfícies de processamento de alimentos, superfícies de dispositivos médicos e suas células hospedeiras adjacentes (CULLER, 2010; ALIATTI, 2013; RODRIGUES et al., 2009). Por esses e outros fatores, *E. coli* pode passar de uma simples colonizadora comensal do trato intestinal para um patógeno oportunista extremamente ofensivo, podendo causar inúmeras infecções intestinais e extra-intestinais em humanos (REISNER et al., 2006; TORTORA et al. 2012).

Bactérias patogênicas, como *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*, juntamente com bactérias deteriorantes da carne, como *Pseudomonas* spp., crescem predominantemente em biofilmes em superfícies na maioria dos habitats, como ambientes de processamento de carne, em vez de crescerem em modo planctônico (GIAOURIS et al, 2014). Sabe-se que estes microrganismos, em condições de biofilmes, são mais resistentes à ação de sanitizantes, antimicrobianos e agentes físicos e, se associados em biofilmes de espécies mistas, poderão ter interações de cooperação que beneficiam seu crescimento e aumentam sua capacidade de sobrevivência no ambiente (ANDRADE, 2008; COSTERTON et al, 1999; GIAOURIS et al., 2015).

É necessária maior compreensão quanto à interação interespecie, e, principalmente, sobre como inativar as células de múltiplas espécies em biofilmes. Estes fatores, devem ser compreendidos principalmente a respeito de biofilmes formados em

superfícies abióticas, como instalações de processamento de alimentos, para evitar a sua formação, e conseqüentemente, reduzir o potencial de contaminação do produto final e a veiculação de doenças transmitidas por alimentos.

2.2.3 Superfícies de adesão

A adesão de microrganismos a superfícies bióticas e abióticas é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos. As propriedades superficiais do material, como carga, hidrofobicidade e tensão, as propriedades superficiais dos microrganismos, como EPS e apêndices celulares (flagelo, fímbrias, proteínas adesinas), em conjunto com as propriedades do meio aquoso (nutrientes, pH, força iônica, temperatura), são fundamentais para que a etapa de adesão se consolide (AZEVEDO & CERCA, 2012). As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais) (DONLAN & COSTERTON, 2002). Além disso, superfícies rugosas ou ásperas, proporcionam áreas para depósito de nutrientes e colonização, uma vez que protegem as bactérias da remoção mecânica (FORSYTHE, 2013).

Os materiais de superfícies, comumente usados no processamento de alimentos, incluem aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro. Estas superfícies permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes (ANDRADE, 2008). Além disso, com o uso constante, estes materiais sofrem desgastes e a possibilidade do acúmulo de sujidades e bactérias é aumentada (HOLAH; THORPE, 1990).

O aço inoxidável é um dos materiais mais utilizados em equipamentos para a preparação de alimentos, tanto em nível industrial quanto doméstico. Esta liga metálica composta de carbono, cromo e níquel é resistente à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes, além de resistir à altas temperaturas. É um material liso e impermeável, mas quando corroído ou danificado, pode acumular resíduos de alimentos e microrganismos. O aço inoxidável é facilmente higienizado quando comparado com cobre, alumínio e com a ampla variedade de polímeros, porém, pode

sofrer corrosão com produtos à base de halogênios (cloro, flúor e iodo) (ANDRADE, 2008; BERNARDES, 2012).

Os polímeros também são largamente utilizados na indústria de alimentos, pois são capazes de prevenir mudanças e deterioração no material de embalagem devido a influências externas, como presença de oxigênio, luz e microrganismos. O polietileno é um polímero termoplástico produzido a base de petróleo e é componente das placas de corte de alimentos (ANDRADE, 2008). Em razão à grande variedade de alimentos que são preparados em residências, estabelecimentos comerciais e indústrias, um dos principais cuidados com essas placas é a contaminação cruzada, a qual está muito relacionada com a capacidade de adesão das bactérias contaminantes (CARPENTIER, 1997). Além disso, as placas de corte de polietileno apresentam superfícies irregulares, o que facilita a deposição de material orgânico dificultando a ação de agentes sanitizantes (SINDE & CARBALLO, 2000).

Os poliuretanos, também conhecidos como policarbamatos, são polímeros termoestáveis de elevada durabilidade, resistência a ácidos, à oxidação, à abrasão e à radiação gama, mas não são muito resistentes a alcalinos. Dentre as aplicações na indústria alimentícia, destacam-se o uso em revestimentos de correias transportadoras, como isolante térmico na cadeia do frio e como material das esteiras de transporte industrial (ANDRADE, 2008).

A colonização das superfícies de processamento de alimentos pode ocasionar diversos problemas na indústria alimentar, tanto de ordem econômica como de saúde pública. A falta de eficiência de procedimentos de higienização e limpeza permite o desenvolvimento de biofilmes nessas superfícies, o que constitui uma potencial fonte de contaminação dos alimentos (AZEVEDO & CERCA, 2012). O processo de remoção de biofilmes das superfícies de processamento de alimentos torna-se difícil depois da etapa de adesão irreversível entre microrganismo e superfície. Há necessidade de aplicação de intensa força mecânica ou interrupção química da força de aderência pelo tradicional uso de detergentes e sanitizantes. No entanto, há uma elevada probabilidade de que as células aderidas irreversivelmente permaneçam mesmo após a higienização (OLIVEIRA et al, 2010). Além disso, a resistência microbiana a sanitizantes já é relatada, sendo necessário encontrar novas maneiras e compostos para o controle dos biofilmes (AZEVEDO & CERCA, 2012).

2.3 Higienização na Indústria Avícola

Um dos principais problemas da indústria alimentar consiste na sobrevivência de patógenos alimentares ou de microrganismos deteriorantes dos alimentos, devido a uma desinfecção insuficiente das superfícies ou instrumentos que entram em contato com alimentos (AZEVEDO & CERCA, 2012). Na indústria avícola, há muitos relatos a respeito de formação de biofilmes bacterianos em superfícies de processamento da carne de frango e também na própria carne, além de haver muitos estudos quanto ao desenvolvimento e propagação destes biofilmes, bem como formas de prevenção e controle eficazes (GIAOURIS et al., 2015; SREY et al., 2013). Portanto, a principal estratégia para evitar a formação e contaminação de produtos alimentares é a prevenção através da limpeza e desinfecção de forma regular, de modo a não permitir que as células se fixem firmemente e entrem em contato com superfícies (MIDELET & CARPENTIER, 2004; SIMÕES et al., 2006; SIMÕES et al., 2010).

Falhas nos procedimentos de higienização podem levar a permanência de resíduos de alimentos nos equipamentos e, sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam a formação de biofilmes. Além disso, estes procedimentos não são totalmente eficazes em estruturas de biofilmes, o que podem induzir a seleção de fenótipos resistentes (KASNOWSKI et al., 2010; SIMÕES et al., 2010). Outros fatores que implicam na deficiência de procedimentos de higienização diante de biofilmes envolvem características da superfície alvo, presença de matéria orgânica, *design* dos equipamentos, seleção de detergentes e sanitizantes ineficazes ou preparo de diluições e tempo de ação inapropriados, entre outros.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para a produção de alimentos seguros, ou seja, uma produção em condições higiênico-sanitárias adequadas mantendo as características nutritivas destes alimentos, existem três estágios: as Boas Práticas de Higiene (BPH), na produção e preparação de alimentos, a fim de reduzir a prevalência e a concentração de perigos microbiológicos; a aplicação de Análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), a qual age preventivamente na identificação e controle dos perigos, sejam eles físicos, químicos ou microbiológicos; e a Análise de risco, focada nas consequências da ingestão dos perigos microbiológicos para humanos e a ocorrência do perigo em toda a cadeia alimentar. Embora a indústria alimentícia e órgãos regulatórios lutem por sistemas de produção e processamento que

garantam a completa segurança de todo o alimento, a ausência total de riscos é uma meta inatingível (FORSYTHE, 2013).

Na indústria de carnes, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) é responsável pela inspeção higiênico-sanitária de alimentos de origem animal. Para auxiliar nesta tarefa, o DIPOA estabeleceu programas de autocontrole, que envolvem requisitos básicos para a garantia da inocuidade dos produtos. Estes programas incluem o Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional – PPHO, o tradicional Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC e, num contexto mais amplo, as Boas Práticas de Fabricação – BPFs (BRASIL, 2005).

O Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) deve contemplar procedimentos de limpeza e sanitização que são executados antes do início das operações (pré-operacionais) e durante as mesmas (operacionais) (BRASIL, 2005). A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais. Nesta etapa, geralmente, são empregados água quente sob pressão e detergentes (ANDRADE, 2008). Após a limpeza, o número de microrganismos sobreviventes ainda é elevado, o que faz da sanitização, através do uso de agentes químicos biocidas, procedimento obrigatório (OLIVEIRA et al., 2010; AZEVEDO & CERCA, 2012).

Os procedimentos de higienização num matadouro-frigorífico avícola, que são realizados após o término do processo produtivo, compreendem as etapas: a) remoção de resíduos sólidos; b) pré-enxague com água quente (45°C); c) Aplicação de detergente; d) enxágue com água; e) sanitizantes e f) enxágue com água. Esse processo é realizado em 12 horas ou 24 horas, no final do turno de abate, e compreende a higiene pré-operacional. Durante o dia, em tempos de 4 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção, que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxague (CONTRERAS et al., 2003). O uso de água quente a 45°C nas etapas de enxague propiciam maior aderência em superfícies levando a formação de biofilmes (WEBBER, 2015). O uso de água quente a 85°C para higienização de utensílios, e o uso de detergentes e sanitizantes, como hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, são comumente utilizados nos processos de higienização de salas de corte nos frigoríficos do Brasil (CONTRERAS et al., 2003).

Durante os procedimentos de limpeza e desinfecção, é importante levar em consideração as características e cuidados com o material de superfícies comuns em indústrias de alimentos, como o aço inoxidável e polímeros. Também são necessárias

informações sobre a qualidade da água, a solubilidade, a facilidade de remoção pela ação de água ou detergentes alcalinos ou ácidos e o efeito do tratamento térmico nos diversos resíduos presentes nas superfícies (carboidratos, gordura, proteínas e sais minerais). Ainda, com relação aos sanitizantes, é necessário conhecer suas funções, suas concentrações de uso, seus modos de ação, como e onde poderão ser empregados e forma correta de prepará-los (ANDRADE, 2008).

Para que os procedimentos de higienização garantam que instalações e equipamentos, bem como, seus produtos cárneos processados estejam de acordo com as condições higiênico-sanitárias exigidas, as legislações estabelecem temperaturas específicas nos ambientes de processamento da carne de frango. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, através da Portaria nº 210 de 1998 (BRASIL, 1998), dispõe que estabelecimentos que realizarem cortes e/ou desossa de aves devem garantir temperatura ambiente neste setor, não superior a 12°C, onde a temperatura das carnes manipuladas não poderá exceder 7°C. Entretanto, os estabelecimentos que exportam seus produtos para a União Europeia (UE) preferencialmente, devem manter a temperatura não superior a 12°C nas salas de corte, conforme estabelecido pela regulamentação 853/2004/CE da Comissão Europeia (União Europeia, 2004).

A temperatura de refrigeração para os produtos avícolas, como carcaças, cortes ou recortes, miúdos e/ou derivados, deve estar entre 0°C a 4°C, com tolerância de 1°C. Por isso, o pré-resfriamento dos produtos avícolas deve ser feito em com temperatura da água no máximo até 4°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves (BRASIL, 1998). A refrigeração de produtos cárneos é uma prática que visa reduzir a intensidade de crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos que podem estar presentes após o processamento industrial.

Desta forma, as temperaturas utilizadas no presente estudo simulam as temperaturas preconizadas em matadouro-frigorífico avícola: 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura de refrigeração; e temperatura de sala de cortes, máximo de 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 pela termotolerância de *Salmonella* e temperatura ótima para bactérias termófilas, como *Campylobacter*).

A descrição correta do passo-a-passo dos métodos de higienização manual ou mecânica com enfoque na pré-lavagem, aplicação do detergente, enxágue e sanitização é fundamental na obtenção de alimentos seguros e de qualidade (ANDRADE, 2008). Um

procedimento de limpeza eficaz, além de reduzir o número de microrganismos, pode romper ou dissolver a matriz de EPS associada com os biofilmes de modo que os sanitizantes podem ter acesso às células viáveis (SIMÕES et al., 2006).

2.3.1 Métodos químicos de desinfecção

O procedimento de higienização nos matadouro-frigoríficos de aves consiste fundamentalmente no uso de água quente, detergentes e sanitizantes, este último também chamado de biocida. Ainda que os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos (ANDRADE, 2008). A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa a eliminação dos microrganismos patogênicos e à redução dos microrganismos alteradores a níveis que atendam às especificações previamente propostas de modo a se obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (ANDRADE, 2008; MORAES et al., 1997; SILVA, 2014).

A escolha do sanitizante químico apropriado, nas indústrias de alimentos, é essencial para evitar a disseminação da contaminação microbiana e para o controle de biofilmes em superfícies (SILVA et al., 2014). Quanto a sua aplicação, é de extrema importância seguir as recomendações de uso do fabricante, obedecendo às concentrações e frequências de aplicação indicadas.

Deve-se selecionar sanitizantes que sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os microrganismos (ANDRADE, 2008). Além disso, devem ser eficazes, estáveis, de baixa corrosividade, seguros e fáceis de usar, sem deixar resíduos tóxicos que poderiam afetar as propriedades saudáveis e os valores sensoriais dos produtos finais (SIMÕES et al., 2010). Não existe um sanitizante que apresente todas essas características desejáveis. Assim, é necessário conhecer as propriedades, vantagens e desvantagens de cada sanitizante disponível para que seja selecionado o mais apropriado a cada aplicação específica (ANDRADE, 2008).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto inorgânico que apresenta forte ação oxidante devido à liberação de oxigênio, que possui atividade sobre microrganismos Gram positivos e Gram negativos (ANDRADE, 2008). É um dos desinfetantes amplamente utilizados devido à sua alta capacidade de oxidação em função da produção

de radicais livres que afetam a matriz de biofilmes (DE CARVALHO, 2007). O H_2O_2 é conhecido por ser uma solução segura que não causa reações alérgicas, podendo ser utilizado a uma alta concentração, sem afetar negativamente a qualidade do produto (SREY et al., 2013). Na indústria de alimentos, o peróxido de hidrogênio é usado como sanitizante quando se encontra nas concentrações entre 0,3 % e 6 % e pH 4,0, desde a temperatura ambiente até 80 °C, durante 5 a 20 minutos de contato. Também são utilizados em formulações de sanitizantes à base de ácido peracético. As soluções de peróxido de hidrogênio apresentam baixa toxicidade e não requerem enxague. Como desvantagens, são corrosivos ao cobre, zinco e bronze; se usadas em baixas temperaturas, requerem longo tempo de contato; exigem precaução no manuseio; e a concentração do princípio ativo deve ser controlada (ANDRADE, 2008).

O hipoclorito de sódio ($NaClO$) é um composto químico inorgânico do grupo dos clorados, amplamente utilizado nos processos de desinfecção na indústria alimentícia (ANDRADE, 2008). Este composto é efetivo contra grande variedade de microrganismos, inclusive esporos bacterianos e vírus. Estudos recentes demonstram sua eficácia na inativação de biofilmes (SREY et al., 2013; TOTÉ et al. 2010; OZDEMIR et al., 2010). É um dos sanitizantes mais baratos encontrados no mercado, eficaz em diferentes diluições, de fácil preparo e aplicação. Dentre as desvantagens do uso do hipoclorito de sódio, encontram-se a instabilidade ao armazenamento, inativação pela matéria orgânica, são altamente corrosivos, pois danificam juntas de peças de borrachas. Podem irritar a pele, mucosa e vias respiratórias dos manipuladores (ANDRADE, 2008; NASCIMENTO et al., 2010). A ação antimicrobiana dos compostos clorados está relacionada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma dissociada (ANDRADE, 2008).

2.3.2 Métodos físicos de desinfecção

Quanto aos métodos físicos de desinfecção utilizados na indústria alimentícia, destacam-se o calor e a luz ultravioleta (ANDRADE, 2008). O meio físico tipicamente utilizado pela indústria avícola é a sanitização térmica. Esta tem um custo elevado, porém é empregada onde a sanitização química não pode ser feita, e normalmente na forma de vapor ou água quente sob pressão. A temperatura da água ou vapor vai determinar o

tempo de exposição. Quanto mais quente, menor o tempo de sanitização agindo na degradação de proteínas dos microrganismos (NASCIMENTO et al., 2010).

O calor, quando possível, deve ser o agente sanitizante escolhido pois atinge toda a superfície, incluindo pequenos orifícios e ranhuras e não é seletivo diante de microrganismos (NASCIMENTO et al., 2010). Em matadouros-frigoríficos avícolas, o uso da água quente ocorre para enxague de pisos, paredes e ralos, além de equipamentos e utensílios. Conforme Portaria N° 210/1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, água quente a 85°C é utilizada para higienização de recipientes destinados ao transporte de carcaças, como bandejas, carrinhos e utensílios de manipulação das carcaças. Utensílios, como facas de corte, são higienizados em dispositivos especiais que não envolvem pressão de água, chamados de “higienizadores”, da qual foi simulado neste experimento através do tratamento das superfícies com água a 85°C.

Um bom processo de higienização, que remova todos os resíduos de alimentos e de outros compostos, podem evitar a proliferação de bactérias e a formação de biofilme (SIMÕES et al. 2010; SREY et al., 2013). Pelos problemas causados pelo biofilme, a monitoração e avaliação da efetividade da higienização em superfícies de processamento de alimentos, como o aço inoxidável, o polietileno e o poliuretano, constituem um ponto crítico no controle de qualidade higiênico-sanitária. Além disso, biofilmes multiespécies são mais difíceis de serem erradicados quando comparados aos biofilmes monoespécie, pois as interações interespécies promovem maior resistência, adquirida, principalmente, através de trocas de informação genéticas.

As consequências de um controle ineficiente de higiene podem levar a doenças transmitidas por alimento, perdas de lotes produzidos e interrupção de processos de produção (HAYES, 1993). Neste contexto, a avaliação de formação de biofilmes multiespécies por *S. Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni* e a mimetização de procedimentos de higiene pré-operacional e operacional nas superfícies de contato com alimento, em diferentes temperaturas, é de extrema relevância na avaliação das condições higiênico-sanitárias de matadouro-frigorífico de aves. Estas informações auxiliam a indústria avícola a ter um maior conhecimento das reais condições dos matadouros-frigoríficos no Brasil, levando a um aprimoramento das condições higiênicas destes estabelecimentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes de avaliação da formação de biofilmes monoespécie, teste de eficácia com sanitizantes em células planctônicas e biofilmes multiespécies foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário e no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV/UPF).

3.1 Biofilmes monoespécie de *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em microplaca de poliestireno

3.1.1 Amostragem

As bactérias utilizadas neste estudo são de origem avícola e de surto de doença transmitida por alimento. Em experimentos anteriores, as cepas de origem avícola *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni* foram previamente isoladas de carcaças de frango e superfícies de processamento de matadouro-frigorífico de aves.

A amostra de *Salmonella* Enteritidis (SE), neste experimento designada como SE24, havia sido previamente isolada de coprocultura de pacientes envolvidos em surtos com alimentos de origem avícola, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eduardo César Tondo. O sorovar foi confirmado geneticamente por *Microarray* pelo equipamento *Check&Trace* (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Esta cepa foi selecionada devido à presença de genes de formação de biofilme e grande capacidade de formação de biofilme em poliestireno, aço inoxidável, poliuretano e polietileno, características estas que foram testadas em experimentos anteriores realizados na Universidade de Passo Fundo (RODRIGUES, 2009; SILVA, 2014; OLIVEIRA et al., 2015). A cepa padrão utilizada foi a *S. Typhimurium* ATCC 14028.

As amostras de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* foram previamente isoladas de superfícies de matadouro-frigorífico avícola. As *L. monocytogenes*, neste experimento identificadas como L4 e L5, e *Escherichia coli*, designada como C7, foram isoladas de superfície de esteiras de transporte de poliuretano, após tratamento com água

quente (RODRIGUES et al., 2009). A cepa padrão de *L. monocytogenes* foi a ATCC 7644 e de *E. coli* foi a ATCC 25922.

As cepas de *Campylobacter jejuni* foram previamente isoladas de carcaças de frango resfriadas, coletadas em matadouro-frigorífico avícola e confirmadas por metodologia convencional (ISO 10272-1/ 2006) e pela técnica de *Multiplex-PCR* (PERDONCINI et al., 2015). Neste experimento, as 7 cepas utilizadas foram designadas como CJ03, CJ35, CJ42, CJ127, CJ134, CJ135, CJ136. A cepa padrão de *C. jejuni* utilizada foi a ATCC 29428.

As cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* foram estocadas a -20°C em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI, HiMedia®) com 20% de glicerol e as de *Campylobacter jejuni*, foram estocadas a -80°C em caldo Bolton com 20% de glicerol. Estes microrganismos foram reativados, utilizando meios seletivos e testes bioquímicos específicos para cada espécie para verificar a pureza.

3.1.2 Preparação do inóculo

Inicialmente, as cepas previamente isoladas de *S. Enteritidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Campylobacter jejuni*, juntamente com as cepas padrão ATCC, foram enriquecidas em caldo BHI e semeadas em meios de cultura seletivos: *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* – mCCDA, (Oxoid®), para *C. jejuni*; *Eosin Methylene Blue Agar* – EMB (Oxoid®) para *E. coli*; *Xylose Lysine Desoxycholate Agar* – XLD (Oxoid®) para *S. Enteritidis*; e *Agar Listeria Palcam* (Biolog®), para *L. monocytogenes*. Colônias puras de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes* foram semeadas em *Agar Triptona de Soja* (TSA, Difco®) e incubados por 24 horas sob temperatura de 36°C. As respectivas colônias em agar TSA foram inoculadas em caldo *Tryptic Soy Broth without Dextrose* (TSB sem glicose, Fluka®), incubadas, e as turvações foram ajustada até a escala 1 de MacFarland.

As cepas de *C. jejuni* foram semeadas em mCCDA e incubadas em condições de microaerofilia, por 48 horas sob temperatura de incubação de 42°C. As colônias de *C. jejuni* foram inoculadas em caldo Bolton (Oxoid®) e caldo TSB sem glicose, e a turvação dos caldos foi ajustada até a escala 1 de MacFarland.

3.1.3 Ensaio de formação dos biofilmes monoespécie em microplaca de poliestireno

O método foi baseado nas técnicas descritas por Rodrigues et al. (2009) e Stepanovic et al. (2000; 2007), adaptadas para a análise de 2 cepas de *L. monocytogenes* (L4 e L5), 1 cepa de *E. coli* (C7), 1 cepa de *S. Enteritidis* (SE24) e 7 cepas de *C. jejuni* (CJ03, CJ35, CJ42, CJ127, CJ134, CJ135, CJ136). As cepas padrão utilizadas foram *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *C. jejuni* ATCC 29428. Após o ajuste das turvações até a escala 1 de MacFarland, 200 µL de cada suspensão bacteriana das cepas de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, juntamente com as cepas ATCC, foram inoculadas individualmente, em triplicata, em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços estéreis e fundo plano (KASVI®). Como controle negativo, foi utilizado caldo TSB sem glicose, inoculado em triplicata. As placas de poliestireno foram incubadas a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C durante 24 horas em condições atmosféricas ambiente (aerobiose).

Quanto às cepas de *C. jejuni*, estas foram testadas em dois caldos de pré-enriquecimento, o caldo Bolton e caldo TSB sem glicose. Os inóculos foram ajustados de acordo com a escala 1 de MacFarland, e os caldos TSB sem glicose e Bolton, sem inóculo, foram igualmente distribuídos nas placas de poliestireno em triplicata. As placas de poliestireno inoculadas foram incubadas a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C por 24 horas em condições de microaerofilia (Microaerobac - Probac®; 5 a 15% O₂, 10% CO₂) e condições atmosféricas ambiente (aerobiose).

Após período de incubação, a suspensão bacteriana de todos os poços da placa de poliestireno foi aspirada, e cada poço foi lavado por três vezes com 250 µL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,9% (Synth®). Depois disso, o biofilme foi fixado com 200 µL de metanol (Neon®) durante 15 minutos. As placas foram secas à temperatura ambiente, coradas com 200 µL de solução de cristal violeta de *Hucker* (Vetec®) a 2% durante 5 minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Em seguida, a absorvância foi lida, utilizando um leitor de placas de ELISA (*Rosys Anthos*® 2010) a 550 nm.

3.1.4 Interpretação dos resultados

A densidade óptica (DOa) de cada uma das cepas foi obtida pela média aritmética da absorvância dos três poços e este valor foi comparado com a absorvância média dos

controles negativos (DOcn). A seguinte classificação foi utilizada para a determinação da formação de biofilme: não formação de biofilme ($DOa \leq DOcn$), fraca formação de biofilme ($DOcn < DOa \leq 2 \cdot DOcn$), moderada formação de biofilme ($2 \cdot DOcn < DOa \leq 4 \cdot DOcn$) e forte formação de biofilme ($4 \cdot DOcn < DOa$). O ensaio de biofilme monoespécie foi realizado em 2 repetições. Ao final desta etapa do experimento, foram gerados 480 ensaios envolvendo as variáveis bactérias (4 espécies), temperaturas de incubação (5 variações), repetições (6), condições de incubação (2) e meios de cultura testados (2).

3.2 Teste da eficácia dos sanitizantes em células planctônicas

Foi avaliada a resistência das cepas em fase planctônica, ou seja, em suspensão, de *S. Enteritidis* (SE24), *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7) e *C. jejuni* (CJ134) frente aos sanitizantes hipoclorito de sódio (Divosan TC 86, *Diversey*[®]) e peróxido de hidrogênio (Divosan SHP, *Diversey*[®]). A avaliação da eficácia do sanitizante foi realizada segundo a Portaria N° 101, através do método de diluição com as células planctônicas em suspensão (BRASIL, 1993). Após a obtenção de colônias puras em meios de cultura seletivos, as cepas foram incubadas individualmente em caldo BHI a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para iniciar os testes com os sanitizantes.

O hipoclorito de sódio foi testado nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%, sendo recomendado pelo fabricante a concentração a 2% por um período de 10 minutos. O peróxido de hidrogênio foi testado nas concentrações 0,3%, 0,5% e 1,0%, com recomendação de uso pelo fabricante a concentração de 0,3% e o tempo de 10 minutos. Como matéria orgânica a ser utilizada como interferente foi preparado um uma suspensão com de carne de frango estéril com 430 mg/mL de matéria orgânica.

Para obtenção do inóculo foram feitas diluições decimais de cada cultura bacteriana teste em água peptonada 0,1% (HiMedia[®]), utilizando como inóculo, 0,1 mL da diluição 10^{-2} . Foram preparados tubos de ensaio contendo 9 mL dos desinfetantes nas concentrações a serem testadas. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de matéria orgânica com concentração final de 0,43 mg/mL. Inóculos de 0,1 mL da diluição 10^{-2} de cada cultura bacteriana foram adicionados, separadamente, aos tubos contendo cada desinfetante, sendo o tempo cronometrado a partir desse procedimento. Após 1, 5, 10, 15 e 20 minutos de exposição, alíquotas de 10 μL das suspensões foram retiradas e

transferidas para tubos contendo caldo BHI com solução neutralizantes (*Tween* 80, Neon[®]; lecitina de soja e tiosulfato de sódio, Dinâmica[®]), para neutralizar o efeito dos desinfetantes. As amostras foram incubadas por 96 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram considerados positivos os tubos com turvação, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo. As cepas testadas foram classificadas como resistentes ou sensíveis perante a ação do desinfetante.

3.3 Biofilme multiespécie de *S. Enteritidis*, *C. jejuni*, *E. coli* e *L. monocytogenes* em aço inoxidável, poliuretano e polietileno e tratamentos de remoção

3.3.1 Amostragem

Quanto à formação de biofilme multiespécie foram testadas 4 cepas bacterianas, sendo: uma cepa de *S. Enteritidis* (SE24), uma cepa de *L. monocytogenes* (L4), uma de *E. coli* (C7) e uma de *C. jejuni* (CJ134). As cepas foram previamente isoladas e confirmadas em experimentos anteriores (PERDONCINI, 2015; RODRIGUES, 2009; OLIVEIRA et al., 2015).

As cepas foram reativadas em caldo BHI, e a pureza foi verificada utilizando meios de cultura seletivos, conforme descritos na metodologia para testar formação de biofilme monoespécie descrita anteriormente.

3.3.2 Preparação de corpos de prova

Como corpos de prova, foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 316 (equipamentos de indústria avícola), poliuretano (esteiras de transporte de cortes) e polietileno (placas de corte) limpos e esterilizados, com área de 1 cm², confeccionados nas dimensões de 1 cm X 1 cm e 0,1 cm de espessura. Os materiais utilizados para a preparação dos cupons foram obtidos de ambiente de processamento de carne de frango. Os cupons foram higienizados e esterilizados, a partir dos seguintes procedimentos: a) limpeza manual com auxílio de esponja, água e detergente neutro líquido; b) enxague com água destilada; c) imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura

ambiente; d) enxágue com água destilada; e) esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos.

3.3.3 Formação do biofilme

Para a formação dos biofilmes multiespécies os corpos de prova foram cultivados individualmente em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços (Kasvi[®]). Foi adicionado 2,75 mL de caldo triptona de soja sem glicose (TSB sem glicose, Difco[®]) e $2,5 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ das culturas individuais de cada espécie bacteriana em cada poço. Esta população foi verificada, em todo o experimento, por semeadura em placas contendo ágar padrão de contagem (PCA, HiMedia[®]).

Os corpos de prova de aço inoxidável, poliuretano e polietileno, previamente esterilizados, foram distribuídos em cada poço da microplaca contendo as culturas mistas de *S. Enteritidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *C. jejuni*. As microplacas, simulando um microambiente de matadouro-frigorífico avícola, foram incubadas em estufa incubadora B.O.D. com temperatura controlada a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, comprovadas através do uso de termômetros calibrados e certificados, para simular o ambiente de processamento, temperaturas ótimas dos microrganismos e de termotolerância. As microplacas eram avaliadas nos tempos 0, 4, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene operacional e pré-operacional em matadouro-frigorífico de aves (ROSSONI & GAYLARDE 2000; KUSUMANINGRUM et al. 2003). Todos os ensaios foram realizados com três repetições. No final do experimento foram realizados 720 ensaios de formações de biofilmes envolvendo as variáveis superfícies (3 materiais), temperaturas (5 variações), tempos (4 intervalos), tratamentos nos corpos de prova (4 ações) e repetições (3).

Em cada tempo determinado, os corpos de prova foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% (AP, HiMedia[®]), por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água Peptonada 0,1%, e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (frequência ultrassônica de 40 quilo-Hertz e potência de 80 Watts) para desadesão de células sésseis (ISO 18593:2012; JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997; WEBBER, 2015).

Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura PCA, para contagem total de microrganismos; *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* – mCCDA, (Oxoid®) suplementado para contagem de *C. jejuni*; *Eosin Methylene Blue Agar* – EMB (Oxoid®) para contagem de *E. coli*; *Xylose Lysine Desoxycholate Agar* – XLD (Oxoid®) para contagem de *S. Enteritidis*; e Agar Listeria Palcam (Biolog®) suplementado, para contagem de *L. monocytogenes*. O método de plaqueamento utilizado foi a contagem em gota ou *Drop-plate*, inoculando cinco gotas de 10µL de cada diluição, pelo método *Drop Plate*, com leitura após 24 horas de incubação a 36°C (MILES & MISRA, 1938), com exceção das placas de mCCDA, incubadas sob condições de microaerofilia (Microaerobac - Probac®; 5 a 15% O₂, 10% CO₂), sob temperatura de 42°C durante 56 horas de incubação, em virtude das exigências de cultivo de *C. jejuni*. Para determinar o resultado final do crescimento bacteriano em biofilme multiespécies nas diferentes condições ambientais testadas, foi aplicada a fórmula:

$$UFC.cm^{-2} = \left(\frac{VD}{VA}\right) \cdot M \cdot \left(\frac{D}{A}\right)$$

Sendo:

V_D: volume do diluente utilizado na rinsagem (5 mL);

V_A: 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).

3.3.4 Avaliação dos procedimentos de desinfecção

A eficácia dos tratamentos de higienização foi testada sobre os biofilmes multiespécies formados nas três superfícies. Os corpos de prova, previamente incubados e após a remoção das células planctônicas com enxague em 5 mL de água peptonada a 0,1% estéril por 5 minutos, foram colocados em recipientes com 5 mL de água estéril aquecida a 85°C por 3 minutos, e nas soluções de hipoclorito de sódio a 2% (Divosan TC

86, *Diversey*[®]) e peróxido de hidrogênio a 0,3% (Divosan SHP, *Diversey*[®]), por um tempo de 10 minutos, conforme recomendações do fabricante.

Em seguida, os cupons tratados foram imersos em 5 mL de água peptonada a 0,1% com agentes neutralizantes (*Tween* 80, Neon[®]; lecitina de soja e tiosulfato de sódio, Dinâmica[®]) durante 1 minuto, introduzidos em tubos contendo 5 mL de Água peptonada 0,1% e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom para desadesão de células sésseis (ISO 18593:2012; JOSEPH et al., 2001; LINDSAY & HOLY, 1997 WEBBER, 2015). Para quantificação das células que não foram removidas pelos tratamentos de higienização, foi utilizado o método de contagem em gota ou Drop-plate em agar padrão para contagem (PCA) e nos meios de cultura seletivos, conforme especificados na etapa anterior. O resultado final da contagem das células restantes também ocorreu utilizando a fórmula matemática anteriormente representada.

3.3.5 Análise estatística

Os resultados obtidos no ensaio de biofilmes monoespécie foram analisados a partir do desvio padrão das médias das densidades ópticas. Quanto aos resultados obtidos no ensaio de biofilmes multiespécies e nos procedimentos de higienização, o método utilizado foi a análise de variância. A comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi feita utilizando o software ASSISTAT versão 7.7 beta (WEBBER, 2015).

4 RESULTADOS

4.1 Biofilmes monoespécie de *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em microplaca de poliestireno

O ensaio de formação de biofilmes monoespécie serviu como uma triagem para selecionar as cepas com potencial de formação de biofilme em superfície abiótica. As cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *C. jejuni* foram capazes de formar biofilmes monoespécie na superfície das placas de poliestireno, sob diferentes temperaturas em 24 horas de incubação (Figura 1 a 6).

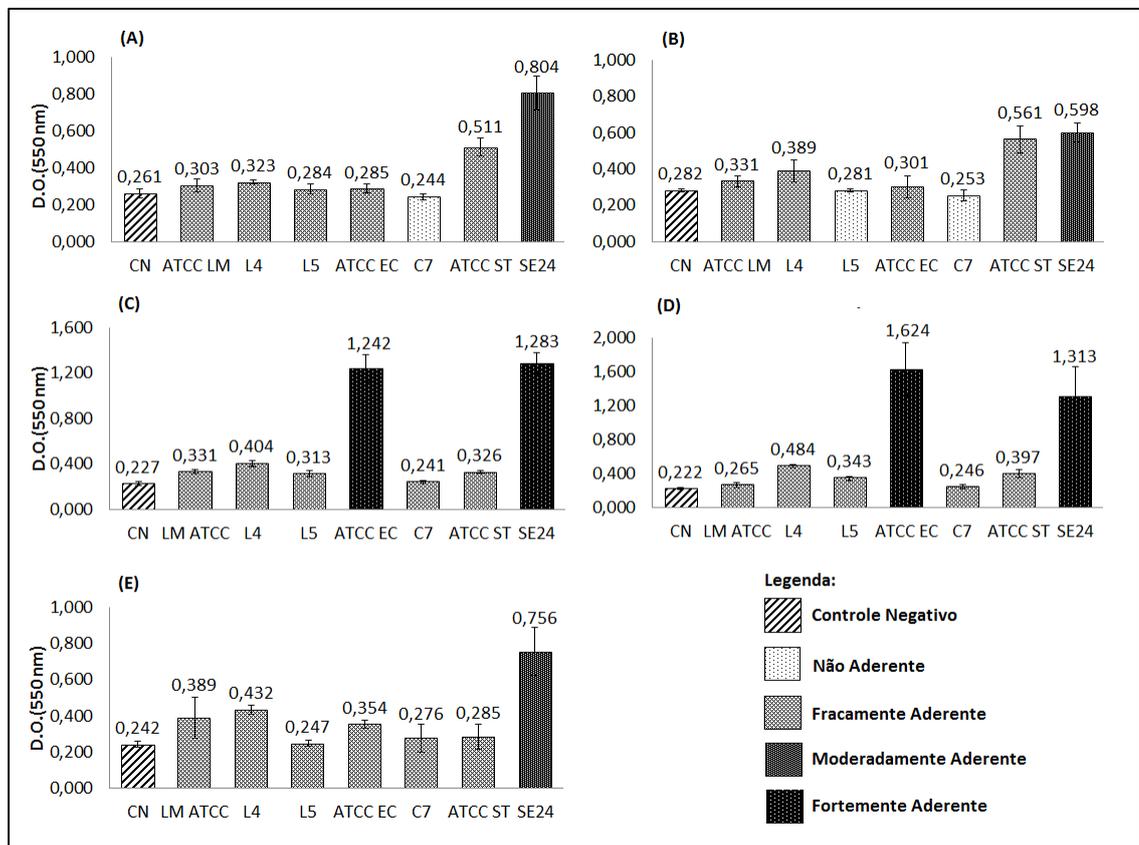


Figura 1. Formação de biofilme monoespécie por *S. Enteritidis* (SE24), *E. coli* (C7), *L. monocytogenes* (L4) em placa de poliestireno em diferentes temperaturas.

Legendas: (A) formação a 3°C; (B) formação a 9°C; (C) formação a 25°C; (D) formação a 36°C; (E) formação a 42°C. CN = controle negativo. Leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm. As barras de erros correspondem ao desvio padrão das médias das DOs.

Quanto aos biofilmes formados por *S. Enteritidis*, esta foi considerada a mais formadora de biofilme em todas as temperaturas testadas, destacando que nas temperaturas de refrigeração de 3 e 9°C, esta bactéria apresentou aderência moderada. *L.*

monocytogenes também foi capaz de formar biofilmes em todas as temperaturas testadas, com mais ênfase para a cepa L4, que teve maior aderência em temperatura ambiente. A amostra de *E. coli* não formou biofilme em temperatura de refrigeração, porém, foi fracamente formadora de biofilme em poliestireno nas temperaturas de 25, 36 e 42°C.

As 7 amostras de *C. jejuni* também foram fracamente formadoras de biofilmes nas temperaturas, caldos e ambientes com e sem microaerofilia testados, e algumas, não foram capazes de aderir em determinadas condições (Figuras 2 a 6). Não houve destaque entre as condições testadas, porém, nota-se que as cepas formaram mais biofilme em caldo TSB e sem condições de microaerofilia. Dessa forma, seriam capazes de suportar as condições ambientes do ensaio de formação de biofilme multiespécies.

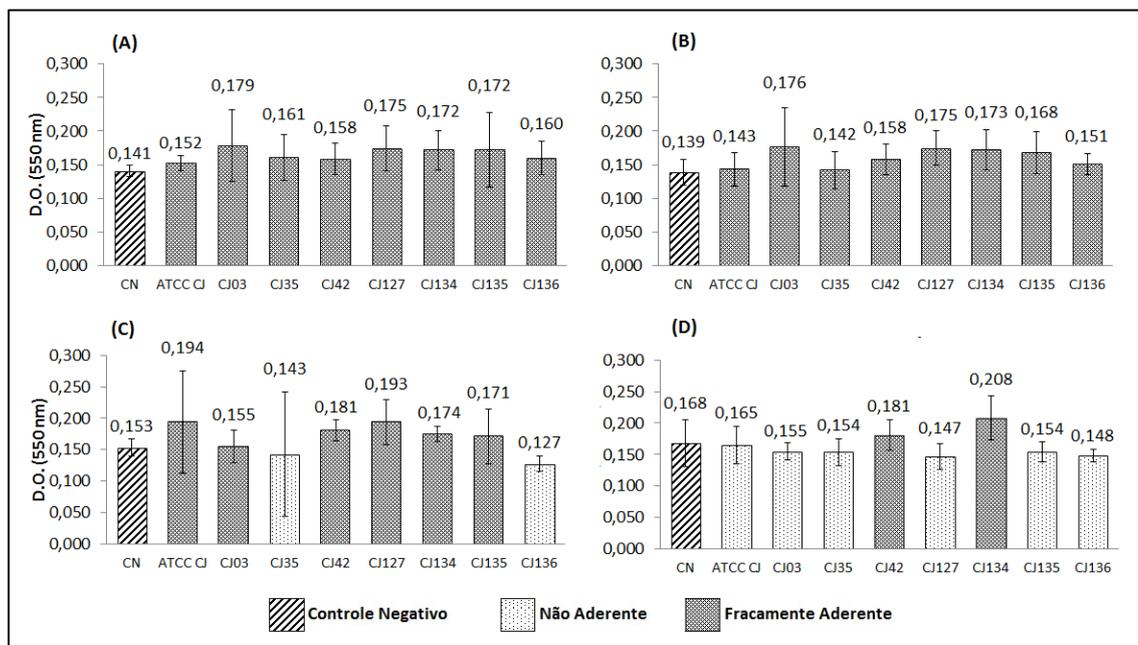


Figura 2. Formação de biofilme monoespécie por amostras de *C. jejuni* em placa de poliestireno na temperatura de 3°C.

Legendas: (A) caldo Bolton em aerobiose; (B) caldo TSB em aerobiose; (C) caldo Bolton em microaerofilia; (D) caldo TSB em microaerofilia. CN= controle negativo. Leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm. As barras de erros correspondem ao desvio padrão das médias da DO.

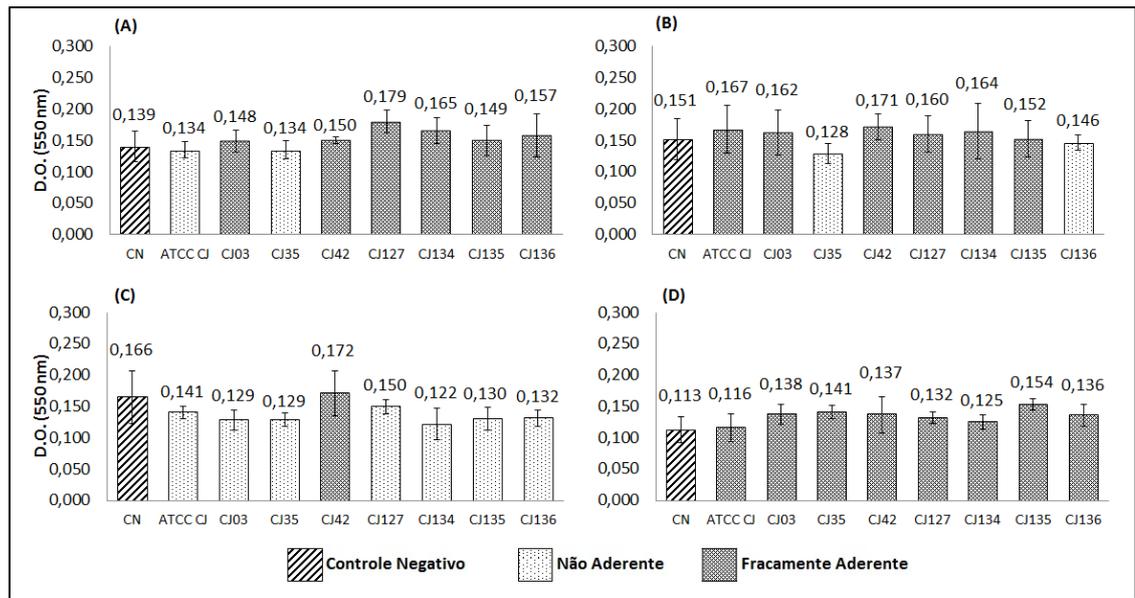


Figura 3. Formação de biofilme monoespécie por amostras de *C. jejuni* em placa de poliestireno na temperatura de 9°C.

Legendas: (A) caldo Bolton em aerobiose; (B) caldo TSB em aerobiose; (C) caldo Bolton em microaerofilia; (D) caldo TSB em microaerofilia. CN= controle negativo. Leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias da DO.

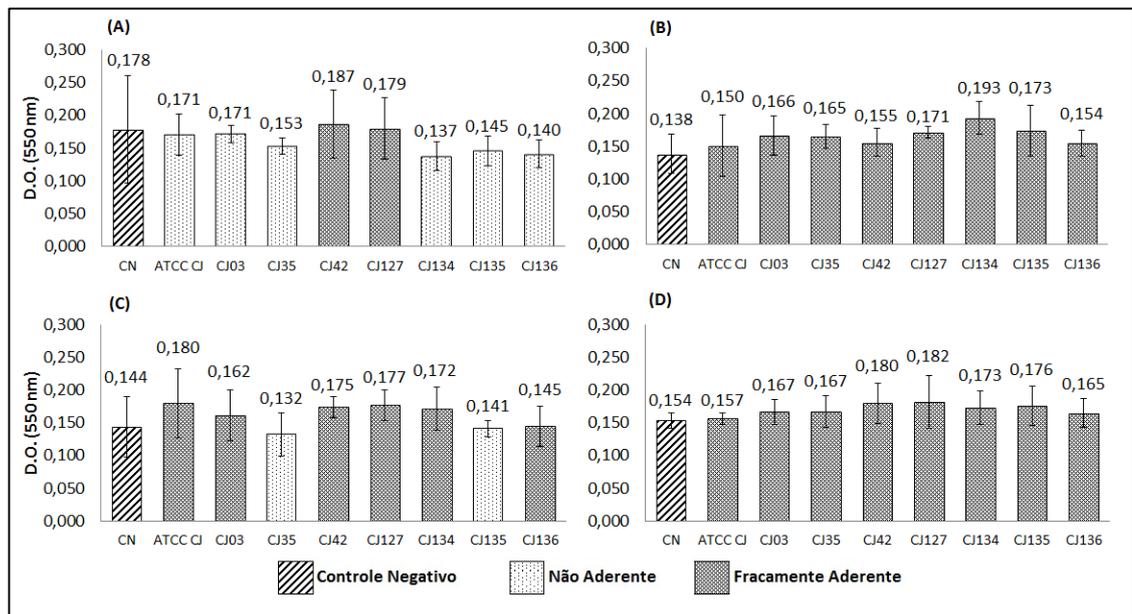


Figura 4. Formação de biofilme monoespécie por amostras de *C. jejuni* em placa de poliestireno na temperatura de 25°C.

Legendas: (A) caldo Bolton em aerobiose; (B) caldo TSB em aerobiose; (C) caldo Bolton em microaerofilia; (D) caldo TSB em microaerofilia. CN= controle negativo. Leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias da DO.

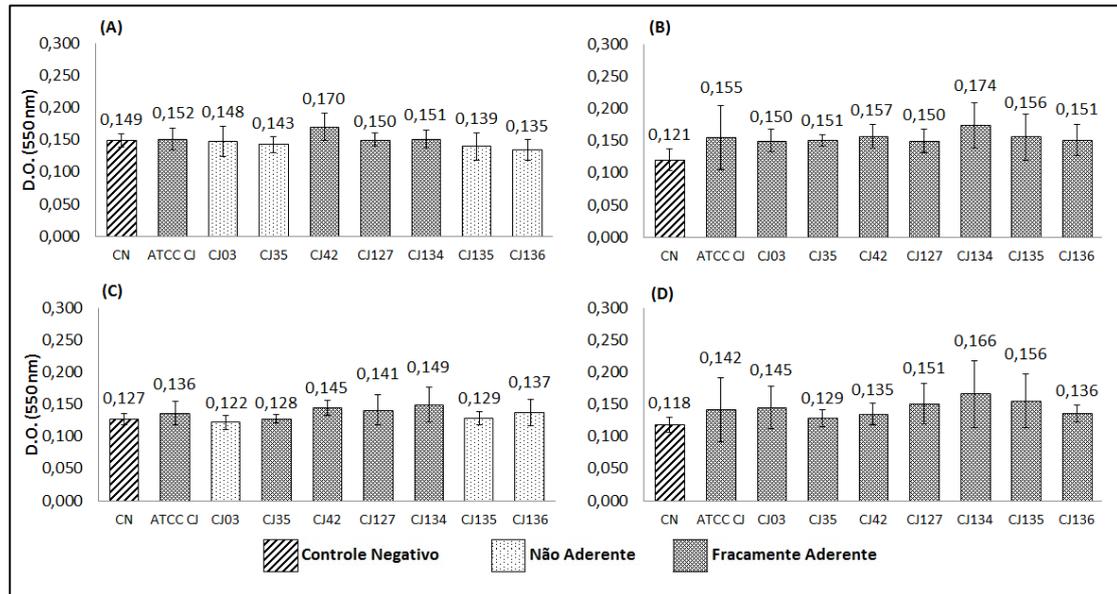


Figura 5. Formação de biofilme monoespécie por amostras de *C. jejuni* em placa de poliestireno na temperatura de 36°C.

Legendas: (A) caldo Bolton em aerobiose; (B) caldo TSB em aerobiose; (C) caldo Bolton em microaerofilia; (D) caldo TSB em microaerofilia. CN= controle negativo. Leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias da DO.

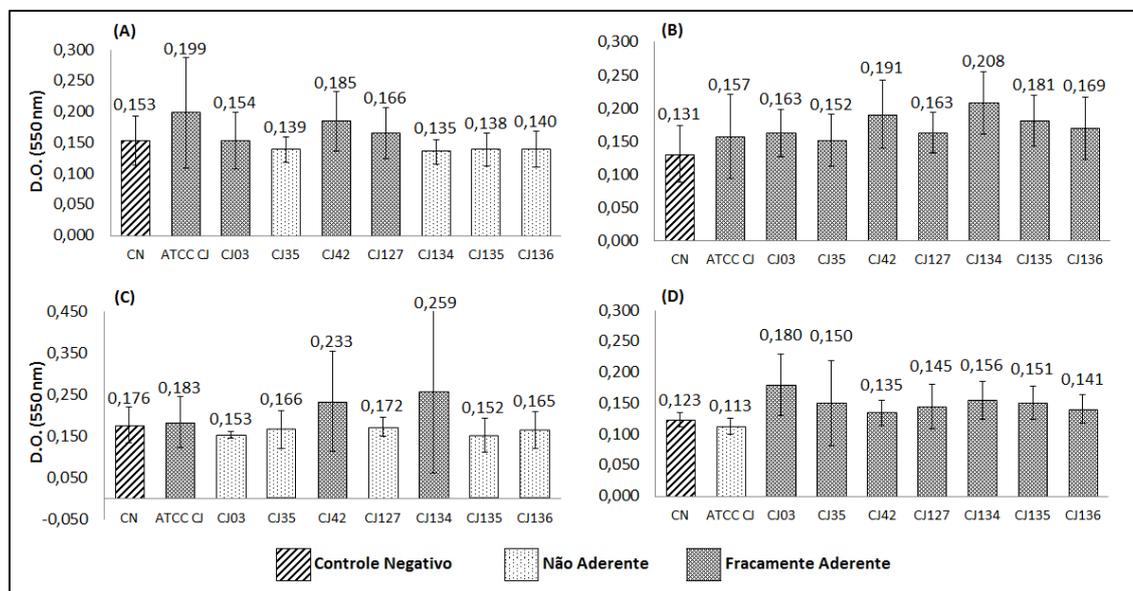


Figura 6. Formação de biofilme monoespécie por amostras de *C. jejuni* em placa de poliestireno na temperatura de 42°C.

Legendas: (A) caldo Bolton em aerobiose; (B) caldo TSB em aerobiose; (C) caldo Bolton em microaerofilia; (D) caldo TSB em microaerofilia. CN= controle negativo. Leitura da densidade óptica (DO) a 550 nm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias da DO.

4.2 Teste da eficácia dos sanitizantes em células planctônicas

O teste de eficácia dos sanitizantes hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio foi realizado para avaliar a resistência das cepas testadas individualmente e em fase planctônica. Foram utilizadas concentrações e tempo recomendados pelo fabricante, além de concentrações superiores e inferiores em relação as concentrações recomendadas.

De acordo com o fabricante, recomenda-se o uso de hipoclorito a 2% e o peróxido de hidrogênio a 0,3% ambos por 10 minutos e recomendados para superfícies contaminadas de indústrias alimentícias. Observando a Tabela 1, as cepas de *S. Enteritidis* e *E. coli* foram resistentes a todas as concentrações de peróxido de hidrogênio testadas; já quanto ao hipoclorito de sódio, ambas cepas foram sensíveis na concentração e tempo recomendado pelo fabricante. Já em relação a cepa de *L. monocytogenes*, está foi resistente aos 2 sanitizantes utilizados, mesmo em concentrações acima do recomendado. A cepa de *C. jejuni* demonstrou-se sensível aos sanitizantes e concentrações recomendados (Tabela 1).

Tabela 1. Resistência das cepas de *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* e *C. jejuni* frente aos sanitizantes em diferentes tempos e concentrações.

Sanitizantes	Concentração	Microrganismos	Tempo de Exposição				
			1'	5'	10'	15'	20'
Peróxido de Hidrogênio	0,3%	<i>Salmonella</i> Enteritidis (SE24)	R	R	R	R	R
	0,5%		R	R	R	R	R
	1%		R	R	R	R	R
	0,3%	<i>Escherichia coli</i> (C7)	R	R	R	R	R
	0,5%		R	R	R	R	R
	1%		R	R	R	R	S
	0,3%	<i>Listeria monocytogenes</i> (L4)	R	R	R	R	R
	0,5%		R	R	R	R	R
	1%		R	R	R	S	S
	0,3%	<i>Campylobacter jejuni</i> (CJ134)	S	S	S	S	S
	0,5%		S	S	S	S	S
	1%		S	S	S	S	S
Hipoclorito de sódio	0,5%	<i>Salmonella</i> Enteritidis (SE24)	R	R	S	S	S
	1%		S	S	S	S	S
	2%		S	S	S	S	S
	0,5%	<i>Escherichia coli</i> (C7)	S	S	S	S	S
	1%		S	S	S	S	S
2%	S	S	S	S	S		

Continuação da Tabela 1. Resistência das cepas de *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* e *C. jejuni* frente aos sanitizantes em diferentes tempos e concentrações.

0,5%		R	R	R	R	R
1%	<i>Listeria monocytogenes</i>	R	R	R	R	R
2%	(L4)	R	R	R	R	R
0,5%		R	R	S	S	S
1%	<i>Campylobacter jejuni</i>	R	R	R	S	S
2%	(CJ134)	S	S	S	S	S

4.3 Biofilme multiespécies pela interação de *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polietileno, e tratamentos de remoção

4.3.1 Quantificação das amostras

A formação total de biofilmes multiespécies em todas as condições ambientais testadas, incluindo superfícies, temperaturas e tempos de incubação foi de 3,854 \log_{10} .UFC.cm⁻². Em relação a formação total de biofilme multiespécies em todas as condições ambientais testadas com *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134), houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre todas (Tabela 1). Não foi possível quantificar a amostra CJ134 (Tabela 2).

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

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	Carça de frango após resfriamento	0,000 d

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.

4.3.2 Efeito das temperaturas na formação do biofilme

Em relação à formação total de biofilme multiespécie em todas as temperaturas, os dados podem ser verificados na Tabela 3. Quanto aos resultados da formação de biofilmes pelas 4 cepas testadas frente às diferentes temperaturas utilizadas para incubação, houve diferenças estatísticas entre a maioria das cepas e as temperaturas (Tabela 4 e Figuras 7 a 10). *S. Enteritidis* e *E. coli* aderiram estatisticamente iguais em todas as superfícies, nas temperaturas de refrigeração de 3°C e 9°C. *S. Enteritidis* (SE24) e *E. coli* (C7) tiveram comportamentos estatisticamente iguais a 25°C ($P=0,274$) e 42°C ($P=0,792$). *S. Enteritidis* (SE24) e *L. monocytogenes* (L4) foram estatisticamente diferentes em todas as temperaturas testadas ($P<0,05$), sendo que *L. monocytogenes* (L4) foi menos formadora de biofilme; e *L. monocytogenes* (L4) e *E. coli* (C7) foram estatisticamente semelhantes apenas a 9°C ($P=0,826$) e 36°C ($P=0,080$). Não foi possível quantificar a cepa de *C. jejuni*. Em geral, *S. Enteritidis* demonstrou-se estatisticamente mais formadora de biofilme na maioria das temperaturas testadas, quando comparada às demais bactérias.

Tabela 3. Média das repetições da formação de biofilmes pelas cepas de *S. Enteritidis* (SE24), *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) sob diferentes temperaturas de incubação em todas as superfícies testadas.

	TEMPERATURAS*				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
TOTAL	1,543 A	1,423 A	4,758 B	5,873 B	5,671 B

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

Tabela 4. Média de formação de biofilmes pelas cepas de *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) sob diferentes temperaturas de incubação obtidas pelas médias das repetições, em todas as superfícies testadas.

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

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

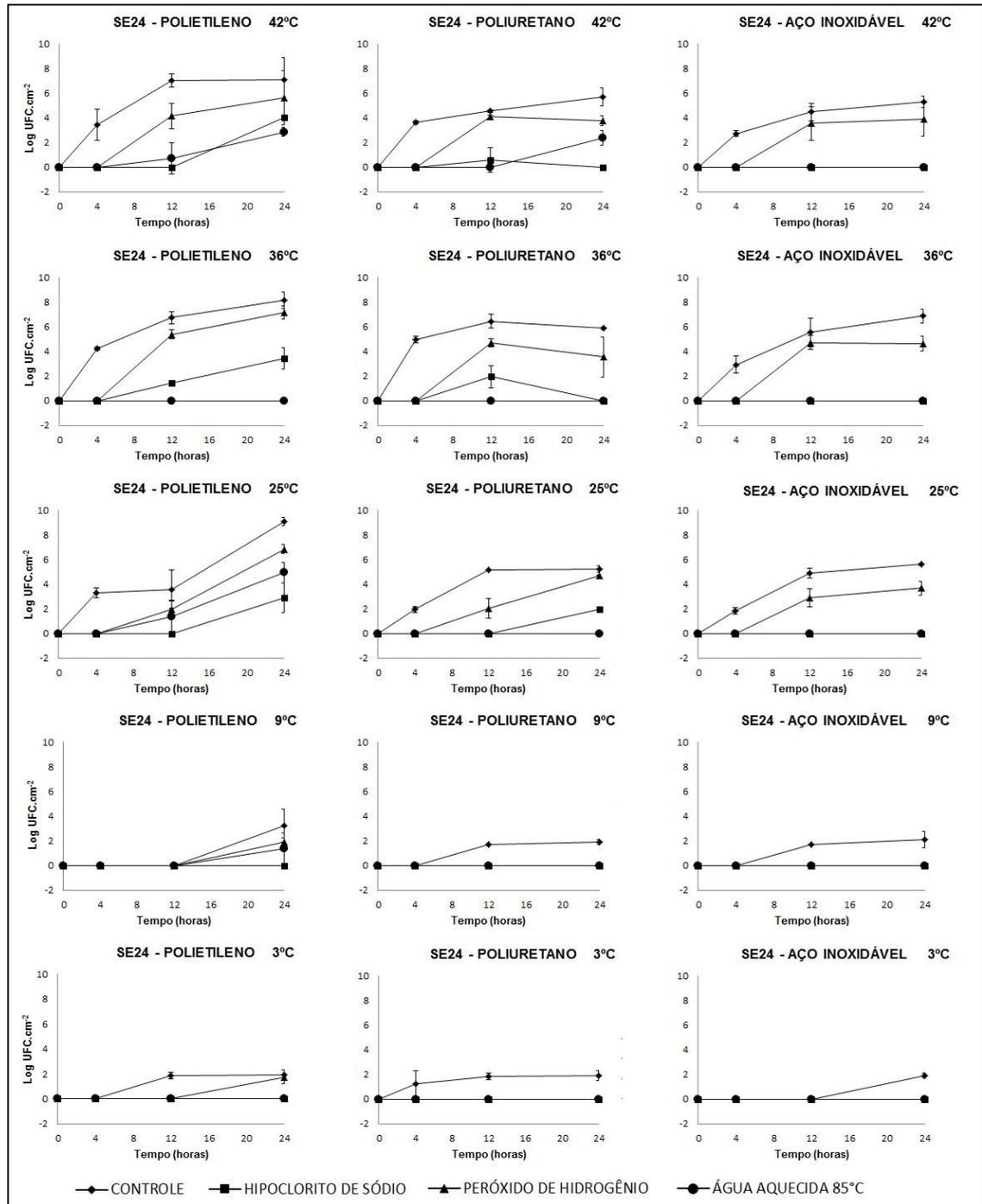


Figura 7. Formação de biofilme de *S. Enteritidis* (SE24) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.

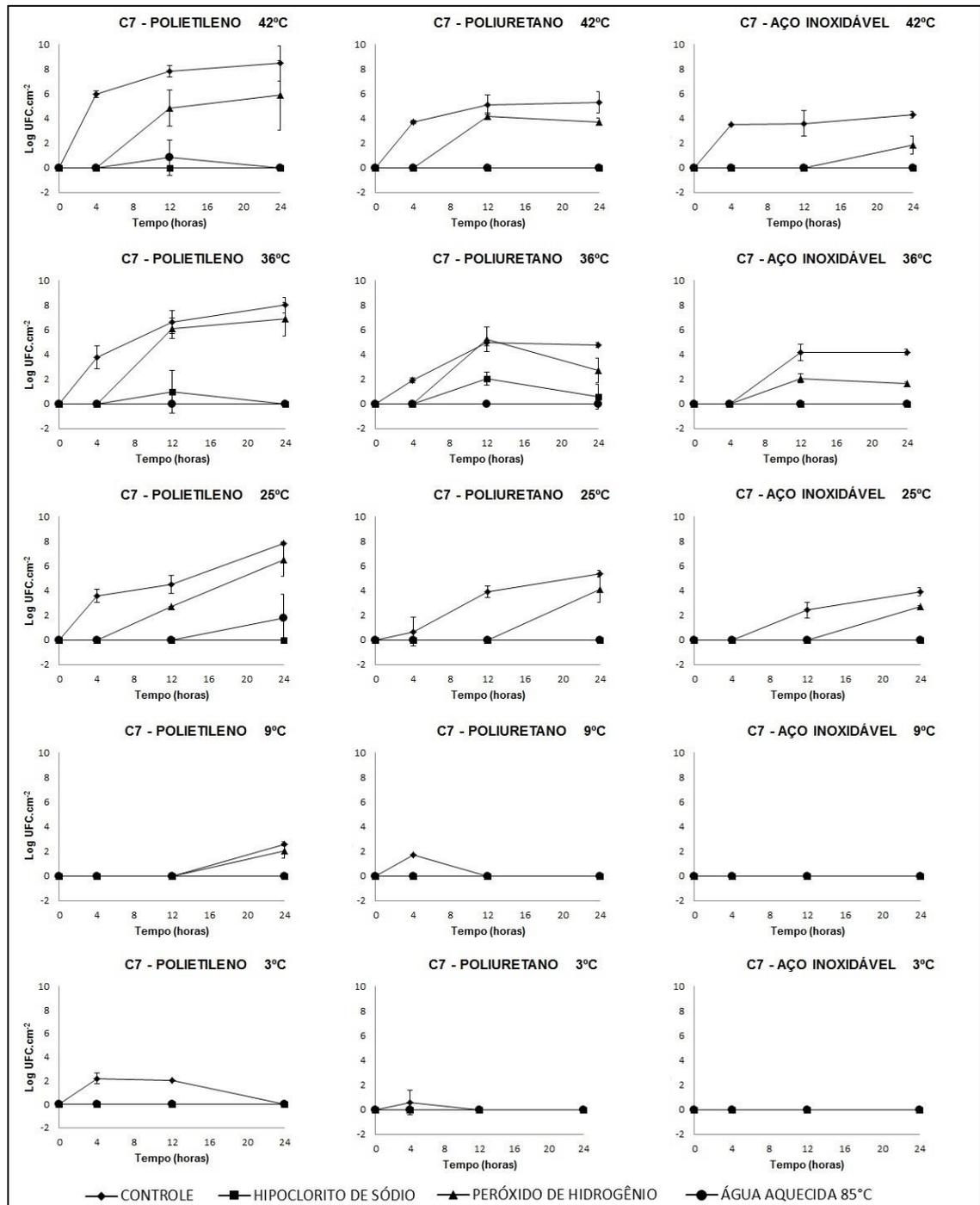


Figura 8. Formação de biofilme de *E. coli* (C7) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.

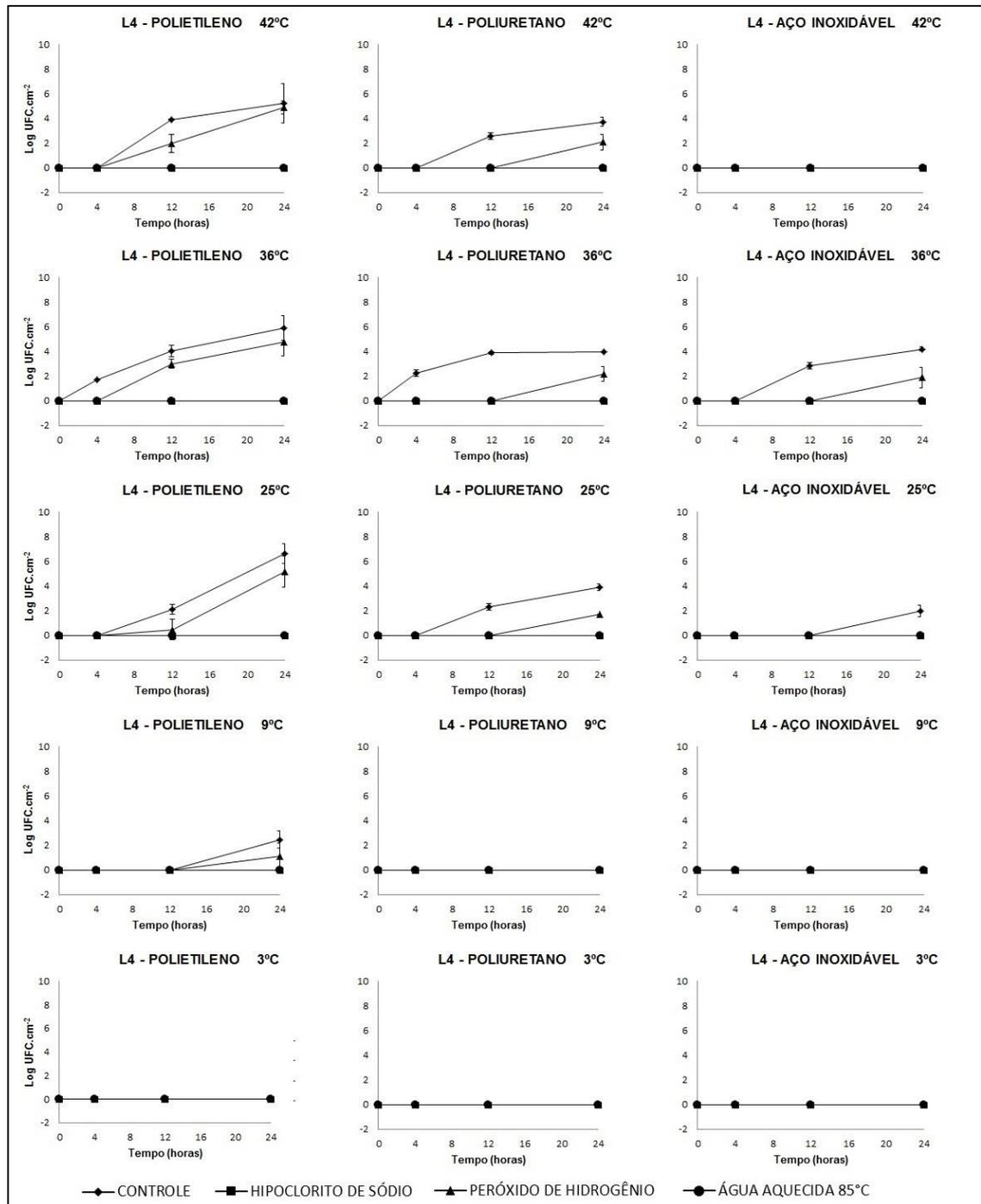


Figura 9. Formação de biofilme de *L. monocytogenes* (L4) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.

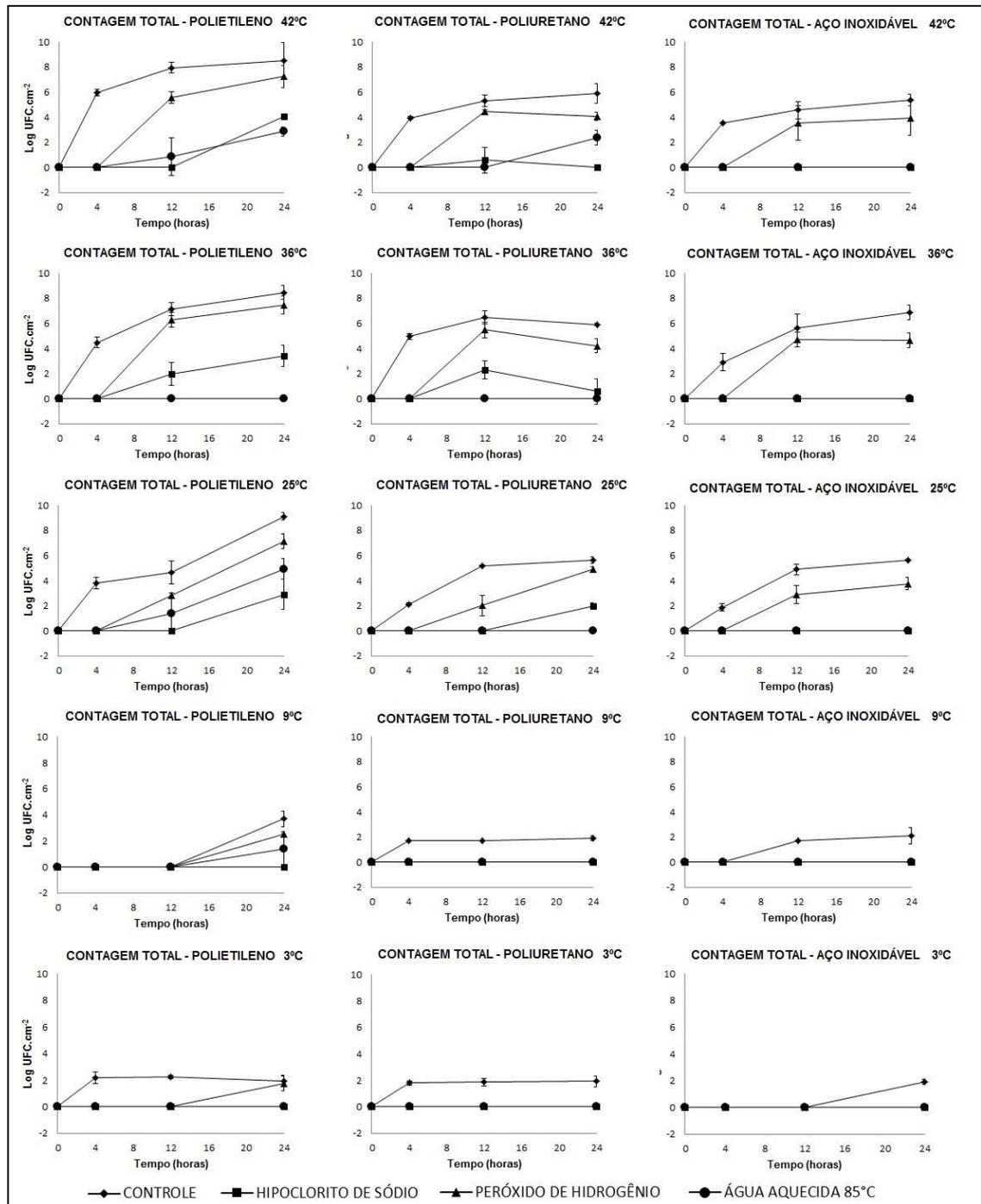


Figura 10. Formação total de biofilme de *S. Enteritidis* (SE24), *E. coli* (C7), *L. monocytogenes* (L4) em superfícies de polietileno, poliuretano e aço inoxidável sob diferentes temperaturas, tempos e procedimentos de higienização no decorrer de 24 horas.

4.3.3 Adesão microbiana às diferentes superfícies

Houve formação de biofilme multiespécies no aço inoxidável, poliuretano e polietileno. As cepas de *E. coli* e *S. Enteritidis* formaram mais biofilme em polietileno, sem diferença estatística entre elas ($P= 0,968$), seguidas de poliuretano e, por último, aço inoxidável. A cepa de *L. monocytogenes* foi menos formadora de biofilme nas superfícies testadas, em comparação com *E. coli* e *S. Enteritidis*. De acordo com as diferenças estatísticas, quando as cepas foram comparadas entre si e em cada superfície, o polietileno foi a superfície que mais proporcionou adesão dos microrganismos, e o aço inoxidável foi a superfície em que as cepas testadas aderiram em menor proporção. As médias totais de formação de biofilme multiespécies das 4 cepas nas 3 superfícies testadas, podem ser visualizadas na Tabela 5 e 6.

Tabela 5. Média total de formação de biofilmes por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.

	SUPERFÍCIES*		
	Polietileno	Poliuretano	Aço Inoxidável
TOTAL	4,673 A	3,757 AB	3,171 B

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

Tabela 6. Média de formação de biofilmes de cada cepa de *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável. Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.

Cepas	SUPERFÍCIES*		
	Polietileno	Poliuretano	Aço Inoxidável
L4	2,134 Aa	1,502 Aba	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

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

4.3.4 Tratamentos de higienização

Diante dos tratamentos testados para remoção do biofilme multiespécies formado por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134), o hipoclorito de sódio e a água a 85°C apresentaram ação semelhante ($P=0,982$) na remoção (Tabela 7). O peróxido de hidrogênio removeu biofilmes com menor eficácia quando comparada ao hipoclorito de sódio e a água quente a 85°C. Com o uso do hipoclorito de sódio e água quente a 85°C foi obtida uma redução média de 3,459 \log_{10} .UFC.cm⁻² e 3,547 \log_{10} .UFC.cm⁻², respectivamente. O peróxido de hidrogênio reduziu apenas 1,987 \log_{10} .UFC.cm⁻². Os tratamentos de remoção podem ser melhor interpretados quando se analisa o comportamento individual das cepas (Tabela 8 e Figura 11). A remoção de *L. monocytogenes* e *E. coli* foram semelhantes em todas superfícies, com maior eficácia com o tratamento de água quente a 85°C ($P=0,812$) e sanitizantes hipoclorito de sódio ($P=0,613$), respectivamente. *S. Enteritidis* foi removida com menor eficácia pelo hipoclorito de sódio e água quente a 85°C, quando comparada com as demais bactérias, porém a ação destes tratamentos também foram semelhantes ($P=0,994$). A ação dos tratamentos de higienização em cada superfície no biofilme multiespécies formado pelas 4 cepas testadas (cepas individualmente e somatório total das cepas) pode ser visualizada nas figuras 11 e 12.

Tabela 7. Média total dos tratamentos de remoção do biofilme multiespécies formado por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano. Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.

	TRATAMENTOS*			
	CONTROLE	HIPOCLORITO	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	ÁGUA ESTÉRIL AQUECIDA 85°C
TOTAL	3,854 A	0,395 B	1,987 C	0,307 B

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

Tabela 8. Média dos tratamentos de remoção do biofilme multiespécies formado por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134). Médias das repetições, sob todas as condições ambientais testadas.

TRATAMENTOS*				
	CONTROLE	HIPOCLORITO DE SÓDIO	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	ÁGUA AQUECIDA A 85°C
L4	1,413 Aa	0,000 Ba	0,650 Ca	0,000 Ba
C7	2,286 Ab	0,080 Ba	1,401 Cb	0,057 Ba
SE24	3,505 Ac	0,362 Bb	1,800 Cb	0,303 Bb
CJ134	0,000 Ad	0,000 Aa	0,000 Ac	0,000 Aa

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

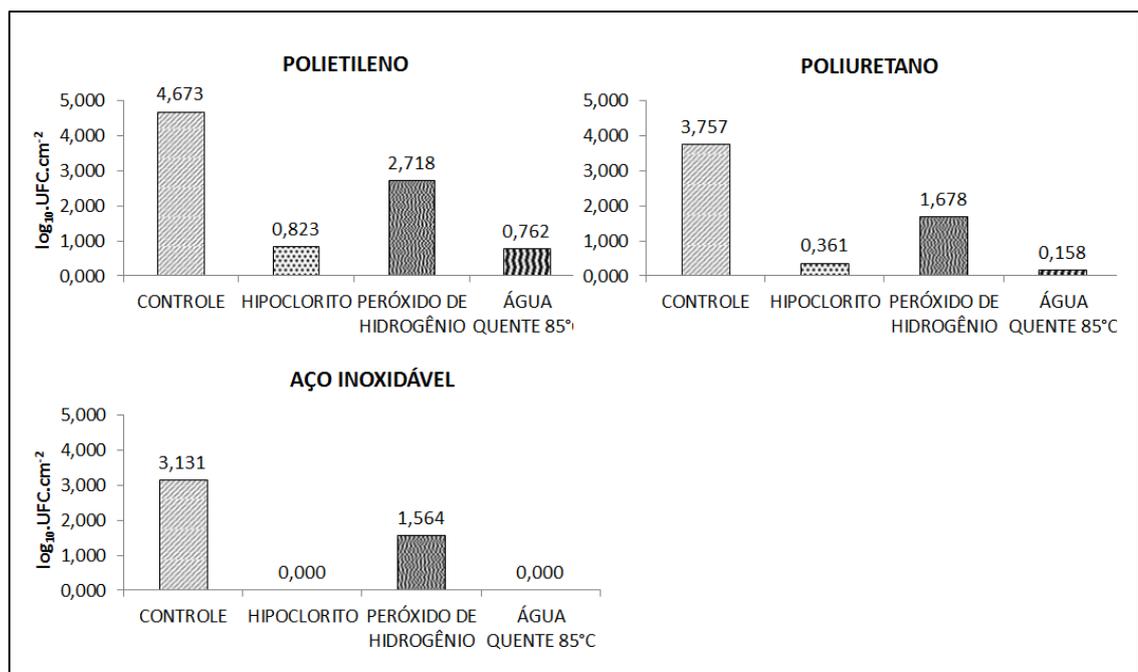


Figura 11. Média de Sobrevivência dos biofilmes multiespécies formado por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável após diferentes procedimentos de higienização.

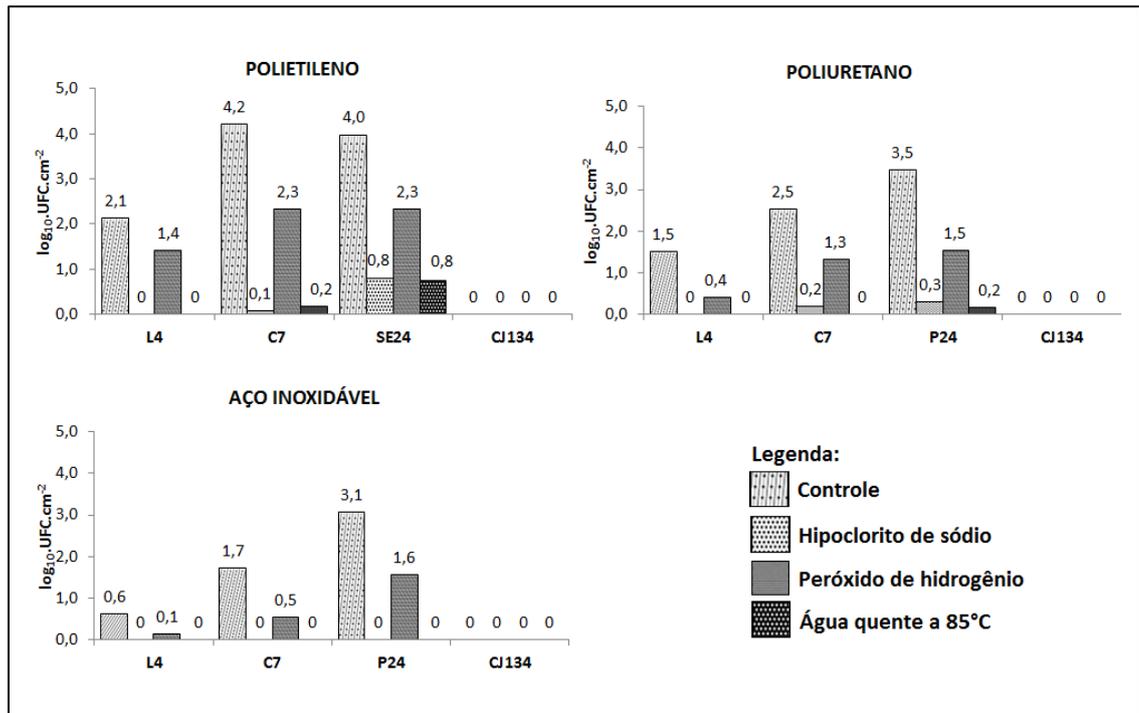


Figura 12. Sobrevivência individual dos biofilmes multiespécies formado por *S. Enteritidis* (SE24) *L. monocytogenes* (L4), *E. coli* (C7), *C. jejuni* (CJ134) em polietileno, poliuretano e aço inoxidável utilizando diferentes procedimentos de higienização.

5 DISCUSSÃO

Os biofilmes são provavelmente a forma mais prevalente de vida microbiana em ambientes naturais e processamento. A maioria do conhecimento que se tem sobre biofilmes bacterianos, foi adquirida a partir de estudos de biofilmes compostos de uma única espécie, mas estes são raramente encontrados no ambiente natural e industrial (MANUZON & WANG, 2007).

De acordo com Elias e Banin (2012), as bactérias são encontradas na natureza e em diversos ambientes na forma de biofilmes multiespécie ou mistos. Estes biofilmes mistos são a forma dominante na natureza e também estão presentes em diversos ambientes abióticos e em hospedeiros humanos e animais. As espécies que constituem biofilmes multiespécies podem incluir bactérias, fungos, protozoários e as interações entre esses microrganismos tem influência decisiva no desenvolvimento e forma da comunidade (ELIAS & BANIN, 2012). Todavia, existem poucos estudos que relatam a composição de biofilmes multiespécies na indústria, além de serem escassos relatos sobre a interação de microrganismos em comunidades mistas, sejam eles espécies ambientais ou patogênicas.

As cepas utilizadas no presente experimento, tiveram a capacidade de formar biofilmes monoespécie em placas de poliestireno, nas diferentes condições ambientais testadas. Este ensaio de formação de biofilme monoespécie serviu como triagem das cepas para o teste de formação de biofilme multiespécie, avaliando se estas cepas tinham capacidade de adesão no poliestireno.

A avaliação de biofilmes em placas de poliestireno pela coloração de cristal violeta é baseada em Stepanovic et. al (2000; 2004), modificada por Rodrigues et al. (2009), e classifica as amostras em não aderente, fracamente, moderadamente e fortemente aderente. Esta técnica é de fácil reprodutibilidade e muito utilizada para verificar a capacidade de microrganismos aderirem em superfícies plásticas. Contudo, a técnica não permite perceber a viabilidade da célula nem sua morfologia, mas reflete a quantidade de biomassa que aderiu na superfície testada (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Desse modo, foram selecionadas as amostras SE24 (*S. Enteritidis*), de surto de DTA; a C7 (*E. coli*) e a L4 (*L. monocytogenes*), de superfície de poliuretano após a higienização com água quente, em matadouro-frigorífico avícola; e a CJ134 (*C. jejuni*), isolada de carcaças resfriadas após imersão em *chiller*, em matadouro-frigorífico avícola.

Salmonella Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* foram capazes de interagir formando biofilmes mistos em superfícies de indústria avícola, onde manifestaram diferentes comportamentos diante das condições ambientais avaliadas. Não foi possível quantificar *C. jejuni* no ensaio de formação de biofilme multiespécie.

A observação da estrutura microscópica de biofilmes é importante, pois dessa forma, pode-se compreender melhor a interação entre os microrganismos, superfície testada e método de higienização empregado. Além disso, estudos revisados por Bridiera et al. (2011), corroboram que a resistência do biofilme a um agente sanitizante é intimamente relacionada com a sua estrutura tridimensional, com a bioestrutura heterogênea e multifatorial, consequência de uma acumulação de diferentes mecanismos. Durante o experimento, parte dos cupons testados, impregnados de biofilme multiespécie, antes e após a higienização, foram armazenados em condições específicas para posterior análise microscópica, pela técnica de microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (CLSM).

A amostra de *S. Enteritidis* (SE24) foi a mais formadora de biofilme monoespécie em poliestireno, destacando-se como fortemente formadora de biofilme a 25°C e 36°C e moderadamente a 3°C, 9°C e 42°C. A análise da mesma amostra foi feita por Silva et al. (2014), onde a cepa SE24, em fase planctônica, revelou-se resistente ao sanitizante biguanida. Além disso, Silva (2014) avaliou os genes de virulência presentes em várias amostras de *S. Enteritidis*, onde a SE24 possuía os genes *spiA* e *agfA* em seu perfil genético, que estão envolvido na formação de biofilmes e também na virulência da *S. Enteritidis* (DONG et al., 2011). Oliveira et al. (2015) obteve a mesma amostra SE24, classificada como mais formadora de biofilme nas mesmas condições ambientais testadas neste experimento. A cepa SE24 foi a cepa mais aderente nos testes de formação de biofilme monoespécie e multiespécie do presente estudo, com maior média de adesão em todas as condições ambientais testadas ($3,505 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$) além de ser a cepa que mais resistiu aos tratamentos de higienização empregados.

Apesar de ambas amostras de *L. monocytogenes* testadas terem sido classificadas como fracamente formadoras de biofilmes, a amostra L4 possuiu maior fixação de biomassa, verificada pelos valores de densidade óptica no ensaio de biofilme monoespécie, quando comparada com a amostra L5, em todas as temperaturas testadas. *E. coli* (C7) também foi fracamente formadora de biofilme na maioria das temperaturas testadas. Entretanto, esta classificação não significa que as cepas não teriam um bom

desempenho de adesão nas superfícies de poliuretano, polietileno e aço inoxidável, em condição multiespécie.

Por exemplo, Stepanovic et al. (2004) relataram que a *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* podem produzir biofilmes fortemente aderentes em superfícies de plástico. Bonsaglia et al. (2014) obteve amostras de *L. monocytogenes* formadoras de biofilme em poliestireno, aço inoxidável e vidro a 4°C, 20°C e 35°C. Rodrigues et al. (2013) obteve as mesmas amostras de *E.coli* e *L. monocytogenes* inoculadas em caldo TSB com diferentes concentrações de glicose (de 0,5% até 4%) classificadas desde não aderentes até fortemente aderentes na temperatura de 36°C e em placa de poliestireno. Além disso, L4 e C7 foram isoladas por Rodrigues (2009) de um matadouro-frigorífico avícola, a partir de superfícies de poliuretano após higienização com água quente, e provavelmente, estas cepas estavam aderidas a superfície sob a forma de biofilme multiespécie.

Em relação à amostra de *Campylobacter jejuni*, não foi possível quantificar este microrganismo no ensaio de formação de biofilme multiespécie. Porém, no ensaio de formação de biofilme monoespécie em poliestireno, as cepas de *C. jejuni* aderiram fracamente nas condições ambientais testadas. Pesquisadores alegam que métodos de quantificação de biofilmes através de cultivo padrão podem não ser eficientes em microrganismos de crescimento fastidioso. Há também estudos demonstrando que certas amostras ambientais isoladas de biofilmes podem não ser cultivadas em meios de cultivo tradicionais (MANUZON & WANG, 2007).

Ademais, *C. jejuni* é um microrganismo que, diante de condições extremas como, altas concentrações de oxigênio, carência de nutrientes e flutuações da temperatura e pH, passa para um estado “viável mas não-cultivável” (VBNC). Neste estado os microrganismos apresentam morfologia cocoide, e não é possível cultivar a bactéria em meios de cultivo tradicionais, porém, continuam apresentando atividade metabólica (SUNG & KHAN, 2015; MAGAJNA & SCHRAFT, 2015).

Nos estabelecimentos de processamento de alimentos, *C. jejuni* pode entrar em estado viável, mas não cultivável (VBNC), quando está na forma de biofilme (SUNG & KHAN, 2015). Magajna & Schraft (2015), observaram que as amostras de *C. jejuni* isoladas de infecção humana e de aves saudáveis, atingiram um estado VBNC mais rapidamente na forma de biofilme, em baixa disponibilidade de nutrientes e a 4°C, quando comparadas às mesmas condições nas células planctônicas. As pesquisadoras sugerem que, uma melhor compreensão do estado VBNC juntamente com o desenvolvimento e

uso de métodos de detecção não-cultiváveis, baseados em microscopia, poderiam levar à melhoria da segurança alimentar e redução da incidência desta doença.

Jang et al. (2007) induziram uma cepa de *Campylobacter jejuni* à forma cocoide e estado VBNC em condições aeróbicas nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C, e esta forma era inoculada em pele de frango. Através de citometria de fluxo e microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (CLSM), foi verificado que a forma cocoide e em estado VBCN de *C. jejuni* pôde invadir e se aderir no tecido das aves. Além disso, Stern et al. (1994) observou que após inocular aves vivas com 6 variantes de *C. jejuni* na forma cocoide, foi possível recuperar 2 variantes das fezes das aves, porém, na forma encurvada e cultivável. Estes achados denotam que *C. jejuni*, mesmo sob a forma viável e não cultivável, apresenta risco de contaminação de carcaças de aves e superfícies de processamento e, sobretudo, de contaminação humana.

Em estudo feito por Ica et al. (2012), foi observada formação de biofilme monoespécie por *C. jejuni*, e multiespécie com *Pseudomonas aeruginosa* em reator de fluxo a 25 e 37°C. Concluíram que *C. jejuni* não era cultivável em biofilmes monoespécie e isso está provavelmente relacionado à exposição ao oxigênio dissolvido. *C. jejuni* foi cultivável em biofilme misto, e o oxigênio dissolvido foi consumido por *P. aeruginosa* através da respiração aeróbica, proporcionando um ambiente favorável para a sobrevivência de *C. jejuni* (ICA et al., 2012). Já no presente estudo, a maioria das amostras de *C. jejuni*, induzidas à formação de biofilme monoespécie em placa de poliestireno, formaram biofilme nas condições de aerobiose e microaerofilia, em diferentes temperaturas e meios de cultivo.

A formação de biofilme de uma amostra de *C. jejuni* M129 foi testada em três meios diferentes, sendo *Mueller-Hinton*, *Brucella*, e caldos *Bolton* e diversas superfícies de contato, como PVC, poliestireno e vidro (Reeser et al., 2007). Houve maior formação de biofilme em caldo *Mueller-Hinton*, que possui menos nutrientes, a 37°C em 10% de atmosfera de CO₂ (microaerofilia) e em superfície de poliestireno. Além disso, foi formado mais biofilme a 37°C em 10% de CO₂ do que a 25°C nas mesmas condições, e ainda, maior formação de biofilme a 25°C em condições aeróbicas do que em 10% de CO₂. Achados semelhantes foram encontrados no presente experimento, em relação à maior formação de biofilme em caldo TSB sem glicose, que é menos nutritivo do que o caldo *Bolton*. Apesar das amostras de *C. jejuni* testadas serem fracamente formadoras de biofilme em poliestireno, a maioria das cepas formou mais biofilme em condições de aerobiose e em caldo TSB em todas as temperaturas testadas. Por isso, foi selecionada a

cepa CJ134 para a formação de biofilme multiespécie, pois teve melhor desempenho na formação de biofilme em caldo TSB e aerobiose, na maioria das temperaturas testadas.

Analisando a pesquisa de Hanning et al. (2008), a adesão de *C. jejuni* em superfícies pode ser facilitada quando introduzido em biofilmes ambientais pré-estabelecidos em condições aeróbicas. Em seu estudo, Hanning et al. (2008), inocularam *C. jejuni* em biofilmes pré-estabelecidos coletados de água de bebida de aviário, drenagem de indústria de processamento de frango, carcaça de frango e caixa de transporte de aves vivas. Os resultados deste estudo indicaram que a sobrevivência de *C. jejuni* cultivável pode ser aumentada, mas é dependente da temperatura e da comunidade do biofilme (HANNING et al., 2008).

Portanto, no presente experimento, a sobrevivência e/ou viabilidade de *C. jejuni* pode ter sido prejudicada por interações de competição entre *S. Enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. Contudo, não se descarta a possibilidade de *C. jejuni* ter formado biofilme e ter adotado um estado VBNC, não podendo ser quantificado pela técnica de viabilidade em meio de cultivo. Os dados da morfologia baseados no uso de microscopia confocal, que serão realizados posteriormente, ajudarão a compreender o comportamento deste patógeno, considerado o mais associado a surtos de DTA em humanos em muitos países (COSTERTON et al., 1995).

Os matadouros-frigoríficos avícolas do Brasil que exportam seus produtos para a União Europeia (EU) devem garantir temperatura ambiente não superior a 12°C na sala de cortes (UNIÃO EUROPEIA, 2004). O resfriamento dos produtos de aves deve ser a uma temperatura de no máximo 4°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, conforme a Portaria nº 210 (BRASIL, 1998). Desta forma, as temperaturas utilizadas neste experimento simulam as temperaturas preconizadas em matadouro-frigorífico avícola: 3±1°C (temperatura de resfriamento, máximo a 4°C); 9±1°C (temperatura de refrigeração; e temperatura de sala de cortes para exportar para UE, máximo de 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*, devido à termotolerância e devido a temperatura ótima de *Campylobacter jejuni*).

Ronner & Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10³ e 10⁵ UFC por cm², respectivamente (3 e 5 log₁₀.UFC.cm⁻²). Oliveira et al. (2015) obteve formação de biofilme monoespécie pela mesma metodologia empregada neste estudo, e nas mesmas superfícies de poliuretano, polietileno e aço

inoxidável, e temperaturas de incubação. A mesma amostra de *S. Enteritidis* (SE24) utilizada neste experimento foi avaliada por Oliveira et al. (2015), que quantificou $5,28 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$ de células aderidas a partir da média das três superfícies. No presente experimento, a formação total de biofilme multiespécie, nas três superfícies testadas esteve de acordo com Ronner & Wong (1993), e correspondeu a $4,673 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$ em polietileno, $3,757 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$ em poliuretano e $3,171 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$ em aço inoxidável, levando em consideração as 4 cepas testadas em todas as temperaturas avaliadas.

Fatores ambientais como pH, disponibilidade de nutrientes, características populacionais das bactérias e temperatura desempenham um papel importante na alteração fenotípica durante a passagem da forma planctônica para a sésil (AZEVEDO & CERCA, 2012). De acordo com Prescotts (2002), as faixas de temperaturas ótimas de crescimento de mesófilos, como *S. Enteritidis* e *E. coli*, fica entre 20°C e 45°C. Tortora et al. (2012) determina que a temperatura mínima de crescimento da *Salmonella* é 5°C e a temperatura ótima é de 37°C. Já *E. coli*, possui sua temperatura mínima de 10°C e máxima de 45°C (PRESCOTT, 2002). *L. monocytogenes* é considerada uma bactéria mesófila com caráter psicrotrófico, das quais as temperaturas ótimas ficam entre 10 e 20°C. Entretanto, alguns autores relatam que a faixa de crescimento de *L. monocytogenes* fica entre 30°C e 37°C (ROCOURT & BUCHRIESER, 2007; SEELINGER & JONES, 1986).

No presente experimento, obtive-se formação de biofilme multiespécie em todas as temperaturas testadas, inclusive nas temperaturas de refrigeração de 3°C e 9°C. Apesar de *L. monocytogenes* ter característica de se multiplicar em baixas temperaturas, esta cepa aderiu apenas a 9°C, enquanto que *E. coli* e *S. Enteritidis* aderiram nas superfícies testadas a 3°C e 9°C. A adesão na temperatura de 3°C pode revelar que microrganismos patogênicos podem aderir em temperaturas de resfriamento de carcaças, como a água do *chiller* nos tanques de aço inoxidável. Até então, a temperatura de 3°C não foi descrita como propícia para o desenvolvimento de biofilmes multiespécie por estes microrganismos, o que torna este experimento de grande relevância, pois denota a possibilidade destes microrganismos se manterem viáveis em biofilmes sob baixa temperatura.

A formação de biofilme a 9°C é preocupante, visto que esta temperatura pode ser atingida em ambiente de refrigeração de alimentos. Ademais, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis* também foram capazes de aderir nas temperaturas de 25°C, 36°C e 42°C,

o que também é um problema, pois representam a temperatura ambiente (25°C) e temperaturas ótimas de crescimento bacteriano (36°C e 42°C). Em análises feitas por Gehlen et al. (2013), cepas de *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos, e por Diedrich et al (2013), com *S. Enteritidis* de surto de DTA e de origem avícola, foram capazes de formar biofilme monoespécie em poliestireno a 3°C, 9°C, 25°C e 36°C em condições atmosféricas ambiente, o que demonstra semelhança com às temperaturas testadas no presente estudo. Oliveira et al. (2015) e Webber (2015) também obtiveram biofilmes formados por *S. Enteritidis* nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C, estando em consonância com este estudo.

Vários estudos tem sido realizados para avaliar a eficácia de tratamentos de higienização em alimentos e superfície de contato com alimentos diante de biofilmes bacterianos (AL-HOLY & RASCO, 2015; OLIVEIRA et al., 2015; ÖLMEZ & TEMUR, 2010; WEBBER, 2015; ZIECH et al., 2016; ZIUZINA et al., 2015). Contudo, estes estudos são feitos com biofilmes monoespécie e, dessa forma, é difícil ter noção de como seria o real tratamento na indústria diante de biofilmes bacterianos mistos. Interações interespécie são a característica natural da ocorrência de biofilmes nas superfícies de processamento e até no próprio alimento processado.

Pelos problemas causados pelo biofilme, o monitoramento e a avaliação da efetividade da higienização em superfícies de processamento de alimentos, como o aço inoxidável, o polietileno e o poliuretano, são verificados pelos programas de autocontrole de qualidade higiênico-sanitária (BRASIL, 2005). De acordo com Contreras et al. (2003), as instalações de indústria de carnes, devem ser limpas e sanitizadas após o térmico do processo produtivo, realizado no final do turno de abate, da qual é denominada higiene pré-operacional. Durante o decorrer do dia, é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção.

O procedimento de higienização nos matadouros-frigoríficos de aves consiste, fundamentalmente, no processo de esfrega através de ação mecânica para remoção de resíduos sólidos, uso de água quente a 45°C com aproximadamente 22,5 bar de pressão no enxague, e o uso de detergentes e sanificantes, como o hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio com posterior enxaguagem. O processo de sanitização é a última etapa do processo de higienização e seu objetivo é reduzir microrganismos degradadores e eliminar patógenos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (MORAES et al., 1997). Para higiene operacional de utensílios, como facas de corte, é utilizada água quente a 85°C por no mínimo 3 minutos (BRASIL, 1998).

Na primeira etapa da pesquisa, a avaliação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, teve a função de verificar a eficácia dos sanitizantes selecionados em células planctônicas ou de vida livre, para que de uma forma, fosse verificado se a eficácia seria também garantida nas células sésseis. As cepas de *S. Enteritidis* e *E. coli* foram resistentes a todas as concentrações de peróxido de hidrogênio testadas; já quanto ao hipoclorito de sódio, ambas cepas foram sensíveis na concentração e tempo recomendado pelo fabricante. Já em relação à cepa de *L. monocytogenes*, está foi resistente aos 2 sanitizantes utilizados, mesmo em concentrações acima do recomendado. A cepa de *C. jejuni* demonstrou-se sensível aos sanitizantes e concentrações recomendadas.

Estes resultados estão de acordo com Carballo e Araújo (2012), que também avaliaram a eficácia de sanitizantes comerciais diante de células planctônicas e em biofilme, por cepas de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. Os pesquisadores perceberam que as concentrações recomendadas pelo fabricante não foram eficazes contra as bactérias, especialmente quando estas estavam aderidas às superfícies. Porém, concentrações duplas ou quádruplas da recomendada, eliminaram as bactérias em suspensão. Essas mesmas concentrações não foram suficientes para eliminar as bactérias aderidas, sendo necessária a combinação do sanitizantes com calor. Contudo, no presente experimento, não foram utilizadas concentrações acima das recomendadas na etapa de biofilmes multiespécie, pois conforme Azevedo e Cerca (2012) e Costerton (1995), isto pode aumentar a resistência dos microrganismos aderidos. Além disso, altas concentrações de sanitizante poderiam resultar em resíduos químicos no alimento processado, caso este procedimento fosse realizado na indústria (ASHRAF et al., 2014).

A eficácia do procedimento de higienização de equipamentos ou superfície é medida pela quantidade de microrganismos viáveis aderidos após essa operação e, geralmente, os equipamentos e utensílios não devem conter mais do que 100 UFC.cm² (Vialta et al., 2002). Contudo, as legislações brasileiras não definem parâmetros microbiológicos para superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de alimentos. Por isso, legislações internacionais são utilizadas como base para manter condições higiênico-sanitárias adequadas, no caso de exportações.

Países em desenvolvimento têm dificuldades em adaptar indústrias aos padrões internacionais, de modo que a *Pan American Health Organization* (PAHO/WHO) recomenda contagens de até 50 UFC/cm² ($1,7 \log_{10}\text{UFC/cm}^2$) /utensílio para mesófilos

aeróbios, e ausência de coliformes termotolerantes, principalmente devido às temperaturas ambientes nestes países (PAHO, 2001).

Conforme a Diretiva 471/2001 da UE, que diz respeito ao teste de superfícies, o nível aceitável recomendado é de até no máximo 10 UFC.cm⁻² de células totais viáveis e 1 UFC.cm⁻² de enterobactérias. Os estabelecimentos certificados à exportação para a União Europeia devem atender a esta diretiva (União Europeia, 2001). A *American Public Health Association* recomenda que, após a ação de sanitizantes físicos ou químicos, as superfícies de utensílios e equipamentos devem possuir menos de 2 UFC/cm² (0.3 log₁₀UFC/cm²) de microrganismos para que as estas superfícies sejam consideradas higienizadas (APHA, 2014).

No presente experimento foram avaliados 3 tratamentos de higienização, comumente utilizados nos Procedimentos Padrões de Higienização Operacional na indústria avícola. O sanitizante hipoclorito de sódio a 2% e a água quente a 85°C foram os mais eficazes diante dos 3,854 log₁₀.UFC.cm⁻² de células aderidas em biofilme multiespécie nas 3 superfícies testadas, reduzindo 3,459 log₁₀.UFC.cm⁻² e 3,457 log₁₀.UFC.cm⁻², respectivamente, sem diferenças estatísticas entre os tratamentos (P=0,982). Os resultados deste experimento estão de acordo com os padrões exigidos pela PAHO/WHO, com exceção do peróxido de hidrogênio na superfície de polietileno (2,718 log₁₀.UFC.cm⁻²). Já de acordo com a Diretiva 471/2001 da União Europeia, as reduções feitas pelos agentes sanitizantes, proporcionaram bactérias remanentes nas superfícies acima do recomendado. A ação da água quente a 85°C e do hipoclorito nas superfícies de polietileno e aço inoxidável, resultaram em valores inferiores a 0,3 log₁₀UFC/cm², estando de acordo com os parâmetro estabelecidos pela APHA (2014).

Os resultados da higienização das superfícies também estão de acordo com Webber (2015), que removeu biofilmes monoespécie formados por cepas de *S. Enteritidis* de origem avícola, nas mesmas superfícies e condições ambientais testadas, pelo uso da água quente a 85°C, ácido peracético a 0,5% e amônia quaternária a 1%. No presente experimento, o sanitizante peróxido de hidrogênio a 0,3% reduziu apenas 1,867 log₁₀.UFC.cm⁻², não demonstrando eficácia diante de biofilmes multiespécies.

Toté et al. (2010), obtiveram ação eficaz dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 1% e peróxido de hidrogênio a 5% por cinco minutos de ação, diante de biofilmes monoespécie formados por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em placa de poliestireno. Entretanto, quando o peróxido de hidrogênio foi utilizado com concentrações inferiores a 0,6%, não houve redução significativa dos biofilmes em

comparação com a contagem total antes dos tratamentos. Salienta-se que, no presente experimento, as concentrações de preparo e tempo de ação dos sanitizantes foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante e, além disso, trata-se da ação de sanitizantes diante de biofilme multiespécie e sem o uso prévio de detergentes.

Os sanitizantes hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, além de serem utilizados amplamente na indústria, são princípio-ativos componentes de diversos produtos de limpeza domésticos. Em estudo feito por Yang et al. (2009) constatou-se que, produtos comumente encontrados em residências, eficazes contra os patógenos *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* tiveram a eficácia nesta ordem: hipoclorito de sódio (concentração de 0,0314%) > peróxido de hidrogênio (concentração de 3%) > vinagre não diluído > bicarbonato de sódio (50% de bicarbonato de sódio), enquanto que a sensibilidade do agente patogênico seguiu a ordem: *Salmonella* Typhimurium > *E. coli*: O157:H7 > *L. monocytogenes*. Estes dados são semelhantes aos encontrados no presente experimento, em que hipoclorito de sódio demonstrou-se mais eficaz que o peróxido de hidrogênio, e a *S. Enteritidis* foi menos removida pela ação sanitizante, quando comparando com *E.coli* e *L. monocytogenes*.

Outros tratamentos complementares a higienização com sanitizantes, diante de biofilmes mono e multiespécie em superfícies de processamento de alimentos, são constantemente estudados. Ban e Kang (2016) testaram o efeito combinado de sanitizantes incluindo hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, iodóforo e o cloreto de benzalcônio com aquecimento a vapor (100°C) na inativação de biofilmes multiespécies. Os microrganismos usados no biofilme foram *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* sob a superfície de aço inoxidável, e condições ambientais de 25°C e 6 dias de incubação. Houve um efeito sinérgico dos sanitizantes e do vapor sobre a viabilidade das células do biofilme com tempo de ação de, evidenciado por plaqueamento em meios seletivos e contagem através de microscopia. Os resultados sugerem que a combinação de sanitizantes com vapor pode ser aplicada para controlar patógenos de origem alimentar na forma de biofilme em instalações de processamento de alimentos como uma intervenção potencial (BAN & KANG, 2016).

Em estudo realizado Rodrigues (2009), foi avaliada a adesão de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em placa de poliestireno. Durante o processo de higiene pré-operacional em salas de cortes de um matadouro-frigorífico avícola, Rodrigues (2009) isolou microrganismos do polietileno das placas de corte, poliuretano das esteiras de transporte e da mesa de aço inoxidável, antes da lavagem, e após

procedimentos de higienização como uso de água quente, detergência e sanitização. É importante destacar que, mesmo após a higienização das superfícies testadas, permaneceram microrganismos aderidos, provavelmente através de biofilmes multiespécie. Por mais que, neste experimento, obteve-se eficácia da higienização com hipoclorito de sódio e água quente a 85°C, alguns microrganismos permaneceram aderidos e, ao se desprenderem, estes poderiam levar a contaminação cruzada de cortes de ave processados após a higienização das superfícies ou a formação de novos biofilmes.

Outro fator importante quanto à formação de biofilmes em matadouro-frigorífico de aves é que a adesão depende da natureza das superfícies inertes e, em parte, das propriedades da superfície bacteriana (CARBALLO & ARAÚJO, 2012). A rugosidade da superfície dos materiais é correlacionada com o número de células ligadas, sendo que superfícies mais rugosas são mais propensas a ter um maior número de células ligadas (GIAOURIS, 2015). Ademais, as superfícies industriais sofrem desgastes pelo uso repetido e isto aumenta as rugosidades e microfissuras, possibilitando acúmulo de sujidades e bactérias (HOLAH & THORPE 1990, STEENACKERS *et al.* 2012; STEPANOVIC *et al.* 2004).

Dos materiais utilizados neste experimento, o aço inoxidável proporcionou menor adesão interespécie e foi mais facilmente higienizado, comparando-se com os polímeros poliuretano e polietileno. O aço inoxidável tem sido considerado o material de escolha nas indústrias alimentícias, pois tem maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com a ampla variedade de polímeros, além de possuir menos porosidades em sua superfície (ANDRADE, 2008; BERNARDES, 2012). Porém, seu uso fica limitado devido ao alto custo e a pouca flexibilidade deste material (ANDRADE, 2008; HOLAH & THORPE, 1990).

Neste estudo, o polietileno ($4,673 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$) e o poliuretano ($3,757 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$) foram as superfícies que mais proporcionaram adesão interespécie, onde *S. Enteritidis* e *E. coli* aderiram estatisticamente semelhantes na superfície de polietileno ($P=0,968$), diante da média de formação de biofilme em todas as temperaturas de incubação testadas. Polímeros, como o polietileno das placas de corte e o poliuretano das esteiras de transporte, são amplamente utilizados na indústria devido ao seu baixo custo, a sua resistência a oxidação e atoxicidade (ANDRADE, 2008). Contudo, este material é composto de mais porosidades e microfissuras quando comparados com materiais metálicos, como o aço inoxidável, o que proporciona maior adesão de microrganismos.

Durante as últimas décadas, a persistência de patógenos bacterianos em ambientes de processamento de carne tem-se tornado cada vez mais evidente (GIAOURIS, 2015). Entender a dinâmica de adesão interespécie no ambiente industrial pode contribuir para o desenvolvimento de formas de remoção de biofilmes mais eficazes.

Estudos como o atual experimento, que avaliam a interação interespécie de bactérias de caráter patogênico e os efeitos de procedimentos de higienização, contribuem para avaliar qual a melhor forma de erradicar estes biofilmes. Por exemplo, a ação do sanitizante hipoclorito de sódio combinado com água a 85°C, seria uma possível estratégia de eliminação de biofilmes, assim conforme sugerido por Bang & Kang (2016) e Carballo e Araújo (2012), que estudaram o efeito combinado de sanitizantes químicos com vapor e água quente, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente experimento apoiam a relevância dos procedimentos de higienização nas superfícies de contato com os alimentos cárneos. Também, foi verificada formação de biofilme no decorrer de 24 horas, em intervalos em que são realizados os procedimentos padrão de higiene operacional (4, 12 e 24 horas), o que enfatiza a necessidade de procedimentos de limpeza mais eficazes durante todo o processamento de alimentos.

Um dos pontos mais relevantes deste estudo diz respeito à realidade na indústria avícola quanto à formação de biofilmes multiespécies por microrganismos de caráter patogênico, e a preocupante dificuldade de eliminação destes biofilmes por procedimentos rotineiros de higienização. Todavia, salienta-se que, neste experimento, não foi avaliada a ação de detergentes diante dos biofilmes, da qual é a primeira fase de higienização na indústria. Por isso, deve-se considerar que a fase da detergência pode aumentar a eficácia dos sanitizantes e da água aquecida a 85°C diante de biofilmes.

Estudos com o intuito de verificar a interação de biofilmes multiespécies e efeitos de procedimentos de higienização podem servir para estimular outras pesquisas com o mesmo propósito, para que mais dados sobre a dinâmica de interação interespecie sejam evidenciados e novas estratégias de eliminação destes biofilmes na indústria possam ser elaboradas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste experimento são de fundamental relevância devido à possibilidade de permanência de *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e, provavelmente, *Campylobacter jejuni*, microrganismos de caráter patogênico, em ambientes de processamento de alimentos na forma de biofilmes. E, também, por estes apresentarem resistência a sanitizantes usados em procedimentos de higienização rotineiramente nas indústrias de alimentos. Por isso, tais resultados impulsionam que novas pesquisas sejam realizadas quanto à dinâmica de formação de biofilmes multiespécie na indústria avícola e estratégias de controle. Dessa maneira, não só a indústria avícola, como toda a indústria de produtos de origem animal, poderão aprimorar as condições higiênico-sanitárias de seus estabelecimentos.

Como continuação deste experimento, parte dos cupons testados correspondentes às superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, impregnados de biofilme multiespécie antes e após a higienização, foram armazenados em condições específicas para posterior análise microscópica, pela técnica de microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (CLSM).

Para dar prosseguimento aos estudos da dinâmica de formação de biofilmes e alternativas de controle na indústria alimentícia, outros projetos já estão sendo desenvolvidos pelo grupo de pós-graduandos do programa de Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo (PPGBioexp-UPF) e do programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UPF (PPGCTA). Outra parte será realizada pelos pós-graduandos do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA-UFRGS).

Concomitante a este experimento, outro estudo foi realizado pelo grupo de pesquisa do PPGCTA da UPF. Alíquotas do material, onde os cupons das superfícies foram processados, foram coletados para posterior pesquisa de moléculas sinalizadoras de *Quorum sensing* (comunicação celular) e de substância polimérica extracelular (EPS), que auxilia na estruturação dos biofilmes. Na UPF já está em fase de conclusão o isolamento de bacteriófagos específicos para sorovares de *Salmonella* spp. para posterior aplicação em biofilmes. Além disso, pesquisas quanto à formação de biofilme monoespécie, por *Salmonella* Enteritidis de diferentes origens, nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, já foram realizados na UPF por Webber (2015) e Oliveira et al. (2015), projetos que foram citados neste estudo.

Estudos mais minuciosos são necessários para desenvolver estratégias para controlar a formação de biofilmes na indústria avícola. O primeiro passo é entender a dinâmica de formação de biofilmes multiespécie. Compreendendo situações como quais microrganismos são mais prevalentes em biofilmes em cada tipo de superfície industrial, e quais interações interespécie (comunicação celular, trocas genéticas) proporcionam cooperação ou competição entre componentes do biofilme, podem ser pontos-chave para desenvolver uma estratégia eficiente para controlar os biofilmes.

Além disso, a integração de novos métodos de higienização na indústria são constantemente estudados. Por isso, em algum momento, estes novos métodos poderão substituir os métodos rotineiros de higienização, principalmente em resposta à resistência bacteriana aumentada diante dos habituais sanitizantes químicos quando os microrganismos estão na condição de biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicações/8ca705e70f0cb110aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em: nov-2015.
- AKBAS, M.Y. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Méndez-Vilas, Ed.). **Formatex**, 2015, p.383-394.
- AL-HOLY, M.A. & RASCO, B.A. The bactericidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water against Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes on raw fish, chicken and beef surfaces. **Food Control**, v.54, p.317–321, 2015.
- ALIATTI, L.N.S. Cinética e resistência de Escherichia coli na adesão e formação de biofilmes em sondas vesicais. **Dissertação** (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS. 2013.
- ALTEKRUSE et al. Enumeration of Escherichia coli Cells on Chicken Carcasses as a Potential Measure of Microbial Process Control in a Random Selection of Slaughter Establishments in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.11, p. 3522–3527, Jun-2009.
- ANDRADE N.J. 2008. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S. Salmonella e saúde intestinal. In: **Conferência FACTA-Prêmio Lamas**. Campinas. Anais... Campinas: FACTA, 2013. p.393-424. 1 CD-ROM.
- APHA. **American Public Health Association**, 2014. [Internet] Disponível em: <<http://www.apha.org/>>. Acesso em: nov/2015.
- ARNES, L.B; CASKEY, K. Using ozone in the prevention of bacterial biofilm formation and scaling. **Water Conditioning & Purification Magazine**. 2002 Disponível em: <<http://www.prozoneint.com/pdf/biofilms.pdf>>. Acesso em: dez-2015.
- ASHRAF, M.A., ULLAH, S., AHMAD, I. et al. Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. **J. Sci. Food Agric.**, v. 94, p. 388-403, 2014.
- ÁVILA, L.A.F. Redução do nível de contaminação por Salmonella Enteritidis em frangos de corte. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias com ênfase em Sanidade Avícola) Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2005.
- AZEVEDO N.F & CERCA N. **Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto, Portugal: Publindústria Edições Técnicas, pp 396, 2012.
- BACK, A. **Manual de doenças de aves**. 2.ed. Editora Integração: Cascavel, PR. 2010. 311p.
- BANG, 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.
- BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V, PORTO, E. et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, n.1, p.155-168, 2011.
- BARNES, H.J.; NOLAN, L.K. Others Bacterial Disease. In: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2008. Cap 23, p.952-970.

- BARNES, H.J.; NOLAN, L.K. Others Bacterial Disease. *In*: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2008. Cap 23, p.952-970.
- BARNES, H.J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J-P. Colibacillosis. *In*: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 12th ed. Ed. Calnek, B.D.. Ames: University Press, 2008. p.691-737.
- BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. *In*: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap 18, p.631-656.
- BELLUCO, S.; BARCO, L; ROCCATO, A.; RICCI, A. *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v.60, p.269-280, 2016.
- BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v.322, p.249–289, 2008.
- BERCHIERI JR., A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses aviárias. *In*: BERCHIERI JR. A. *et al.* (Eds). **Doença das aves**. 2 ed. Campinas: Facta, 2009, p. 128-158.
- BERCHIERI, J.A. *et al.* **Doenças das aves**. São Paulo. Facta, 2009. 1104 p.
- BERG, B.V.D et al. Guillain–Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **Nature Reviews Neurology**, v.10, p.469–482, jun-2014.
- BERNARDES, P.C. et al. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surfasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.43, n.4, p.1261-1268, 2012.
- BONSAGLIA, E.C. R. et al. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 386-391, 2014.
- BOWER CK, MCGUIRE J, DAESCHEL MA. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends Food Sci Technol.**, v.7, p.152–157, 1996.
- BOWER, C.K; MCGUIRE, J; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends on Food Science & Technology**. v.7, n.5, p. 152-157. 1996.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 outubro de 2003b, seção 1; p. 9.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Norma Interna SDA nº 2, de 11 de outubro de 2013, aprova o programa exploratório para pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos abatidos em estabelecimentos registrados junto ao Serviço de Inspeção Federal (SIF). **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de outubro de 2013.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA. – Ano 1, n. 1 (2015) – Brasília, DF: Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Coordenação Geral de Programas Especiais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2015b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 5 de março de 1999, seção 1, p. 17.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº 9, de 08 de abril de 2009. Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de abril de 2009, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 78, 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 União**, Brasília, de 05 de novembro de 2003a, seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria ministerial Nº 193, de 19 de setembro de 1994 – Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 22 de setembro de 1994, Seção 1, p.14309.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101, de 17 de agosto de 1993. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. **Diário Oficial da União**, DF, 17 de agosto de 1993, Seção I, p. 11937-45.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). Circular n. 175/2005/CGPE/DIPOA, de 16 de maio de 2005. Dispõe sobre procedimentos de verificação dos programas de autocontrole. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Doenças Transmitidas por Alimentos – período de 2000 a 2015**. 2015a. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: dez-2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Vigilância epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimento - VE- DTA – período de 2000 a 2014**. 2014. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: dez-2015.

BRIDIER, A., SANCHEZ-VIZUETE, P., GUILBAUD, M. et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiol.**, v.45, p.167–178, 2015.

BRIDIERA, A.; BRIANDETA, R.; THOMAS, V.; et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p.1017–1032, 2011.

BRONOWSKI, C.; JAMES, C.E.; WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v.356, n.1, p.8-19, 2014.

BRONOWSKI, C.; JAMES, C.E.; WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microb. Letters**, v.356, n.1, p.8-19, 2014.

BURMØLLE, M.; REN, D.; BJARNSHOLT, T.; SØRENSEN, S.J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n.2, p.84-91, 2014.

CALY, D.; TAKILT, D.; LEBRET, V.; TRESSE, O. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. **Lett Appl Microbiol**, v.49, n.6, p751–756, 2009.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. Escherichia. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.215-228.

CARBALLO, J.; ARAUJO, A.B. Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.32, n.3, p.606-612, 2012.

CARDOSO, A.S.P.; TESSARI, E.C. *Salmonella* Enteritidis em aves e na saúde pública: Revisão de Literatura. **Rev. Cient. Eletr. de Med. Vet.**, v. 21, n. 1, 2013.

CARDOSO, C.W. et al. Outbreak of acute exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil (carta). **Emerg Infect Dis**. 2015.

CARDOSO, M.F.; MIGUEL, V.; PEREIRA, C.A.M. Evaluation of sanitary conditions and good manufacturing practices in bakeries. **Aliment. Nutr.**, v.22, n.2, p.211-217, 2011.

CARELI, R.T. Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos. 81 f. Viçosa, MG. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) Universidade Federal de Viçosa, 2001.

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

CARVALHO, A.F. Detecção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto Biológico, 2009.

CARVALHO, A.F. et al. Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.5, p.1054-1061, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2016. **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>>. Acesso em: fev/2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2014c. **Sources of infection**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/sources.html>>. Acesso em: nov-2015.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2014d. **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Roos Foods Dairy Products** (Final Update). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-14/index.html>>. Acesso em: nov-2015.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Escherichia coli – General Information**. 2014b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: dez-2015.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Health Information for International Travel 2016**. New York: Oxford University Press; 2016. Gary W. Brunette, Editor in Chief, Centers for Disease Control and Prevention, Division of Global Migration and Quarantine.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Tracking and Reporting Foodborne Disease Outbreaks**. 2014a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/features/dsfoodborneoutbreaks/>>. Acesso em: nov-2015.

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**. v.28, n.29, p.4192-9, 2007.

CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B; et al. **Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados**. São Paulo: Varela. 1. ed., 2003, 210 p.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E. et al. Microbial Biofilms. **Annu Rev Microbiol.**, v.49, p.711-45, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n.5418, p.1318-22, 1999.

CRIM, S.M. et al. Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — **Foodborne Diseases Active Surveillance Network**, 10 U.S. Sites, 2006–2014. **MMWR**, May 15, 2015, v. 64, n. 18, p.495-499.

CRUZ, C. D.; et al. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.2, p. 195-206, abr-jun., 2008.

CULLER, H.F. Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other. **Process Controls. Food Technology**, v.56, p.11, 2002.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Biofilms: recent developments on an old battle. **Recent Patents on Biotechnology**, v.1, n.1, 49-57, 2007.

DI BONAVENTURA, G., PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D. et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **A. J Appl Microbiol.**, v.104, n.6, p.1552-61, jun-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.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin Microbiol Rev**. v.15, n.2, p.167–193, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n. 2, p.277-28, 2001.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p.881-890, 2002.

EFSA - ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **EFSA Journal** **2015**; v.13, n.1, 3991, 165 p.

ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.5, p.990-1004, set-2012.

ESPER, L. M. R. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*: quorum sensing, formação de biofilme e ação de sanitizantes. **Tese** (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP: [s.n.], 2010.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Listeria monocytogenes**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/ucm070064.htm> 2014>. Acesso em: fev-2016.

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

FARROKL, et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v.162, p.190-212, 2013.

FERNANDES, M.S.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v.200, p.5–12, 2015.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ateneu, p. 34. 1996.

FRASÃO, B.S. et al . Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 7, p. 613-619, 2015.

FRASER, C.M. **Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário**. 7^oed. São Paulo: Roca, 1996.

FUSTER-VALLS N, Hernández-Herrero M, Marín-de-Mateo M, Rodríguez-Jerez JJ. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v.19, n.3, p.308-314, 2008.

GAMBLE, R.; MURIANA, P. M. A microplate fluorescence assay for the measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat processing plants to adhere to abiotic surfaces. **Applied Environment Microbiology**. v.73, p.5235–5244, 2007.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 12 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.619-631.

GEHLEN et al. Formação de biofilme e resistência à antimicrobianos por *Listeria monocytogenes* isoladas de queijos. **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 et al. 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).

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HEBRAUD, M. *et al.* 2014. 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.2, p. 298–309, 2014.

GIAOURIS, G. Ability of Foodborne Bacterial Pathogens to Attach to Meat and Meat Contact Surfaces. In: **Biofilms in the Food Environment**, Second Edition. Eds. POMETTO III, A.L. and DEMIRCI, A. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. p.145–175, 2015.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1999.

GONÇALVES, K. O. et al. *Campylobacter* spp. em carne de frango. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 211-216, abr./jun. 2012.

GRAY, M. J.; ZADOKS, R. N.; FORTES, E. D. et al. *Listeria monocytogenes* isolates from food and humans form distinct but overlapping populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 5833 - 5841, 2004.

GRIMONT P, WEIL F. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: World Health Organization. 9th edn Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur Paris**. p.6-7, 2007.

GUNTHER, N.W.; CHEN; C.Y. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiol.**, v.26, n.1, p.44–51, 2009.

HAMON, M.; BIERNE, H.; & COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews, Microbiology**, v.4, p. 423-434, jun-2006.

HANNING, I.; JARQUIN, R.; SLAVIK, M. *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. **J. Appl. Microbiol.** 105, 1199–1208, 2008.

HANSEN, S.K. et al. Evolution of species interactions in a biofilm community. **Nature**, v.445, p.533–536, 2007.

HAYES, P. R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. p.187- 196.

HOFER, C. B., et al. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 375-377, 1999.

HOFER, E., et al. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 173-177, 1998.

HOFER, E.; REIS, C.; HOFER, C.B. Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolate from human clinical specimens. **Revis. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.1, p.32-37, jan-fev. 2006.

HOLAH, J.T.; THORPE, R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Microbiology**. Inglaterra, v.69, n.4, p.599-608, 1990.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v.6, n.1, p.9-18, 1996.

ICA, T.; CANER, V.; ISTANBULLU, O. et al. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. **Appl Environ Microb**, v.78, p.1033–1038, 2012.

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.

JANG, K.I.; KIM, M.G.; HA, S.D. et al. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.202–206, 2007.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JEONG, D. K., FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy environments. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 27, p. 415-424, 1994.

JOHNSON, J.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, poultry and egg products. In: **USDA-FSIS Microbiology Laboratory guidebook**. 3 ed., v.1, 1998.

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

KASNOWSKI, M.C; MANTILLA, S.P.S.; OLIVEIRA, L.A.T. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.**, v. 15, p.1-23, 2010.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. et al. Occurrence And Characterization Of *Campylobacter* In the Brazilian Production and Processing Of Broilers. **Avian Diseases Digest.**, v.3, n.4, p.27, dez-2008.

KUSUMANINGRUM, H. D., et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 83, n. 3, p. 227-236, 2003.

LEMON, K. P, HIGGINS, D. E, KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.4418-4424, 2007.

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

MAGAJNA, B.A.; SCHRAFT, H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4°C more quickly than their planktonic counterparts. **Food Control**, v.50, p.45-50, 2015.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochim Acta**, v.52, n.27, p.7670-80, 2007.

MANUZON, M.Y. & WANG, H.H. **Mixed Culture Biofilms, in Biofilms in the Food Environment** (eds H. P. Blaschek, H. H. Wang and M. E. Agle), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA. Ano 1, n. 1 (2015) Brasília, DF: **Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal**, Coordenação Geral de Programas Especiais, 2015.

MARKKULA, A. et al. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.

MIDELET, G., & CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n.2, 262-270, 2004.

MILLES, A. A. L. & MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.

MITCHELL, N.M., et al. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. **Appl Environ Microbiol.**, v. 81, p. 1177–1187, 2015.

MMWR. Vital Signs: *Listeria* Illnesses, Deaths, and Outbreaks — United States, 2009–2011. Centers for Disease Control and Prevention, **MMWR**, Jun 7, 2013, v. 62, n. 22, p.448-452. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6222.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2015.

MORAES, M.S.V.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P. et al. Isolament of aerobic mesophilic and thermophilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.17, p.325-329, 1997.

MOREY, A. & SINGH, S. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. **Foodborne pathogens and disease**; v.9, n.3, 2010.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. **Medical Microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2005.

NADON, C. A.; WOODWARD, D. L.; YOUNG, C.; RODGERS, F. G.; WIDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2704 – 2707, 2001.

NALÉRIO, E.S. et al. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.3, p. 626-630, jul.-set. 2009.

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

NEYRET, C.; HERRY, J.M.; MEYLHEUC, T.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Plant-derived compounds as natural antimicrobials to control paper mill biofilms. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.41, p. 87-96, 2014.

NIKOLAEV, Y.A., PLAKUNOV, V.K. Biofilm – “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Mikrobiologiya**, v.76, n.2, p.149-63, 2007.

OLIVEIRA, A. L.; et al. Prevalence of *ColV* Plasmid-Linked Genes and In Vivo Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*. **Foodborne pathogens and disease**. vol. 12, nº 8, 2015.

OLIVEIRA, A. P. et al. 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, vol.9 (2015), 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

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p.277-284, 2010.

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

ÖLMEZ, H. & TEMUR, S.D. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. **LWT-Food Science and Technology**, v.43, n. 6, p.964–970, 2006.

ORSI, R. H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5273-5287, 2016.

OZDEMIR, H.O. et al. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. **Journal of Endodontics**, v.36, n.5, p842-846, 2010.

PAHO. *Pan American Health Association*. Disponível em: <<http://www.paho.org>>. 2001.

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

PAULA, C.M.D. Avaliação da Resistência térmica, ácida e a desinfetantes de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 isoladas no sul do Brasil. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PAULA, C.M.D; CASARIN, L.S.; TONDO, E.C. *Escherichia coli* O157:H7 — patógeno alimentar emergente. **Vig Sanit Debate**, v.2, n.4, p.23-33, 2014.

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, 2015.

PERDONCINI, G.; et al. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.35, n.4, p.349-352, abril 2015.

PICCOLOMINI, G.R, PALUDI, D., D'ORIO, V, VERGARA, CONTER, M., et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **J Appl Microbiol.**, v.104, p.1552–61, 2008.

PRESCOTT, L. M., HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology** (5th ed., international ed). McGraw-Hill, Boston, 2002.

REESER, R.J.; MEDLER, R.T.; BILLINGTON, S.J. et al. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p.1908–1913, 2007.

REISNER, A; KROGFELT, KA, KLEIN, BM et al. *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. **J Bacteriol.**, v.188, n.10, p.3572-81, Mai-2006.

REUTER M, MALLETT A, PEARSON BM et al. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environ. Microb.**, v.76, p.2122-2128, 2010.

ROCOURT, J., BUCHRIESER, C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**, v.3, p.283-304, 2007.

RODRIGUES, L. B. et al. *Salmonella* and *Listeria* from Stainless Steel, Polyurethane and Polyethylene Surfaces in the Cutting Room of a Poultry Slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1-7, 2013.

RODRIGUES, L.B. Avaliação da formação de biofilmes e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias com ênfase em Sanidade Avícola). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

RODRIGUES, L.R.; SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N. et al. *Salmonella* and *Listeria* from Stainless Steel, Polyurethane and Polyethylene Surfaces in the Cutting Room of a Poultry Slaughterhouse. **Acta Scientiae Veterinary**, v.41, p.1-7, 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.

ROSA, S. Isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. em linguças de frango frescal. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Goiás, GO, 2015.

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.

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.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B.L. The Languages Of Bacteria. **Genes Dev.**, v.15, n.1468-80, 2001.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, vol.25, n.7, pp.501-505, 2003.

SEELINGER, H. P. R., JONES, D. *Listeria*. In: Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p.1235–1245, 1986.

SESTERHENN, R.; FERREIRA, T.Z.; KINDLEIN, L.; MORAES, H.L.S. Impactos econômicos de condenações *post mortem* de aves sob inspeção estadual no estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 38°, 2011. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CONBRAVET, 2011.

SIGARINI, C.O. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em frangos alternativos. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, - São Paulo, 2009.

SILVA, C.F. Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilme. **Dissertação** (Mestrado em Bioexperimentação) Universidade de Passo Fundo, 2014

SILVA, C.F., GEHLEN, S.S.; WEBBER, B. et al. Biofilm Former *Salmonella* Enteritidis are Multiresistant to Antibiotics. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1229.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1995. 228 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., MACHADO, I. et al. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts**, v. 84, n.4, p.338-345, 2006.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, n.4, p.573-583, 2010.

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.

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, p.439-447, 2000.

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

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J. et al. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Res. Intern.**, v.45, n.2, p.502–531, 2012.

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

STEPANOVIC', S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiology Methods**, v. 40, p.175-179, 2000.

STEPANOVIC', S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428–432, 2004.

STERN, N.J.; JONES, D.M.; WESLEY, I.V. & ROLLINS, D.M. Colonization of chicks by non-culturable *Campylobacter* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p.333–336, 1994.

SULAEMAN, S. et al. Enhanced Adhesion of *Campylobacter jejuni* to Abiotic Surfaces Is Mediated by Membrane Proteins in Oxygen-Enriched Conditions. **PLoS ONE**, v.7, n.9, 2012.

SUNG, K. & KHAN, S. Biofilm Development by *Campylobacter Jejuni*. In: **Biofilms in the Food Environment**. 2nd Ed. (eds A. L. Pometto and A. Demirci). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2015.

SVENSSON, S.L.; FRIRDICH, E., GAYNOR, E.C. Survival strategies of *Campylobacter jejuni*: stress responses, the viable but nonculturable state, and biofilm. In: **Campylobacter**, 3rd Edition. Nachamkin, I., Szymanski, C. M. and Blaser, M. J. (eds.). ASM Press: Washington, D.C., p. 571–590, 2008.

THÉVENOT, D.; DERNBURG, A; VERNZOZY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology** v.101, p.7–17, 2006.

TODHANAKASEM, T.; YOUNG G. M: Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. **Journal of Bacteriology**, v.190, p.6030-6034, 2008.

TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. **Microb Ecol.**; 40:75–84, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOTÉ, K. et al. Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.10, p.3135–3142, 2010.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. Songklanakarin **Journal Science and Technology**, v.25, p.807-815, 2003.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, J.M. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013

UBABEF - **União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2013**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>. Acesso em: nov-2015.

UHITIL, S. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, v. 15, n.3, p. 213-216, 2004.

UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2001/471/CE de 8 de junho de 2001. Regras para os controles regulares à higiene geral dos estabelecimentos. **Comissão da Comunidades Européias**, Europa, 2001.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento 853/2004/CE. Higiene durante e após o corte e desossa. Anexo III, secção II. Capítulo V ponto 1 (a) (b). **Comissão da Comunidades Européias**, Europa, 2004.

USDA. **FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products** – Jan-2014. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577e74a1e549fde/Controlling_LM_RTE_Guideline_0912?MOD=AJPERES>. Acesso em: fev-2016.

USDA. **FSIS Recalls and Public Health Alerts**. 2016. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/recalls-and-public-health-alerts/recall-case-archive/archive/2016/recall-021-2016-release>>. Acesso em: fev-2016.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Listeria monocytogenes*. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Londres: Marison, 1996. chap. 16, p. 327-345.

VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Rev Chilena Infectol**, v.30, n.4, p.407-416, 2013.

VIALTA, A.; MORENO, I.; VALLE, J.L.E. Boas Práticas de Fabricação, Higienização e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Indústria de Laticínios: 1-Requeijão. **Indústria de Laticínios**, v.37, p.56-63, 2002.

VLKOVÁ, H.; BABÁK, V. SEYDLOVÁ, R. et al. Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms. **Review**, v. 26, N. 5, p.309–323, 2008.

VORNHAGEN, J. et al. Coaggregation occurs amongst bacteria within and between domestic showerhead biofilms. **Biofouling**, 29(1), 53–68, 2013.

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

WHO. World Health Organization. **Estimates of the global burden of foodborne diseases**, 2010. Disponível em: <https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G36/PROD/EXT/FoodborneDiseaseBurden.>. Acesso em: fev/2016.

WHO. World Health Organization. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat**. p. 69, 2009.

WHO. World Health Organization. **Global Foodborne Infections Network (GFN) Country Databank**. 2014. Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,1&_dad=portal&_schema=PORTAL>. Acesso em: dez-2015.

WHO. World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. **Global Salm Surv.** Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_params>. Acesso em: nov-2015.

WHO. World Health Organization. **Global Network Global Foodborne Infections Network**. May 2011 Vol IV. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/GFN_update_may_2011.pdf?ua=1>. Acesso em: nov-2015.

WHO. World Health Organization. *Salmonella*. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: nov-2015.

WHO. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=>>. Acesso em: fev-2016.

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

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.

YANG, H.; KENDALL, P.A.; MEDEIROS, L., & SOFOS, J.N. Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium with compounds available in households. **Journal of Food Protection**, v.72, p.1201–1208, 2009.

YANG, L., LIU, Y., WU, H. et al. Current understanding of multi-species biofilms. **International Journal of Oral Science**, v.3, n.2, p.74–81, 2011.

ZIECH, R.E.; PERIN, A.P.; LAMPUGNANI, C. et al. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **LWT - Food Science and Technology**, v.68, p.85–90, 2016.

ZIUZINA, D.; BOEHM, D.; PATIL, S. et al. Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors. **PLoS One**, v.10, n.9, 2015.