

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

DANIELE DE AMORIM VENTURINI

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS
PRODUZIDAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA FORMAÇÃO
DO BIOFILME MULTIESPÉCIE DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2017

DANIELE DE AMORIM VENTURINI

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS
PRODUZIDAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA FORMAÇÃO
DO BIOFILME MULTIESPÉCIE DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, do Departamento Acadêmico de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria dos Anjos Szczerepa

CAMPO MOURÃO

2017



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS
PRODUZIDAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA FORMAÇÃO
DO BIOFILME MULTIESPÉCIE DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL

por

DANIELE DE AMORIM VENTURINI

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado dia 22 de junho de 2017 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado

Prof^a. Dr.^a Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini
(Orientadora)

Prof^a. Dr.^a Márcia Maria dos Anjos Szczerepa
(Co-orientadora)

Prof^a. Dr.^a Fernanda Vitória Leimann
Membro da banca

Prof^a. Msc. Idinea Fernandes dos Santos
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela banca examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Alimentos da UTFPR câmpus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e paciência em todos os momentos da minha graduação, por me guiar na elaboração deste trabalho, e me dado ânimo mesmo nos momentos mais difíceis.

Meus pais e meu irmão, agradeço pelas palavras de incentivo e por sempre acreditarem na minha capacidade, não deixando eu desistir ou desanimar no meio do caminho. Não sei o que faria sem vocês, obrigada pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini, agradeço muito pelo apoio, sugestões e pela sua grande compreensão. Já a minha co-orientadora Profa. Dra. Marcia Maria do Anjos Szczerepa, sou imensamente grata pela enorme paciência que teve comigo desde o início, e por sempre ser acessível, ajudando com toda serenidade possível, me dando apoio e por compartilhar seus conhecimentos. Você com certeza é um grande exemplo de profissional e ser humano.

Meus agradecimentos vão também aos meus professores, que durante toda a graduação contribuíram na minha formação profissional e me deram base para chegar até o final do curso, sem vocês nada disso seria possível.

Sou grata os técnicos e estagiários do laboratório de apoio de alimentos da UTFPR- Campus Campo Mourão, que me auxiliaram, de forma direta e indireta para a realização das análises.

À banca, meu muito obrigado pelas sugestões e críticas construtivas, que foram muito importantes na elaboração deste trabalho.

Também sou grata pelo apoio de meus amigos, que estão comigo desde o início da graduação, Jaqueline, Taislaine, Érika e Michel, os quais a amizade e forte companheirismo fizeram toda a diferença na minha caminhada acadêmica, assim como aos meus amigos de longa data, Tharsis, Aline e Thaianne, que seja por mensagens, ou pessoalmente, sempre me apoiaram e vibravam com minhas conquistas.

RESUMO

VENTURINI, Daniele de Amorim. Avaliação da ação de moléculas sinalizadoras produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* na formação do biofilme multiespécie de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável. 2017. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2017.

Em indústrias alimentícias, as próprias condições do ambiente de processamento favorecem a aderência bacteriana e posterior desenvolvimento de biofilmes em superfícies, fato agravado por sanitização deficiente. Os biofilmes desenvolvidos em superfícies de processamento de alimentos são um grave problema pois tornam-se uma fonte crônica de contaminação por patógenos. Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar a ação de moléculas sinalizadoras produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, sobre as bactérias potenciais formadoras de biofilme, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em superfície de aço inox AISI 304, tanto em monoespécie quanto multiespécie, nas temperaturas de 25°C e 35°C por 24 h, utilizando como substratos o caldo Miller Hinton (MH) e o exsudado de carne, simulando um resíduo alimentar comum ao ambiente de processamento de carne. Para tal, as cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram ativadas e inoculadas em eppendorfs contendo cupons de aço e os substratos, sendo que parte do substrato (30% e 60%) foi substituído pelo sobrenadante livre de células viáveis (SLCV) de *P. aeruginosa*. Após a incubação, para a quantificação do biofilme, foi utilizado o método de coloração por cristal violeta e procedida a leitura do sobrenadante após o decoloramento com etanol 95% em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. Os resultados demonstraram que o substrato de exsudado de carne favoreceu a formação de biofilme mono e multiespécie, quando comparado com o caldo MH. A substituição de 30% do substrato pelo SLCV de *P. aeruginosa* reduziu significativamente a densidade do biofilme formado. Quando substituído 60% do substrato pelo SLCV de *P. aeruginosa* a redução obtida não foi tão expressiva, e na temperatura de 35 °C no caldo MH houve um favorecimento na formação do biofilme formado nesta porcentagem de SLCV. Como conclusão, temos que as moléculas produzidas por *P. aeruginosa* presentes no SLCV influenciaram a formação de biofilme mono e multiéspecie de *E. coli* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável sob as condições avaliadas, demonstrando grande potencial de pesquisa e aplicação dessas moléculas no combate a formação de biofilme.

Palavras-chave: biofilme. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*. moléculas sinalizadoras.

ABSTRACT

VENTURINI, Daniele de Amorim. Evaluation of the action of signaling molecules produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the formation of the multispecies biofilm of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel surface. 2017.49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2017.

In food industries, the very conditions of the processing environment favor bacterial adhesion and subsequent development of biofilms on surfaces, a fact aggravated by poor sanitation. Biofilms developed on food processing surfaces are a serious problem as they become a chronic source of contamination by pathogens. Thus, the objective of this work was to evaluate the action of signaling molecules produced by *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm-forming bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, on AISI 304 stainless steel surface, both in monospecies and multispecies, at temperatures of 25°C and 35°C for 24 h using Miller Hinton broth (MH) and meat exudate as substrates, simulating a common food residue in the meat processing environment. For this, strains of *E. coli* and *S. aureus* were activated and inoculated on eppendorfs containing steel coupons and substrates, and part of the substrate (30% and 60%) was replaced with viable cell free supernatant (SLCV) of *P. aeruginosa*. After incubation, for the biofilm quantification, the violet crystal staining method was used and the supernatant was read after discolouring with 95% ethanol in a spectrophotometer with a wavelength of 570 nm. The results showed that the meat exudate substrate favored the formation of mono- and multispecies biofilms when compared to the MH broth. The substitution of 30% of the substrate by the *P. aeruginosa* SLCV significantly reduced the density of the formed biofilm. When 60% of the substrate was replaced by the *P. aeruginosa* SLCV the reduction obtained was not as expressive, and at 35°C in the MH broth there was a favor in the formation of the biofilm formed in this percentage of SLCV. As conclusion, we have that the molecules produced by *P. aeruginosa* present in the SLCV influenced the formation of mono and multispecies biofilm of *E. coli* and *S. aureus* on stainless steel surface under the conditions evaluated, demonstrating great potential of research and application of these molecules In the fight against biofilm formation.

Key-words: biofilm. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*. signaling molecules.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Etapas de formação de um biofilme.	19
FIGURA 2 - Representação esquemática das redes de sinalização QS em <i>P. aeruginosa</i> e seus respectivos reguladores.	27
FIGURA 3 - Quantificação do biofilme mono-espécie e multiespécie de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> adicionado de SLCV de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes substratos a 35°C.....	35
Figura 4 - Quantificação do biofilme mono-espécie e multiespécie de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> adicionado de SLCV de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes substratos a 25°C.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito da adição do sobrenadante livre de células de <i>P. aeruginosa</i> na formação de biofilme mono e multiespécie de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	34
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 BIOFILME	18
3.1 COMPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DO BIOFILME	18
3.2 BIOFILME NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....	20
3.3 BIOFILME NA INDÚSTRIA DE CARNES	21
3.4 SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL E ADESÃO BACTERIANA	22
3.5 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	23
3.6 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	24
3.7 PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAIS.....	29
4.2 ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	29
4.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO E SALINA.....	30
4.4 ADERÊNCIA E CRESCIMENTO DO BIOFILME MONOESPÉCIE E MULTIESPÉCIE.....	30
4.5 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME.....	31
4.6 PREPARO DO SOBRENADANTE DE <i>P. AERUGINOSA</i>	31
4.7. APLICAÇÃO DO SOBRENADANTE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME	31
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos a superfícies diversas que, mais especificamente podem ser definidos como células microbianas agrupadas sobre superfície, dentro de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácidos teicóicos e ácidos nucleicos (SHI; ZHU, 2009).

Para sua formação, as etapas mais importantes são as de adesões iniciais, seguindo com a passagem do microrganismo de sua forma planctônica ao sésil, formação de micro colônias, maturação, destacamento das células, e por último retornando a conformação planctônica, constituindo um ciclo de formação de biofilmes (BOARI et al., 2008).

Caixeta (2008) destaca que em indústrias alimentícias, as condições dos ambientes de processamento, como por exemplo, o fluxo de água, presença de materiais crus e alta concentração de alimentos, favorecem a aderência bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes. Tornam-se então indesejáveis a adesão e formação de biofilmes microbianos, pois eles atuam como fonte crônica de contaminação por patógenos que podem interferir negativamente na qualidade dos alimentos e por consequência trazer riscos à saúde dos consumidores.

Segundo Ducriquet (2010) como consequência do processamento de carne originam-se vários resíduos que podem ficar depositados nos equipamentos, pisos e outras superfícies, servindo de substrato para microrganismos e consequente formação de biofilme. A limpeza diária após a parada da linha de produção é de suma importância para a remoção dos resíduos sólidos que deveram ser descartados corretamente e procedido as etapas correspondentes de higienização.

Dentre os inúmeros microrganismos potenciais a formarem biofilmes, os classificados como prejudiciais, tanto às indústrias quanto na área da saúde pela sua patogenia, têm se um maior destaque, como é o caso, por exemplo, das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Há estudos que relatam a formação de biofilme de *E. coli* nas mais diversas superfícies, como as de polipropileno e até aderência em dispositivos cirúrgicos. Já o *S. aureus* também forma biofilme facilmente sobre superfícies bióticas e abióticas, se tornando mais resistente a agentes sanificantes nessas condições (MILLEZI, 2012).

A bactéria *Escherichia coli* tem como hospedeiros os humanos e animais e sua colonização se dá no trato gastrointestinal. Praticamente todos os alimentos, tanto de origem animal e vegetal, que não tenham sido submetidos a um processamento adequado podem veicular *E. coli*, especialmente os alimentos crus de origem animal que são frequentemente contaminados, contanto que em algum momento tenham tido contato com conteúdo fecal (ALVES, 2012). Já o *Staphylococcus aureus* tem como habitat a mucosa nasal de humanos, que a partir dela contamina as mãos, e por consequência podem ser repassados aos alimentos pela manipulação. Essa bactéria causa intoxicação alimentar, devido à produção de enterotoxinas, e isso poderá ser agravado pelo fato de serem termoestáveis, ou seja, podem permanecer no alimento mesmo quando este for submetido a processos térmicos (BRESOLIN; STELLA; SILVA, 2005). Dutra (2016) ao avaliar a formação de biofilme de *E. coli* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável, verificou que as bactérias conseguiram se aderir a superfície tanto individualmente quanto multiespécie, em substrato de caldo Mueller Hinton, leite e resíduos de carne, sendo que este último foi mais propício para a formação dos biofilmes a 25°C e 35°C.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, faz parte da microbiota normal do meio ambiente, estando em superfície de plantas, pele do homem e animais, e a sua relevância se deve a característica de patógeno oportunista (MAIA et al., 2009).

Existe um fenômeno conhecido por “*Quorum Sensing*” (QS), pelo qual as bactérias monitoram o ambiente, se comunicando por síntese e detectando a presença de pequenas moléculas específicas, através de um mecanismo de sinalização célula a célula, que depende da densidade populacional. Ele é utilizado por uma diversidade de células bacterianas como uma forma de gerir múltiplos processos relativos ao biofilme, como a densidade populacional e a virulência (GLANSDORP et al., 2004; PECCI et al., 1999). Nesse sistema, as bactérias sintetizam os auto-indutores (Ais), sinalizadores de baixo peso molecular, que são excretados no ambiente, e ao atingir uma determinada quantidade crítica desses compostos, as bactérias irão detectar a presença de um número suficiente ou *quorum* de bactérias, respondendo por intermédio da ativação ou contenção de determinados genes (VIANA, 2006).

A *P. aeruginosa* é provavelmente a bactéria mais entendida em termos de regulação dos fatores de virulência e o papel que o QS (sinais produzidos por homoserinas lactonas – AHLs) desempenha na patogenicidade, pois têm um notável

sistema quanto a esses fatores de patogenia, tanto a nível celular como extracelular (DEEP; CHAUDHARY; GUPTA, 2011).

Wang et al. (2013) em suas pesquisas utilizando a mesma metodologia empregada neste estudo, testaram a ação de moléculas sinalizadoras presentes no sobrenadante livre de células viáveis (SLCV) de *P. aeruginosa* sobre o biofilme de cepas de *Salmonella enterica* e observaram que 30% e 60% do volume do sobrenadante dificultaram a adesão e formação de biofilme de 3 cepas, tanto no substrato caldo soja tripticaseína (TSB) quanto no exsudado de carne, em superfície de poliestireno.

Com base no conteúdo exposto, objetivou-se com a realização deste trabalho avaliar a ação de moléculas sinalizadoras produzidas por *P. aeruginosa* sobre os biofilmes monoespécie e multiespécie compostos por *E. coli* e *S. aureus*, em substrato de carne, através da quantificação direta por absorbância, ao qual ainda não se têm estudos relacionados até o corrente momento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Verificar a ação de moléculas sinalizadoras produzidas por *P. aeruginosa* sobre a formação de biofilme monoespécie e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a formação do biofilme de *E. coli* a 25°C e 35° C com aplicação de 30% e 60% do sobrenadante livre de células viáveis de *P. aeruginosa* após 24 horas, utilizando o exsudado de carne como substrato;
- Avaliar a formação do biofilme de *S. aureus* a 25°C e 35° C com aplicação de 30% e 60% do sobrenadante livre de células viáveis de *P. aeruginosa* após 24 horas, utilizando o exsudado de carne como substrato;
- Avaliar a formação do biofilme multiespécie composto por *E. coli* e *S. aureus* a 25°C e 35° C com aplicação de 30% e 60% do sobrenadante livre de células viáveis de *P. aeruginosa* após 24 horas, utilizando o exsudado de carne como substrato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOFILME

3.1 COMPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, fixadas a um substrato e aderidos a uma superfície sólida, envolvidas em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS), no qual os microrganismos expressam diferentes tipos de fisiologias, metabolismo, fenótipos e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). A EPS é formada, sobretudo por polissacarídeos, pelas próprias células da matriz e também por compostos do ambiente circundante, como detritos, proteínas e matéria inorgânica, além de ácidos nucléicos, glicoproteínas e fosfolipídios, tornando então sua composição bastante variada e complexa (LUCCHESI, 2006).

A matriz ao qual os microrganismos estão embebidos, é uma estrutura com alto nível de hidratação e porosidade onde, entre as microcolônias, são formados pequenos canais. Essa organização apresentada no biofilme é muito vantajosa para as espécies de todos os microrganismos, pois fornece proteção contra agressões externas como colonização por bacteriófagos, desidratação e resistência a antimicrobianos. São inúmeros os aspectos que influenciam no desenvolvimento de biofilmes, sendo os principais: expressão dos fatores de virulência dos microrganismos, como a produção e síntese de adesinas, fimbrias e não-fimbrias, produção da cápsula exopolimérica, e também as características físico-químicas da superfície/material de adesão (FLACH; KARNOP; CORÇÃO, 2005), além do pH, temperatura, velocidade de escoamento do líquido, tipo e concentração de nutrientes do meio líquido circundante e a presença de agentes antimicrobianos (PEREIRA, 2001).

A formação do biofilme se dá quando bactérias livres, denominadas de planctônicas, reconhecem uma superfície e aderem-se a ela firmemente, crescendo e se desenvolvendo. Elas podem sobreviver a ambientes bastante hostis como por

exemplo, dentes e epitélios, e também plástico e aço inoxidável, além de muitas outras superfícies bióticas e abióticas. De forma geral, a formação de um biofilme passa por uma sequência de eventos principais, como está ilustrado esquematicamente na Figura 1. Na primeira fase, moléculas orgânicas de alimentos, como por exemplo, proteínas do leite e da carne, são depositadas sobre as superfícies dos equipamentos, formando um filme condicionante. Na sequência, há a adesão dos colonizadores primários controlada, sobretudo pelas interações iônicas, entre a parede celular do microrganismo e as macromoléculas do filme condicionante, ou seja, as células bacterianas são atraídas e se vão se ligando na superfície contendo substrato, formando pontes entre essas células e a superfície. Já na terceira fase, as células microbianas irão permanecer sobre a superfície, uma vez que resistiram aos processos de limpeza e desinfecção, sendo então possível sua multiplicação e divisão celular no meio que estão aderidas, e sua adesão irreversível. Esta característica irreversível é geralmente controlada por polímeros extracelulares. Então assim está constituído o biofilme propriamente dito, pela produção de EPS, o que faz com que se fortaleçam as interações entre células e superfície. Nas últimas fases, são desenvolvidos os biofilmes maduros através da adesão e multiplicação de novas células, podendo ser de diferentes microrganismos, e da expressão de genes específicos. Depois de alguns dias, ou até meses, acontece o desprendimento de novos colonizadores, que irão formar novos biofilmes, representando assim um ciclo de contaminação (CAPELLETTI, 2006; TELLES, 2011).

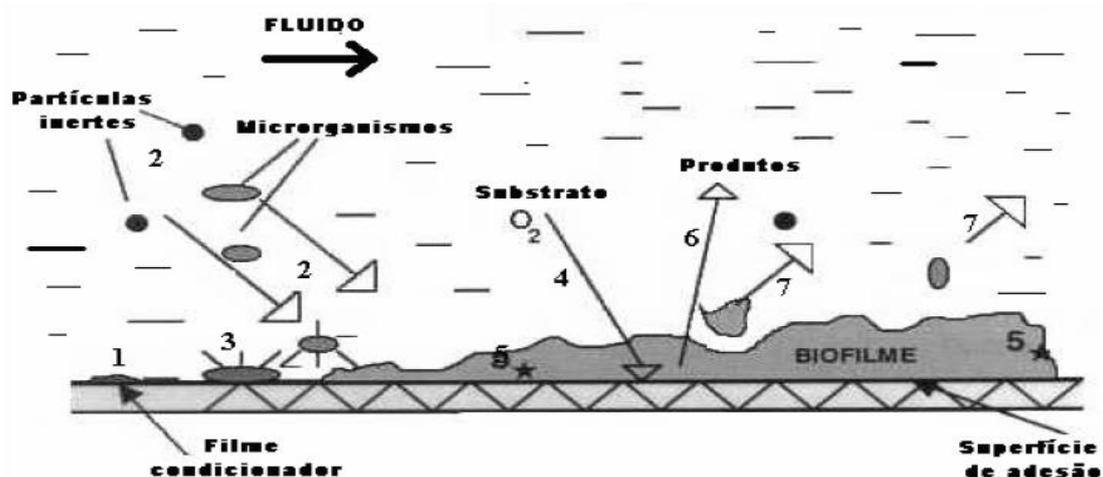


Figura 1 - Etapas de Formação de um biofilme.
Fonte: Pereira (2001).

Os biofilmes podem ser compostos por mono ou multiespécies, onde no último caso, cada uma das espécies participantes produzirá um diferente tipo de polímero, podendo aglomerar-se no biofilme em regiões heterogêneas alocados na matriz homogênea, criando algumas propriedades similares, tais como a constituição da viscosidade e do gel, que as protegem de ambientes extremos e conferem resistência a antibióticos, pois operam como escudo (ALONSO, 2015).

A formação do biofilme se dá por uma variedade de microrganismo, mas as bactérias são predominantes e as mais propícias a formarem biofilmes, devido à sua maior versatilidade e resistência em até ambientes extremos, conferidos por características favoráveis tais como tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante (CHAVES, 2004).

3.2 BIOFILME NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

A presença de biofilmes em indústrias de alimentos se deve, primeiramente, pelo depósito de material orgânico em superfícies de processamento, as quais facilitam o desenvolvimento de comunidades bacterianas. Nos biofilmes que já estão fortemente aderidos, pode ocorrer o destacamento de partes dele, que contaminam alimentos e outras superfícies. Quando os microrganismos se encontram na conformação de biofilme, eles apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos do que em sua conformação planctônica, o que o torna resistente a processos de sanitização, sendo então uma via original de contaminação dos alimentos, podendo ser tanto patogênico quanto deteriorantes, tendo então como consequência propagação de toxinfecções alimentares e perdas econômicas. Em relação aos aspectos microbiológicos, se não houver implantação de sistemas de qualidade e uma aplicação efetiva dos agentes de limpeza e sanitizantes, os microrganismos aderidos às superfícies que entram em contato com alimento e instalações, podem não ser completamente removidos, causando um acúmulo dos próprios microrganismos e resíduos, aos quais favoreceram o desenvolvimento de biofilmes (OLIVEIRA; BRUGNERE; PICCOLI, 2010).

Para o controle de microrganismos, é obrigatório à implantação de programas relacionados a higienização, que é a ação combinatória de limpeza e sanitização. Um meio bastante empregado para tal é a sanitização química, pois permite a redução do nível de microrganismos na superfície aplicada para que não venham contaminar o ambiente e alimento a níveis intoleráveis. São diversos os sanitizantes utilizados, dentre os quais se destacam os compostos à base de cloro, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e quaternário de amônio. A higienização tem seu início já na escolha do local de instalação da fábrica e na elaboração do projeto, seguindo com a instalação de equipamentos, condições da água utilizada e eliminação dos resíduos gerados. A atenção deve ser dada para a limpeza dos equipamentos utilizados, superfície de contatos diretos e indiretos com os alimentos para se evitar a proliferação de microrganismos, contaminação por produtos estranhos ao processo ou resíduos de processos anteriores. A higiene têm que ser exercida em todos os setores e com colaboração de todos os manipuladores a fim de se obter condições ideais e um resultado final satisfatório (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Na formação de biofilme bacteriano, vários tipos de superfícies que são encontradas em indústrias alimentícias, são passíveis para adesão. O aço inoxidável é largamente utilizado em utensílios e equipamentos em indústrias processadoras de alimentos, pela sua superfície lisa com pouca porosidade, elevada resistência à corrosão e vida útil prolongada. Portanto é frequente a atribuição de contaminação microbiana às superfícies de aço inoxidável (OLIVEIRA, 2009).

3.3 BIOFILME NA INDÚSTRIA DE CARNES

Em se tratando de indústrias que abatem animais para obtenção de carne e derivados, se constata uma preocupação ainda mais acentuada com o controle microbiológico. O próprio animal em si possui uma população microbiana natural em seu trato gastrointestinal e nos órgãos, e a maior parte deles são portadores sadios de patógenos. Como normalmente esses microrganismos não são erradicados nos criadouros, os animais já estão contaminados ao chegar ao abate, sendo que a falta de limpeza das instalações na área de recepção influencia significativamente no

aumento da carga microbiana da carne após o abate e durante o processamento. Sangria e evisceração, se não realizadas corretamente poderão disseminar microrganismos e contaminar vários tecidos do animal, sendo uma evisceração incorreta capaz de espalhar material fecal na superfície do animal e agregar potenciais microrganismos patogênicos a carne durante o processamento. Outra etapa de grande risco microbiano é a lavagem da carcaça, que se for incorreta pode ocasionar deposição de materiais estranhos e aumento de microrganismo no produto. Etapas posteriores incorretas, como refrigeração, armazenamento, embalagem, transporte e distribuição podem ainda recontaminar o produto depois de processado (FUNG et al., 2001).

Durante o processamento os níveis de contaminação podem ser controlados, mas não completamente eliminados, através de medidas higiênicas que visam eliminar as fontes de contaminação. Para se evitar uma contaminação elevada, que pode comprometer a integridade do produto e por consequência a saúde do consumidor, a prática de higienização deve ser constante e contínua. Algumas medidas corretivas devem ser tomadas, tais como a incorporação de cloro na água dos chiller, o resfriamento correto das carcaças, a higienização de facas e utensílios utilizados, uma boa limpeza do ambiente da área de abate e manipuladores instruídos. Salas de cortes de carne crua também devem ser cuidadas, pois devido à grande manipulação, podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos (KRASZCZUJ, 2010).

3.4 SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL E ADESÃO BACTERIANA

O principal tipo de material utilizado em superfícies de indústrias alimentícias é o aço inoxidável AISI (*American Iron and Steel Institute*) 304, podendo sua superfície tornar-se lisa, através de tratamentos específicos, diminuindo o risco da adesão de microrganismos e posterior formação de biofilme (HAUN, 2004). Existe um fenômeno chamado de Passivação que faz com que o cromo se combine com o oxigênio, pela sua alta afinidade, e isto forma uma camada fina de óxido de cromo (com espessura aproximada de 40 Angstrom), que é a responsável pela

hidrofobicidade da superfície de aço e da sua resistência a corrosão (JÚNIOR, 2011).

Então nesse contexto, quando se trata de adesão inicial bacteriana, quanto mais hidrofóbica for sua célula, maior será a capacidade de aderência a esta superfície. O nível de hidrofobicidade da célula é atribuído pelos fatores de virulência relacionados á adesão, tal como flagelos, pili e fímbrias, e a membrana externa, em Gram-negativos, como também pelos seus diferentes estados de eletronegatividade, controlado por grupos funcionais polares, tais como hidroxilas, fosfatos, carboxilas e ácido teicóico. Logo, devido a estruturas mais peculiares, as bactérias Gram-negativas, em comparação ás Gram-positivas, possuiriam uma vantagem competitiva na adesão inicial, colonização e formação do biofilme, sobre as Gram-positivas (BOARI et al., 2009).

De forma geral, a formação do biofilme é influenciada pela hidrofobicidade da célula e pelos aspectos da superfície de adesão, sendo elas a composição, rugosidade e porosidade (PEREIRA et al., 2000).

3.5 *ESCHERICHIA COLI*

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo catalase-positivo e fermentador de glicose, sendo um mesófilo típico que tem sua temperatura ótima a 37 °C (GERMANO, P.; GERMANO, M., 2001). Seu habitat é o trato intestinal do homem e de outros animais, porém consegue resistir a longos períodos e se desenvolver também em ambientes não fecais. Sua contagem é um indicador de condições higiênico-sanitárias precárias, ainda mais pelo fato de que uma elevada contagem de *E. coli*, pode indicar a existência de outros patógenos internos, sendo sua presença prejudicial aos alimentos (RODRIGUES, 2009).

Molina (2009) diz que entre os principais microrganismos que estão presentes no ar atmosférico de matadouros e frigoríficos, destacam-se os grupos de micrococos, bacilos, estafilococos e de coliformes. Portanto, ele reforça que de forma geral, a *E. coli* é predominante no ambiente atmosférico de currais e sala de abate, mas em câmeras de resfriamento sua contagem é mais baixa. A

contaminação em indústrias frigoríficas por *E. coli* é relacionada a contaminação cruzada, uso de utensílios precariamente higienizados/sanitizados, e também a uma má higienização das mãos dos manipuladores após o uso de sanitário (STOCCO et al., 2017). Dourou et al. (2011a), ao avaliar a formação de biofilme por *E. coli* O157:H7 em polietileno de alta densidade e aço inoxidável, tendo como substrato sujidades comumente encontradas na fabricação de carne bovina, observou que em ambas as superfícies houveram a formação de biofilme, porém constatou um maior grau aderência e fixação na superfície de aço.

Várias linhagens de *E. coli*, sendo patogênica ou comensais, têm a capacidade de colonizar diversas superfícies por sua expressão de estruturas de adesão, como o flagelo, e polissacarídeos extracelulares, dando origem ao biofilme bacteriano (TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009). Proteínas da membrana externa e os tipos de pili são necessários para uma interação estável entre esse microrganismo e a superfície (MATTILA, 2002).

3.6 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus é uma bactéria da família Staphylococcaceae, caracterizada como cocos Gram-positivos e catalase-positiva (SANCHES, 2008), sendo imóvel e apresentando-se como germe mesófilo, aeróbio e anaeróbio facultativo, tendo sua temperatura ótima de crescimento na faixa de 30 a 37°C (NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

Em locais de processamento de carne, a bactéria *S. aureus* pode ser frequentemente identificada sobre as superfícies de manipulação e equipamentos, fator esse que se atribui principalmente a uma ineficiente higiene e sanitização, podendo causar contaminação cruzada. As mãos contaminadas dos manipuladores, por insuficientes práticas de higiene, também é um grande veiculador desse agente patogênico em abatedouros e frigoríficos (PEREIRA; WALUS; VITORIA, 2015). Lues e Tonder (2007) ao pesquisarem a incidência de *S. aureus* em manipuladores de alimentos, constataram que 88% das amostras das mãos e 48% dos aventais continham essa bactéria.

Essa bactéria é um patógeno oportunista que se destaca como microrganismo de risco na área médica e alimentícia. Em indústria de alimentos, ele está envolvido em casos e surtos de intoxicação alimentar, devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas. O *S. aureus* possui a capacidade de aderência em diversos tipos de superfícies, e com isso traz sérios problemas de contaminação aos alimentos (SHALE et al., 2005; RODE; LANGSRUD; MORETRO, 2007; DI CICCIO et al., 2015). Sua capacidade de aderir e formar biofilmes aumenta significativamente a persistência do patógeno em instalações de indústrias processadoras de alimentos, o que lhe confere uma vantagem fisiológica como agente etiológico de enfermidades causadas pelo consumo de alimentos (HERRERA et al., 2007).

Segundo Andre (2015) nos biofilmes de *S. aureus*, as interações que ocorrem entre as superfícies hidrofílicas abióticas e as suas células são regidas por PIA (adesina intracelular polissacarídica), e com o aumento da densidade populacional a bactéria como resposta, tem a capacidade de reconhecer essa molécula sinalizadora (PIA), que está incluída na estrutura de mecanismo do *Quorum sensing*. A sua fixação em superfícies também é atribuída por exopolissacarídeos e eDNA (DNA extracelular), que consegue reconhecer moléculas adesivas da matriz e mediar a aderência de células as superfícies bióticas e abióticas.

Meira (2011) em seu estudo com *S. aureus* isolado de serviços de alimentação e Nutrição da cidade de João Pessoa - PB, utilizando, dentre outros, um substrato a base se carne em polipropileno e aço inoxidável AISI 304, observou que a bactéria teve uma ótima capacidade de formar biofilme independente do tipo de superfície e temperatura de incubação.

3.7 PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS SINALIZADORAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O grupo da *Pseudomonas aeruginosa*, pertencente à família *Pseudomonaceae*, e é um bacilo Gram-negativo, aeróbio estrito, não fermentador de glicose, apresentando motilidade por meio de um ou mais flagelos polares (MOTA,

2015). É encontrada geralmente no solo e em águas frescas, mas pode colonizar plantas também, por exemplo, pois está compatível para colonizar diversos ambientes naturais. Sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C, o que permite a essa bactéria ser bastante distribuída no ambiente. A *P. aeruginosa* é uma espécie que se destaca como um patógeno oportunista de indivíduos com sistema imunológico debilitado (GAVINHO, 2011).

A *P. aeruginosa* possui dois sistemas principais de *Quorum Sensing* (QS), derivadas de homo serinas lactonas aciladas (AHLs), o las (que controla a virulência, e também regula a expressão do sistema rhl), e o rhl (envolvido na formação de metabólitos secundários). Eles são hierárquicos e atuam de forma sequencial que impulsionam a produção (através das sínteses *LasI* e *RhlI*) e a percepção (pelos fatores de transcrições LasR e RhlR) das moléculas sinalizadoras do auto-indutor N-(3-oxo-dodecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) e N-butanoil-L-homoserina lactona (C4-HSL), respectivamente. Um terceiro sistema de QS, baseado em sinais de quinolone (sistema PQS), interage com o sistema da AHLs de uma forma intrincada (MATTILA, 2001; RASAMIRAVAKA et al., 2015).

Além do auto-indutor, o sistema de moléculas sinalizadoras possui uma proteína dependente deste auto-indutor, chamada de "proteína R". Em uma baixa densidade celular, a bactéria produz um nível menor de auto-indutor, que com o aumento da concentração celular, a sinalização QS amplifica. Ao chegar a um determinado nível de sinalização, o auto-indutor produzido, liga-se e ativa a "proteína R", que irá induzir ou deixar de reprimir genes-alvos específicos. Dessa forma, essas moléculas sinalizadoras regulam a formação de biofilme, sincronizando comportamentos particulares das bactérias em escala populacional. Elas ativam uma população bacteriana para controlar a expressão de genes específicos em resposta à densidade celular pela regulação metabólica, que consegue coordenar a quantidade total de exopolissacarídeos produzidos. Através das moléculas sinalizadoras, a *P. aeruginosa* detecta o acúmulo de limiares mínimos de estimulação dos auto indutores, controlando também a expressão dos genes de virulência (LEE; ZANG, 2015, OLIVEIRA, 2010; PESCI et al., 1999). Na Figura 2 abaixo é possível observar esquematicamente o sistema de sinalização simplificado da *P. aeruginosa*.

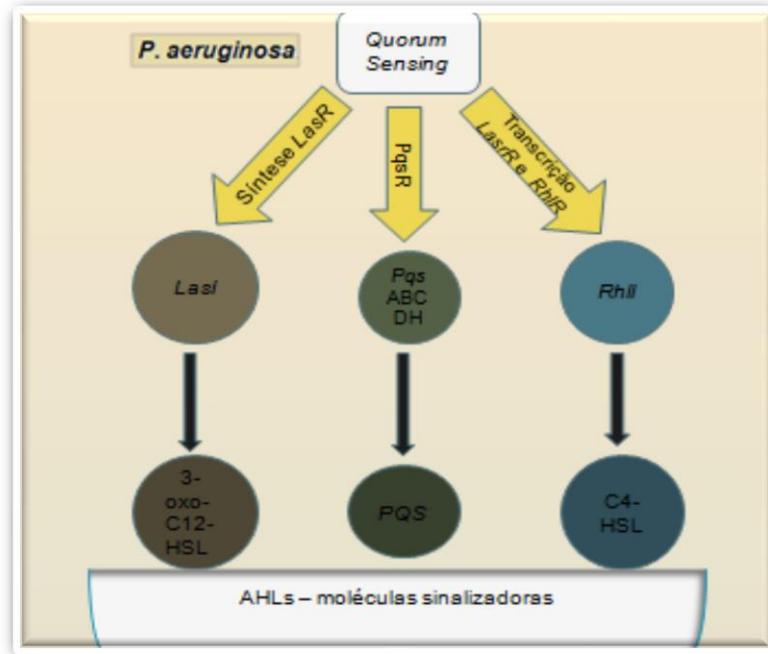


Figura 2 - Representação esquemática das redes de sinalização QS em *P. aeruginosa* e seus respectivos reguladores.

Fonte: Elaborada pelo autor (2017).

As moléculas sinalizadoras possuem uma significativa importância com relação à organização e distribuição das atividades entre os indivíduos participantes do biofilme, e isso é relativo ao fato desse sistema não depositar EPS (a promover o desenvolvimento do biofilme) em comparação a microrganismos selvagens, fazendo com que a estrutura seja bastante irregular e frágil (BOARI, 2008).

Sauer et al. (2002) em sua pesquisa de caracterização dos fatores envolvidos nos processos de transição no desenvolvimento de biofilme de *P. aeruginosa*, indicaram que essa bactéria é capaz de apresentar múltiplos fenótipos com diferentes características fisiológicas (envolvidas em alterações estruturais e metabólicas) que podem estar correlacionados aos fatores de desenvolvimento do biofilme. Também demonstraram que os valores padrões dos perfis de proteína em células participantes em biofilme maduro de *P. aeruginosa* são 60% superiores em comparação com as encontradas em células planctônicas, crescidas em quimiostato. Porém a semelhança entre elas é de cerca 50%. Essas proteínas identificadas nas análises fazem parte de processos metabólicos, reações de

biossíntese de lipídeos, transporte de moléculas e também estão envolvidas no sistema de adaptação e proteção.

Em *P. aeruginosa*, a espessura do biofilme maduro é reduzida pela transcrição do fator *RpoS*, que direciona a entrada na fase estacionária em muitas espécies de bactérias Gram-negativas. Mutantes incapazes de expressar *RpoS* formam biofilmes mais espessos em condições de fluxo de nutrientes. A produção de *RpoS* é regulada em níveis, incluindo a transcrição e a tradução em resposta a diferentes condições de estresse, como a limitação de nutrientes. Assim, a inativação de *RpoS* de *P. aeruginosa* poderia ser um sinal de que os nutrientes encontram-se em condições limitantes em biofilmes (WHITELEY et al., 2001; HEYDORN et al., 2002; VENTURI, 2003).

Alguns estudos sobre os efeitos da sinalização de *P. aeruginosa* sobre o biofilme de bactérias já vêm sendo realizados, como Dourou et al. (2011b) que ao pesquisar a ação das moléculas sinalizadoras de *Yersinia enterocolítica*, *Serratia proteamaculans* e *P. aeruginosa*, presentes no SLCV, sobre o crescimento de quatro cepas diferentes de *Salmonella*, concluíram pelos seus resultados que o seu crescimento pode ser influenciado por essas moléculas de sinalização do QS e/ou outros sinais desconhecidos ainda, existentes no sobrenadante podendo ser produzidos por outras bactérias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

As linhagens das espécies utilizadas no estudo foram obtidas a partir das cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), disponíveis no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Campo Mourão, sendo elas a *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

O meio de cultivo para todas as bactérias foi o caldo Mueller Hinton (MH) (Biomark Laboratories).

A superfície de aço inoxidável utilizada para a formação do biofilme foi a AISI 304 de dimensões 1,0x1,0x0,1cm³.

O exsudado de carne bovino utilizado como substrato foi obtido através do descongelamento de 2 Kg de carne (patinho), que na sequência foi cortada em pedaços de 5x5 cm, e colocados em dois recipientes de aço inoxidável cobertos com folha de alumínio e congelados a -20°C. Decorrido o período de 48 horas, a temperatura foi aumentada a 10 ° C para descongelar a carne, o que produziu em torno de 800 mL de exsudado. Na sequência, o exsudado foi diluído com água estéril na proporção 1:3 e centrifugado a 40 000 g por 15 minutos, e o sobrenadante filtrado através de um pré-filtro com poro do tamanho de 1 µm e um filtro de 0, 22 µm (MIDELET; CARPENTIER, 2002).

4.2 ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Eppendorfs, cupons de aço inoxidável, pinça e ponteiros foram esterilizados em autoclave (Prismatec Autoclave Vertical CS) a 121°C por 15 minutos e armazenados em local adequado até a utilização dos mesmos.

4.3 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO E SALINA

O caldo MH para o crescimento de *E. coli*, *S.aureus* e *P. aeruginosa* foi preparado de acordo com o fabricante:

MH caldo: Dissolve-se 21 gramas em 1 litro de água destilada.

A solução salina utilizada foi preparada na concentração de 0,85% de cloreto de sódio.

Todas estas soluções foram submetidas à esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, e após armazenadas sob refrigeração até o momento do uso.

4.4 ADERÊNCIA E CRESCIMENTO DO BIOFILME MONOESPÉCIE E MULTIESPÉCIE

As bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram ativadas em tubos contendo 3 mL de caldo MH 24 horas antes do ensaio, com incubação em estufa bacteriológica (TE-392/2 – Tecnal) a 35°C por 24 h. Após, o caldo contendo as bactérias foi diluído em solução salina 0,85%, na quantidade necessária para a equivalência com a escala 0,5 de Mac Farland, conforme metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

A superfície de aço inoxidável estéril foi inserida no interior dos eppendorfs, em seguida adicionado 1 mL do substrato (caldo MH ou exsudado de carne) e 25 microlitros dos inóculos obtidos, de forma individual e em conjunto, sendo em triplicata para cada bactéria.

Após a adição dos inóculos, os eppendorfs foram incubados em estufa bacteriológica a 25°C e 35°C por 24 horas para promover a formação do biofilme. Foi incubado também o substrato desprovido de inóculo bacteriano como controle negativo.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

Decorrido o período de incubação, todo o conteúdo líquido dos eppendorfs foram retirados, e os cupons de aço foram enxaguados com solução salina 0,85% durante 1 minuto para desprendimento das células fracamente aderidas, secas ao ar em fluxo laminar durante 45 minutos, e corados com cristal violeta 0,25% por 30 minutos. Em seguida enxaguadas novamente com a solução salina 0,85% por 1 minuto, deixadas secar ao ar por mais 45 minutos e adicionado etanol 95%, para o descoramento, por 30 minutos. Posteriormente, o biofilme era desprendido através da adição de pérolas de vidro e agitação no aparelho vortex (mod. 772 – FI SATOM) por 2 minutos e alíquotas de 1 mL do caldo de cada eppendorf foi repassado para uma cubeta de vidro, e medido sua absorbância no espectrofotômetro (USB-650UV Red Tide) com leitura em 570 nm (WANG et al., 2013).

4.6 PREPARO DO SOBRENADANTE DE *P. AERUGINOSA*

Cepas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em 3 mL de caldo MH e incubadas em estufa bacteriológicas á 28°C por 48 horas. Após o tempo decorrido, o cultivo foi passado para eppendorfs e então centrifugado (Centrífuga MiniSpin® plus) a 14 000 rpm durante 15 minutos e na sequência pipetado apenas a parte líquida (sobrenadante) de forma cuidadosa para não encostar nos pellets (células) que decantaram, e esse conteúdo então foi repassado a tubos estéreis.

Depois, o sobrenadante obtido foi aquecido a 100°C por 5 minutos em banho-maria garantindo dessa forma, a ausência de células viáveis de *P. aeruginosa*, e armazenado sob refrigeração até o momento do uso.

4.7. APLICAÇÃO DO SOBRENADANTE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

O SLCV de *P. aeruginosa* foi adicionado no eppendorf contendo o cupom de aço inoxidável e o substrato (caldo de cultivo MH ou o exsudado de carne) e o

inóculo de bactérias, sendo que o sobrenadante substituiu 30% e 60% do volume final de substrato. Então foi incubado em estufa bacteriológica a 25°C e 35°C por 24 horas, e o biofilme formado foi quantificado por absorvância, conforme já descrito anteriormente, para verificar a ação do sobrenadante sobre a formação dos biofilmes monoespécie e multiespécie. Foi aferido o resultado da absorvância do etanol 95% e o mesmo utilizado como valor de referência (branco).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados usando o pacote de software Assistat 7.6 Beta. A absorvância foi comparada usando o teste de Tukey com $p < 0,05$ para determinar as diferenças significativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média dos resultados obtidos sobre a absorvância dos biofilmes mono-espécies e multiespécies de *E. coli* e *S. aureus* formados com substituição de 30% e 60% de SLCV de *P. aeruginosa*, em diferentes substratos e temperaturas, estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeito da adição do sobrenadante livre de células de *P. aeruginosa* na formação de biofilme mono e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus*.

Cepa	SLCV (%)	Absorvância (570 nm)			
		35°C		25°C	
		MH	Exsudado de carne	MH	Exsudado de carne
<i>E. coli</i>	0	0,621 ^{bb} ±0,044	1,315 ^{ba} ±0,029	0,923 ^{aa} ±0,138	1,420 ^{ba} ±0,133
	30	0,300 ^{ac} ±0,033	0,604 ^{ac} ±0,036	0,651 ^{abB} ±0,029	0,549 ^{ab} ±0,013
	60	0,947 ^{abA} ±0,068	0,911 ^{ab} ±0,035	0,816 ^{aa} ±0,008	0,630 ^{ab} ±0,121
<i>S. aureus</i>	0	0,714 ^{ab} ±0,042	1,421 ^{ba} ±0,048	0,739 ^{ba} ±0,044	1,742 ^{aa} ±0,039
	30	0,198 ^{bc} ±0,016	0,313 ^{bc} ±0,076	0,527 ^{bb} ±0,003	0,590 ^{ab} ±0,069
	60	0,896 ^{ba} ±0,016	0,635 ^{bb} ±0,077	0,678 ^{aa} ±0,037	0,658 ^{ab} ±0,050
<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	0	0,774 ^{ab} ±0,051	1,648 ^{aa} ±0,014	0,816 ^{abA} ±0,008	1,835 ^{aa} ±0,007
	30	0,225 ^{abc} ±0,006	0,336 ^{bc} ±0,069	0,757 ^{aa} ±0,113	0,600 ^{ab} ±0,024
	60	0,983 ^{aa} ±0,038	0,666 ^{bb} ±0,002	0,727 ^{aa} ±0,097	0,624 ^{ab} ±0,089

* SLCV = Sobrenadante livre de células viáveis

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que o mesmo tratamento com SLCV diferiu entre as três cepas e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que os diferentes tratamentos com SLC diferiram na mesma cepa (p<0,05)

A quantificação do biofilme por meio da coloração com cristal violeta medida por absorvância revelou que as cepas testadas em mono e multiespécie foram capazes de formar biofilme sob a superfície de aço nas condições impostas (tanto nas temperaturas de 25°C e 35°C quanto com o substrato de caldo MH e exsudado de carne). Através dos resultados expressos na Tabela 1 e ilustrados nos gráficos abaixo (Figura 3 e 4), é possível observar que o substrato de carne foi o mais propício para a formação de biofilme mono e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus* em ambas temperaturas testadas, em relação ao caldo MH. Semelhantes resultados foram verificados por Dutra (2016), que ao analisar a formação de biofilme mono e

multiespécie composto por *E. coli* e *S. aureus* a 25°C e 35°C em superfície de aço inoxidável, usando como substrato caldo MH, leite e exsudado de carne, constatou que o *S. aureus* se desenvolveu melhor nos substratos protéicos de carne e leite. Já a *E. coli* e o biofilme multiespécie tiveram uma maior adaptação quando incubadas com o extrato de carne em comparação com os outros substratos testados, tendo uma contagem mais elevada nas primeiras 24 horas e sendo a temperatura de 35°C mais propícia para a adesão e desenvolvimento do biofilme. Isto pode ser justificado pela composição mais nutritiva dos substratos protéicos em comparação com o caldo MH, fazendo com que os microrganismos consumam mais nutrientes, favorecendo então uma maior formação de biofilme.

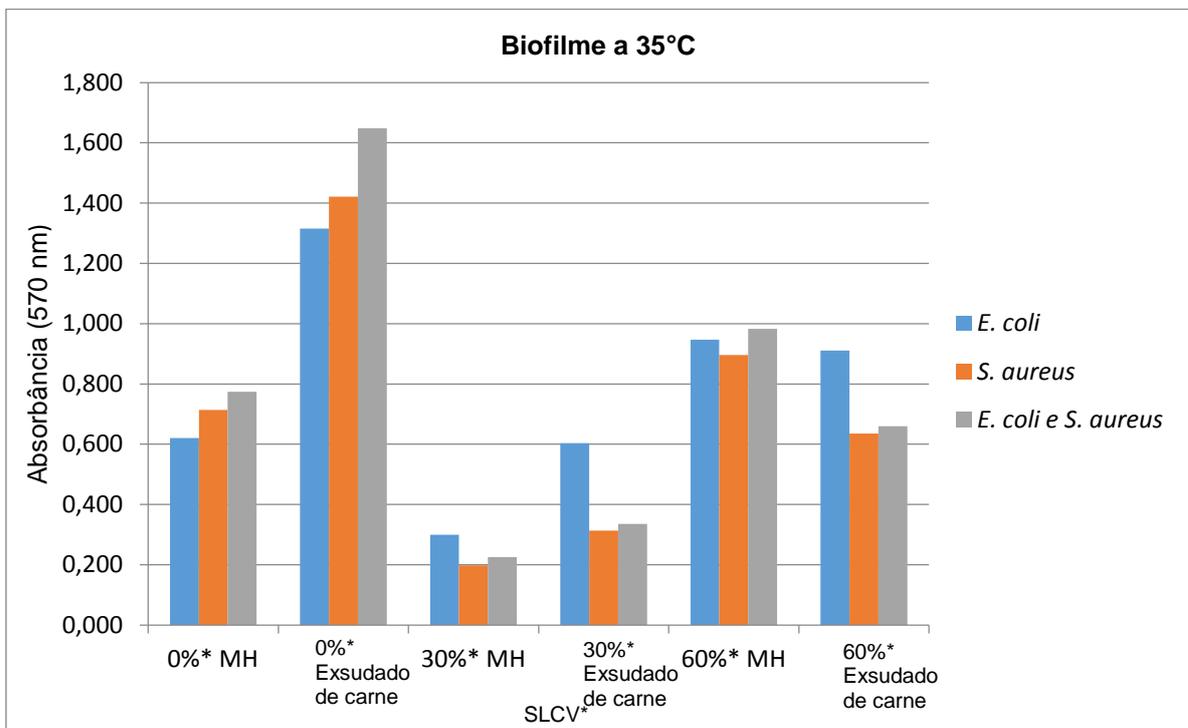


Figura 3. Quantificação do biofilme mono-espécie e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus* adicionado de SLCV de *P. aeruginosa* em diferentes substratos a 35°C.

Os resultados expressos na Tabela 1 e ilustrados na Figura 3 acima demonstram que os valores médios das absorbâncias para o tratamento de 30% e 60% de SLCV de *P. aeruginosa* diferiram para os três biofilmes das cepas a 35°C no caldo MH, sendo a redução da densidade de *S. aureus* mais expressiva, pelo tratamento de 30% ($p < 0,05$). Já no exsudado de carne a adição de 30% e 60% do

volume de SLCV não apresentou diferença entre as cepas de *S. aureus* e o multiespécie, apresentando a melhor eficiência na redução da densidade biofilme, com uma menor média em comparação com os mesmos volumes de SLVC na *E. coli* ($p < 0,05$). Quando comparadas as médias dos tratamentos na mesma cepa, é possível verificar que nos dois substratos utilizados, a adição de 30% e 60% SLCV de *P. aeruginosa* foi estatisticamente diferente do seu controle, onde ambos apresentaram influência sobre o biofilme, porém no caldo MH apenas o tratamento de 30% reduziu a densidade do biofilme formado, pois a aplicação de 60% de SLCV favoreceu a densidade dos biofilmes ($p < 0,05$). Com base nesses resultados, foi possível verificar que o SLCV possui influência na redução da densidade dos biofilmes mono e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus*, sendo a aplicação de 30% mais expressivo na inibição dos biofilmes formados.

Já foram estudadas algumas bactérias do gênero da *Pseudomonas* e constatado que suas espécies possuem o sistema de QS e que este pode interferir de alguma forma em determinadas bactérias que fazem associação com *Pseudomonas*.

Viana (2006) ao pesquisar a presença de moléculas sinalizadoras provenientes de bactérias psicotróficas isoladas do leite, através do ensaio de difusão em meio de cultura, observou a geração de moléculas sinalizadoras de QS pela diminuição da produção de violaceína pela estirpe monitora *Chromobacterium violaceum* e pelo estímulo da produção de β -gal por *Agrobacterium tumefaciens* na presença de extratos e células sésseis de *P. fluorescens* 097. Este resultado obtido por eles sugerem que as estirpes de *P. fluorescens* avaliadas são capazes de produzir a molécula sinalizadora AHL ou outras semelhantes relacionadas ao processo de sinalização bacteriana, capazes de ativarem os sistemas de monitoração de *C. violaceum* e *A. tumefaciens* em ensaio de inibição.

Chorianopoulos et al. (2010), adicionou o SLCV de *Hafnia alvei* nas concentrações de 20% e 50% no biofilme de *Salmonella enterica* em caldo BHI, e pode verificar que a incubação de cupons de aço no maior volume de sobrenadante (50%) resultou na redução significativa das atividades metabólicas das células planctônicas de *S. enterica* após as primeiras 24 h de incubação em comparação com a cepa no tratamento de 20% e controle, resultado este que contrapõe o obtido no presente estudo, onde a menor concentração (30%) de SLCV de *P. aeruginosa*, foi mais eficiente do que a concentração de 60%, com exceção do biofilme de *S.*

aureus e o multiespécie em substrato de carne a 25°C, onde a eficiência foi estatisticamente igual nos diferentes volumes testados de SLCV. Ainda no trabalho de Chorianopoulos, com seus resultados obtidos, pode-se sugerir que o potencial de formação de biofilme de *S. enterica* poderia ser regulado de alguma forma por moléculas sinalizadoras produzidas pela *H. alvei* presentes no seu sobrenadante. Ele também observou esse efeito inibitório de compostos presentes no sobrenadante (principalmente AHLs) foi mantido mesmo após o aquecimento a 100°C por 10 minutos, semelhante ao procedimento adotado neste trabalho, o que demonstra nitidamente que o fator dessa inibição não é de origem enzimática.

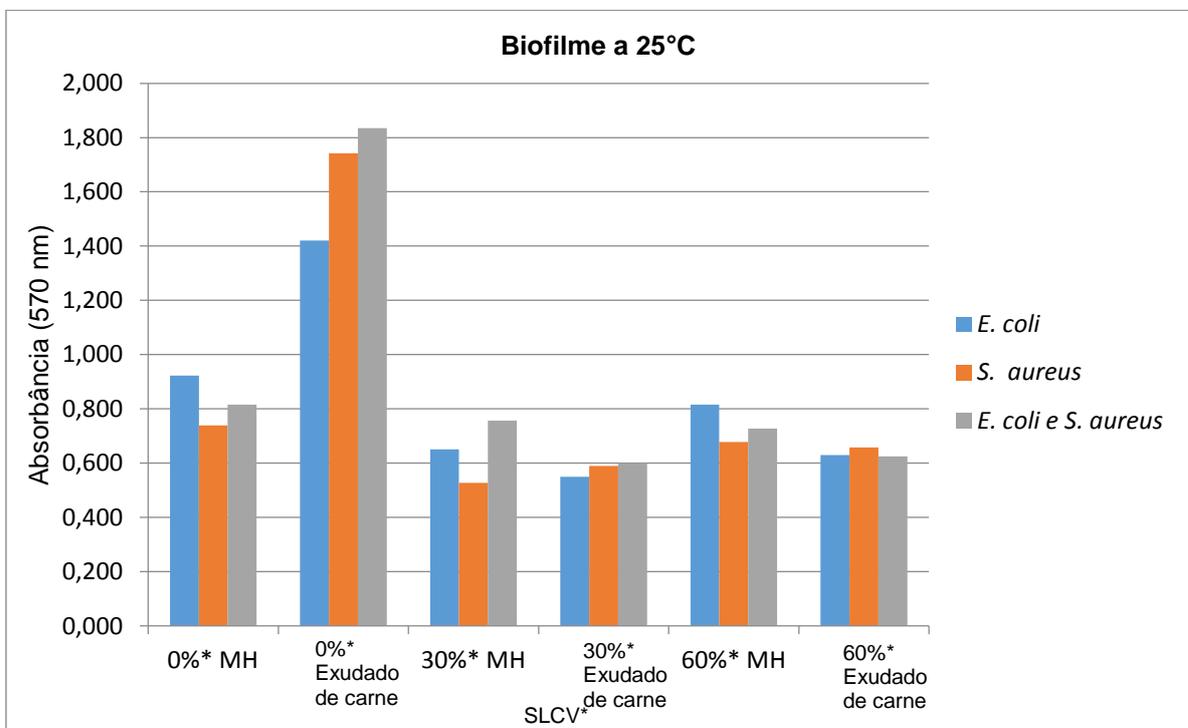


Figura 4. Quantificação do biofilme mono-espécie e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus* adicionado de SLCV de *P. aeruginosa* em diferentes substratos a 25°C.

Através da Figura 4 observou-se que a 25°C no caldo MH a absorbância média da adição de 60% de SLCV de *P. aeruginosa* não foi diferente entre os três biofilmes avaliados, porém o tratamento com 30% de SLCV nas cepas diferiram entre si significativamente, sendo sua melhor eficiência na redução do biofilme de *S. aureus*, coincidindo com o resultado de inibição na mesma cepa a 35°C. Já no substrato de carne, a influência dos tratamentos de 30% e 60% de SLCV entre as

cepas avaliadas foram significativamente semelhantes. Nos biofilmes de *E. coli* e *S. aureus* com o substrato MH, a adição de 60% de SLCV de *P. aeruginosa* não diferenciou significativamente do controle, mas a substituição por 30% do volume foi eficaz na redução dos biofilmes monoespécie ($p < 0,05$).

Honda et al. (2011) ao estudar a ação de moléculas sinalizadoras da *P. aeruginosa* sobre algumas bactérias, pode constatar que o ácido tetramico, produzido de forma espontânea a partir da degradação da AHL e encontrado no sobrenadante de cultura de *P. aeruginosa*, manifestou ação bactericida contra todas as bactérias Gram-positivas testadas nos experimentos, como o *Bacillus cereus* e o *S. aureus*, pela desestabilização das suas membranas, podendo possivelmente justificar o nosso resultado obtido de que o SLCV de *P. aeruginosa* teve uma maior influência na redução da densidade no biofilme de *S. aureus* em comparação com as demais biofilmes formados. Com sua pesquisa, eles conseguiram concluir que o ácido tetramico de *P. aeruginosa* apresenta não apenas efeitos antimicrobianos sobre algumas bactérias Gram-positivas, mas também uma ação de auto-morte celular em bactérias Gram-negativas. A razão para este tipo de morte celular através do ácido tetramico advindo da *P. aeruginosa* ainda não é bem esclarecido, porém um possível fator seria que esse ácido funciona como um mecanismo de resposta negativa a determinadas condições estressantes, ativando uma via celular de morte programada nas bactérias para diminuir a densidade populacional. Com esses resultados, é sugerido que o produto da degradação de AHLs pode ser útil no controle bacteriano.

Kimura et al. (2009) ao testar o efeito de QS de *P. aeruginosa* sobre o crescimento e a produção de biofilmes em espécies de *Legionella* e de outras bactérias que geralmente coexistem com *P. aeruginosa* na natureza, através da incubação em placa de 96 poços, coradas com cristal violeta 0,3% e quantificação a 595 nm, verificaram que a AHL, mas não seus análogos, conseguiu suprimir completamente o crescimento de *L. pneumophila* com a concentração de 50 μM , e uma supressão significativa na formação de biofilme quando exposta a AHL, sugerindo que o efeito do auto-indutor AHL de *Pseudomonas* sobre a *L. pneumophila* isolada é tanto no sentido bacteriostático quanto de exclusão dos fatores de virulência. Mas quando testado sobre o crescimento das bactérias *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis* e

Stenotrophomonas maltophilia, a *P. aeruginosa* não demonstrou nenhum efeito supressor nas condições testadas.

Grandi (2015) testou a influência do SLC de *E. coli* sobre a formação do biofilme de *Listeria monocytogenes*. Para tal, inoculou a *L. monocytogenes* com o sobrenadante parcialmente esterilizado de *E. coli* (meio pré-condicionado) em lâminas de aço inoxidável AISI 304, a 25°C por 12 e 24 horas, utilizando caldo BHI como controle, e posteriormente tratou a cultura com cristal violeta e quantificou o biofilme por absorbância a 595 nm. Ela observou que os valores obtidos nas lâminas nos dois tempos de incubação, independente da concentração de *L. monocytogenes*, indicaram que houve uma maior adesão de células de *L. monocytogenes* e subsequente formação de biofilme nas lâminas imersas no caldo controle, quando comparadas com as lâminas imersas em meio pré-condicionado com o sobrenadante de *E. coli*. Com esses resultados, concluiu-se que, de alguma forma, as moléculas sinalizadoras de *E. coli* influenciam nas primeiras etapas de formação do biofilme, pois elas sinalizariam as células de *L. monocytogenes* que não era o momento favorável para a adesão e multiplicação, interferindo então no posterior desenvolvimento do biofilme.

Com relação aos nossos resultados, ainda a 25°C, apenas o tratamento de 30% de sobrenadante reduziu a formação dos biofilmes monoespécies, mas no multiespécie não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos com SLCV de *P. aeruginosa* em cada cepa, ou seja, a adição de SLCV não teve influência nos biofilmes avaliados no caldo MH ($p < 0,05$). Já no substrato de carne, os tratamentos de 30% e 60% de SLCV sobre a redução da densidade dos biofilmes foram semelhantes, e ambos foram significativamente menores que o valor da absorbância do biofilme controle em cada cepa, ou seja, reduziram a densidade dos biofilmes formados ($p < 0,05$).

Vários fatores químicos, físicos e biológicos podem influenciar o sistema de QS em biofilmes, e dentre eles se destaca o meio nutricional, no qual, por exemplo, se houver a disponibilidade de ferro no ambiente, terá o poder de modular a sinalização em *P. aeruginosa*, ao mesmo tempo em que outros compostos podem tardar o início da sinalização célula a célula, ou seja, esse ambiente hidrodinâmico influencia na espessura e densidade do biofilme que, por consequência, afeta as variações de sinais (KIRISITS et al., 2007), assim como a algum fator químico, que também pode afetar a detecção de QS, barrando a difusão

do sinal de AHL, e conseqüentemente diminuindo o começo da detecção de moléculas sinalizadoras (SHROUT et al., 2011). Com base no exposto, supõe-se pelos resultados obtidos neste trabalho, que além das características das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, a temperatura e o substrato podem ter interferido na ação das moléculas sinalizadoras presentes no SLCV de *P.aeruginosa* sobre a formação dos biofilmes, visto que em algumas cepas houve diferença na ação do sobrenadante nos diferentes substratos e temperatura, o que reforça a hipótese de que as características do ambiente ao qual o biofilme está alocado também afetam a detecção de QS.

Wang et al. (2013) em seus experimentos seguindo a mesma metodologia adotada nesse trabalho, utilizou o SLCV (contendo AHLs, identificadas por cromatografia de camada fina) de *P. aeruginosa* (30 e 60%) com 17 cepas de *Salmonella enterica* em caldo soja tripticaseína (TSB) e exsudado de carne. Os biofilmes foram desenvolvidos em microplaca de poliestireno de 96 poços, a 37°C e 25°C, depois corado com cristal violeta 0,25% e descorado com etanol 95%, sendo posteriormente quantificando a formação do biofilme por absorbância a 570 nm. Com os resultados obtidos, eles puderam demonstrar, pela primeira vez, que o sobrenadante de *P. aeruginosa* inibiu significativamente ($p < 0,05$) as taxas de crescimento de três estirpes de *S. enterica*, durante a fase exponencial (12 h) e a fase estacionária precoce (24 h), em comparação com o biofilme sem adição do sobrenadante, mas não durante a fase estacionária, ou seja, a inibição do biofilme das estirpes foi diminuindo conforme o tempo de incubação, tanto em caldo TBS quanto no exsudado de carne, chegando a atingir a porcentagem máxima de inibição em cada substrato de 70,7% e 93,3%, respectivamente. Isto indica que a presença AHLs no sobrenadante de *P. aeruginosa*, contendo AHLs, tem a capacidade de modificar a interação da adesão da *S. enterica* com a superfície, atuando na diminuição dessa relação bactéria/superfície. Estes resultados coincidem com os obtidos pelo presente trabalho, pois utilizando o período de 24 horas de incubação, foi também possível observar que as concentrações de SLCV de *P. aeruginosa* aplicadas reduziram a densidade dos biofilmes formados, sendo esta redução mais expressiva no substrato de carne que no caldo MH.

Ainda não está completamente elucidado do por que o sistema de sinalização QS da *P. aeruginosa* inibe o crescimento de determinadas bactérias e por que outras bactérias toleram essa inibição por compostos das moléculas

sinalizadoras. Porém Tashiro et al. (2013), em sua revisão sobre a interação da *P. aeruginosa* com outras bactérias diz que recentemente foi revelado que os sistemas de sinalização de *P. aeruginosa* são capazes de modular diversos fenótipos, o que inclui a motilidade e a formação de biofilme em bactérias em um amplo aspecto de Gram-positivas e Gram-negativas e até mesmo em leveduras, o que reitera que elas podem ser eficientes na formação estrutural e na alteração da função da comunidade. Ele também menciona que a adição de moléculas sinalizadoras de *P. aeruginosa* em bactérias isoladas do solo, foi capaz de afetar o crescimento de Gram-positivas e negativas, mas não em todas, e que esse efeito advindo da interação de comunicação entre células não é equivalente ao de antibióticos, que podem induzir a lise celular ou suprimir o crescimento, mas sim retardam a taxa de crescimento.

Apesar de ter sido possível quantificar o biofilme e observado a influência de moléculas sinalizadoras sobre seu crescimento, sempre quando se compara resultados de formação de biofilme, vários fatores podem interferir na reprodutibilidade e correlação dos dados obtidos, como as condições aos quais foram submetidas as cepa (por exemplo, meio de cultivo, superfície, temperatura) e também o método utilizado para a quantificação (ALAVI; HANSEN, 2013).

6 CONCLUSÃO

A substituição de 30% do substrato pelo SLCV de *P. aeruginosa* reduziu significativamente a densidade dos biofilmes mono e multiespécie de *E. coli* e *S. aureus*. Quando substituído 60% do substrato pelo SLC de *P. aeruginosa* a redução obtida não foi tão expressiva. A temperatura de 35 °C e o exsudado de carne favoreceram a formação do biofilme na superfície de aço inoxidável. Portanto, foi possível verificar a partir deste estudo que as moléculas produzidas por *P. aeruginosa* presentes no SLCV influenciaram a formação de biofilme mono e multiéspecie de *E. coli* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável sob as condições avaliadas, demonstrando grande potencial de pesquisa e estratégias com relação a aplicação dessas moléculas no combate a formação de biofilme bacteriano em ambiente de processamento de alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, D.; HANSEN, T. Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. **Biofouling**. v. 29, n.1, p. 1253-1268, 2013.

ALONSO, V. P. **Biofilmes monoespécie e multiespécies de patógenos Gram positivos de origem láctea em diferentes substratos**. 2015. 100 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2012.

ANDRE, C. **Adesão, formação e composição de biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina**. 2015. 49 f. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80 f. Tese (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRESOLIN, B. M. Z.; STELLA, J.K. D.; SILVA, S. E. F. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba/Paraná/Brasil. **Estudos de Biologia**. v. 27, n. 59, p. 2-3, 2005.

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

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente), Universidade do Minho, Braga, 2004.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; KOURKNOUTAS, Y.; NYCHAS, G. J. Inhibition of the Early Stage of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* Biofilm Development on Stainless Steel by Cell-Free Supernatant of a *Hafnia alvei* Culture. **Applied Environmental Microbiology**. v. 76, n. 6, p. 2018-2022, 2010.

DEEP, A.; CHAUDHARY, U.; GUPTA, V. *Quorum sensing* and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. **Journal of Laboratory Physicians**. v. 3, n. 1, p. 4-11, 2011.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**. v. 50, p. 930–936, 2015.

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

DOUROU, D.; AMMOR, M. S.; SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Growth Of *Salmonella Enteritidis* And *Salmonella Typhimurium* In The Presence Of *Quorum Sensing* Signalling Compounds Produced By Spoilage And Pathogenic Bacteria. **Food Microbiology**. v. 28, ed. 5, p. 1011-1018, 2011b.

DOUROU, D.; BEAUCHAMP, C. S.; YOONG, Y.; GEORNARAS, I.; BELK, K. E.; SMITH, G. C.; NYCHAS, G. J. E. SOFOS, J. N. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. **International Journal of Food Microbiology**. v. 149, ed. 3, p. 262-268, 2011a.

DUCRIQUET, J. P. **Controle de qualidade na indústria de carnes**. 2010. 34 f. Monografia (Especialização Lato Sensu em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal), Universidade Castelo Branco, Curitiba, 2010.

DUTRA, T. V. **Avaliação da formação de biofilmes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável.** 2016. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

FLACH, J.; KARNOP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FUNG, D. Y. C.; KASTNER, J. J.; KASTNER, C. L.; VANIER, M. A.; HAJMEER, M. N.; PHEBUS, R. K.; SMITH, J. S.; PENNER, K. P.; MARSDEN, J. L. **Meat Science and Application: chapter 8.** CRC Press: New York, 2001, 704 p.

GAVINHO, B. **Desenvolvimento de imunógeno bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* conjugado ao toxóide tetânico.** 2011. 40 f. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GLANSDORP, F. G; THOMAS, G. L.; LEE, J. K.; DUTTON, J. M.; SALMOND, G. P. C.; WELCH, M.; SPRING, D. R. Synthesis and stability of small molecule probes for *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulation. **The Royal Society of Chemistry.** n. 2, p. 3329-3336, 2004.

GRANDI, A. Z. **Influência de moléculas autoindutoras produzidas por *Escherichia coli* na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*.** 2015. 73 f. Tese (Pós-graduação em Ciência de Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens*.** 2004. 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

HERRERA J. J. R.; CABO M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology.**v. 24, n. 6, p. 585–591, 2007.

HEYDORN, A.; ERSBOLL, B.; KATO, J.; HENTZER, M.; PARSEK, M. R.; TOLKER-NIELSEN, T. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling and stationary-phase sigma factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 2008-2017, 2002.

HONDA, N. H.; KIMURA, S.; TATEDA, K.; HORIKAWA, M.; UEDA, C.; ISHII, Y.; ISHIGURO, M.; MIYAIRI, S.; YAMAGUCHI, K. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducers and their Degradation Products, Tetramic acids, in Bacterial Survival and Behavior in Ecological Niches. **Microbes Environ**. v. 26, n. 2, p. 160-164, 2011.

JÚNIOR, A. C. **Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno**. 2011. 74 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

KIMURA, S.; TATEDA, K.; ISHII, Y.; HORIKAWA, M.; MIYAIRI, S.; GOTOH, N.; ISHIGURO, M.; YAMAGUCHI, K. *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. **Microbiology Society**. v. 155, p.1934-1939, 2009.

KIRISITS, M. J.; MARGOLIS, J. J. GAGE-PUREVDORJ, B. L.; VAUGHAN, B.; CHOPP, D. L.; STOODLEY, P.; PARSEK, M. R. Influence of the Hydrodynamic Environment on *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n. 22, p. 8357-8360, 2007.

KRASZCZUJ, V. **Verificação do processo de higienização pré-operacional de um abatedouro de aves**. 2010. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em engenharia de alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy *quorum sensing* network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbes Environ**. v.6, n. 1, p. 26-41, 2015.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilme in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LUES, J.F. R.; TONDER, V. I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**. v. 18, ed. 4, p. 326-332, 2007.

MAIA, A. A.; CANTISANI, M. L.; ESPOSTO, E. M.; SILVA, W.C. P.; RODRIGUES, Elizabeth C. P.; RODRIGUES, D. P.; LÁZARO, N. S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 1, p. 3-6, 2009.

MATTILA, K. **Biofilms on stainless steels exposed to process waters**. 2002. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), University of Helsinki, Helsinki, 2002.

MEIRA, Q. G. S. **Capacidade de adesão, formação de biofilme e resistência a sanitizantes de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de serviços de alimentação**. 2011. 108 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Nutrição), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard-Ninth Edition**, M07-A9 v. 32, n. 2 replaces M07-A8, v. 29, n. 2.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes*, from Various Materials to Beef. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 4015-4024, 2002.

MILLEZI, A. F. M. **Ação dos óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escheria coli***. 2012. 112 f. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MOLINA, P. D. S. **Eficácia de desinfetantes frente bactérias sobreviventes a higienização de equipamentos em matadouro-frigorífico de bovinos**. 2009. 51 f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MOTA, J. L. **Avaliação da presença de contaminação por microrganismos patológicos nas mãos de manipuladores de material reciclável do Cooperclia**. 2015. 97 f. Monografia (Bacharel em Biomedicina), Faculdade TECSOMA, Paracatu, 2015.

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

NETO, A. C.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, n. 33, p. 263-271, 2002.

OLIVEIRA, M. M. M. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes* a óleos essenciais**. 2009. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a 39 anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 181-186, 2000.

PEREIRA, M. O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 211 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga, 2001.

PEREIRA, T. L.; WALUS, C.; BITTENCOURT, J. V. Qualidade sanitária em processamento industrial de carne bovina. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2015, Ponta Grossa. **Anais**. Ponta Grossa: Associação Paranaense de Engenharia de Produção, 2015. p. 1- 9.

PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KENDE, A. S.; GREENBERG, P.; IGLEWSKI, B.H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, n. 20, p. 11229-11234, 1999.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; MONDHER, E. J. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **BioMed Research International**. v. 2015, p. 3, 2015.

RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; MORETRO. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress condition. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, n.3, p. 372-383, 2007.

RODRIGUES, L. B. **Avaliação da formação de biofilme e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimento em sala de cortes de matadouro de aves**. 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2009.

SANCHES, P. **Detecção da Produção de Biofilme em *Staphylococcus aureus* e Estafilocos Coagulase-Negativa isolados de Recém-Nascidos**. 2008. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas - Modalidade Médica). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**. v. 184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.

SHALE, K.; LUES, J. F. R.; VENTER, P.; BUYS, E. M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**. v. 22, n. 5, p. 433–438, 2005.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**. v. 20, n. 9, p. 407-413, 2009.

SHROUT, J. D.; NIELSEN, T. T.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. **Cambridge Core**. v. 36, n. 5, p. 367-373, 2011.

STOCCO, C. W.; ALMEIDA, L.; BARRETO, E. H.; BITTENCOURT, J. V. M. Controle de qualidade microbiológico no processamento de frigorífico bovino. **Revista Espacios**. v. 38, n. 22, p. 9, 2017.

TASHIRO, Y.; YAWATA, Y.; TOYOFUKU, M.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. **Microbes and Environments**. v. 28, n. 1, p.13-24, 2013.

TELLES, E. M. **A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão**. 2011. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TIBA, M. R.; NOGUEIRA, G. P.; LEITE, D. S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli*

isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 1, p. 58-62, 2009.

VENTURI, V. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas* why so different?. **Molecular Microbiology**. v. 49, p. 1-9, 2003.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicotróficas isoladas de leite**. 2006. 159 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

WANG, H.H.; YE, K. P.; ZHANG, Q. Q.; DONG, Y.; XU, X. L.; ZHOU, G.H. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Control**. v. 32, n. 2, p. 650-658, 2013.

WHITELEY, M.; BANGERA, M. G.; BUMGARNER, R. E.; PARSEK, M. R.; TEITZEL, G. M.; LORY, S.; GREENBERG, E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**. v. 113, p. 860-864, 2001.