

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS (DALIM)
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TATIANE VIANA DUTRA

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2016

TATIANE VIANA DUTRA

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Msc. Márcia Maria dos Anjos Szczerepa

Co-orientadora: Prof. Dra. Marcia Geraldo Perdoncini

CAMPO MOURÃO

2016



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão



Departamento Acadêmico de Alimentos
Curso de Engenharia de Alimentos

TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

por

TATIANE VIANA DUTRA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 17 de junho de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Msc.^a Márcia Maria dos Anjos Szczerepa
Orientadora

Prof^a. Dr.^a Márcia Geraldo Perdoncini
Co-orientadora

Prof^a. Dr.^a Mirela Vanin dos Santos Lima
Membro da banca

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

Nota: O documento original assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Campus* Campo Mourão.

À minha mãe, Maria Helena, em
memória ao meu pai, Luiz Carlos,
e ao meu companheiro, Renan,
meus alicerces de motivação,
coragem e amor para chegar até aqui.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter iluminado meus passos, me permitido cursar esta faculdade e chegar até aqui.

Agradeço também a minha mãe, Maria Helena, e ao meu companheiro, Renan, por terem me apoiado, me dado suporte, carinho, amor e entendido tantas ausências em prol deste bem maior. Por me propiciarem inúmeras risadas em momentos de desespero e alegria. Em memória agradeço ao meu pai, pois sempre o senti presente, me guiando para o caminho correto e dando forças para seguir adiante.

Como caminhar sozinho além de monótono e triste é também impossível, agradeço imensamente as minhas amigas Francine, Amanda e Beatriz por estarem comigo ao longo de toda a graduação, sendo as melhores companhias tanto em atividades voltadas ao curso quanto às relacionadas a vida pessoal. E também a todos os amigos que se fizeram presente ao longo destes anos, cada um com seu jeito especial e sua importância em meu coração.

Um agradecimento muito especial a minha orientadora, Marcia Anjos, pois sem sua ajuda seria impossível a realização do presente trabalho; sua contribuição foi imprescindível e me fez me apaixonar ainda mais pela área microbiológica, por demonstrar tanto carinho e amor à sua profissão e área de especialização. A professora Marcia Perdoncini por ser a responsável pela base de todo meu conhecimento microbiológico, pelo meu primeiro contato com o assunto e o início da paixão pelo tema.

Outro importante agradecimento se dá a Universidade Estadual de Maringá juntamente com o professor Benicio por cederem gentilmente o laboratório da instituição para finalização das análises da pesquisa. A doutora Meg Fernandes por me transmitir um pouco de seu vasto conhecimento sobre biofilmes em pouco tempo de convivência.

Finalmente, agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Campo Mourão (UTFPR-CM), e aos professores do Departamento de Engenharia de Alimentos (DALIM) por terem dividido comigo seus conhecimentos e assim possibilitado a minha formação profissional.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

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

Um grande problema em indústrias alimentícias é a contaminação de superfícies com biofilmes, os quais podem ocasionar graves problemas de contaminação dos produtos quando não controlados, podendo ocorrer quando a indústria não apresenta as devidas condições higiênicas e sanificantes. A adesão e formação de biofilmes maléficos a saúde humana vem sendo alvo de inúmeros estudos, tanto a respeito de sua composição, da superfície de formação, da influência de fatores intrínsecos e extrínsecos como temperatura, tempo de contato, entre outros. O presente estudo teve como objetivo verificar o crescimento de biofilme monoespécie e multiespécie composto por *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*, em superfície de aço inoxidável AISI 304, representado por pequenos cupons deste material, na presença de resíduos alimentares como o leite e o extrato de carne, em temperaturas controladas de 25 °C e 35 °C, durante os períodos de 24 e 48 horas. O método utilizado foi a quantificação das colônias em placas, foram ativadas as bactérias e inoculadas nos substratos a serem testados, nas temperaturas e tempos de contato analisados; após foram plaqueadas as consequentes diluições e analisado o crescimento do biofilme nas variadas condições. O plaqueamento foi realizado em três meios de cultura distintos, um específico para cada bactéria e um meio para o crescimento de ambas, sendo este último o Miller Hinton; o meio de crescimento específico da *Escherichia coli* foi o Eosin Metin Blue e do *Staphylococcus aureus* foi o Baird Parker. Com tais condições propícias foi constatada a adesão e formação do biofilme de ambas bactérias, porém com predominância da espécie Gram-negativa. Ambos resíduos alimentares proporcionaram aderência e formação do biofilme, no entanto o resíduo de extrato de carne favoreceu o desenvolvimento do biofilme multiespécie na temperatura de 35 °C, situação que não foi constatada no resíduo de leite em um período de até 48 horas de contato. O substrato e a temperatura para o desenvolvimento do biofilme influenciaram diretamente a sua composição.

Palavras chave: biofilme, adesão, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, aço inoxidável AISI 304.

ABSTRACT

Dutra, Tatiane V. **Evaluation of biofilms formation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel surface.** 2016. 40p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

An important problem in the food industry is contamination of surfaces with biofilms, which can cause serious problems of contamination of the products when uncontrolled, can occur when the industry does not have the necessary hygienic and sanitizers conditions. The adhesion and biofilm formation harmful to human health has been the target of numerous studies, both as to its composition, the formation surface, the influence of intrinsic and extrinsic factors such as temperature, contact time, among others. This study had to determined the growth of monoespécie biofilm and multispecies consisting of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel surface AISI 304, represented by small coupons of this material in the presence of food waste such as milk and extract meat under controlled temperatures of 25 °C and 35 °C for periods of 24 and 48 hours. The method used was the quantification of the colonies on plates, activated were as bacteria and inoculated in substrates to be tested in the temperatures and contact times analyzed ; after plated were as subsequent dilutions and analyzed Growth to the biofilm varied conditions . The plating was Held in Three Distinct culture media, a specific paragraph Each bacterium and hum Part For Both Growth , the latter being the Miller Hinton ; The Specific Growth Medium of *Escherichia coli* was the Metin eosin blue and make *Staphylococcus aureus* was the Baird Parker. With such favorable conditions it was found the adhesion and biofilm formation of both bacteria, but with a predominance of Gram-negative species. Both food residues provided an adhesion and biofilm formation, however meat extract residue favored the development of multispecies biofilm at temperature of 35 °C, a situation that was not found in the milk residue in a period of 48 hours contact. The substrate and the temperature for the development of biofilm direct influence on their composition.

Key words: biofilm, adhesion, *Escherichia coli*, *Staphylocococus aureus*, stainless steel AISI 304.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de Formação do Biofilme.	17
Figura 2: Ciclo de desenvolvimento de um Biofilme.....	19
Figura 3: Microscopia Eletrônica de Varredura da Superfície de Aço Inoxidável AISI304.	20
Figura 4: Quantificação do biofilme mono-espécie de <i>E. coli</i> em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes meios de crescimento.....	28
Figura 5: Quantificação do biofilme mono-espécie de <i>S. aureus</i> em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes meios de crescimento.....	29
Figura 6: Quantificação do biofilme multi-espécie formado por <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes meios de crescimento.....	31

SUMÁRIO

RESUMO.....	2
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Histórico de Biofilmes.....	14
3.2 Composição e Estrutura do biofilme.....	15
3.3 Formação do Biofilme	17
3.4 Superfícies Envolvidas na Formação do Biofilme	19
3.5 Substratos Envolvidos Na Formação Do Biofilme	20
3.6 Microrganismos Envolvidos na Formação do Biofilme	22
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Materiais.....	24
4.2 Procedimentos	24
4.2.1 Esterilização dos materiais	24
4.2.2 Preparo dos meios de cultura e salina.....	25
4.2.3 Aderência e Crescimento do Biofilme	25
4.2.4 Quantificação do biofilme.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos deve fornecer ao consumidor um produto seguro. Para isso, se faz necessário controlar a presença de microrganismos em seus produtos, através da verificação e monitorização das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios utilizados no processamento. Assim, um programa efetivo de limpeza e sanitização se faz necessário para inativar microrganismos e prevenir a formação de biofilmes nas superfícies de processamento do alimento.

O biofilme é formado por uma comunidade de células sésseis, mono ou multiespécies, as quais produzem exopolissacarídeos (EPS) que auxiliam na adesão das células a uma superfície. Os microrganismos apresentam diferentes metabolismos, fenótipos, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Tal estrutura pode se formar tanto em ambientes bióticos ou abióticos; entretanto sua formação em superfícies abióticas, como o aço inoxidável AISI 304 utilizado em equipamentos de indústrias alimentícias vêm sendo alvo de pesquisas em relação principalmente aos malefícios causados. Apesar do aço ser um material resistente a corrosão e com estabilidade físico-química, as bactérias são capazes de formar biofilme também em tais superfícies (SHI; ZHU, 2009).

Após a formação dos biofilmes há liberação de células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores, causando comprometimento da qualidade microbiológica de matérias-primas e produtos acabados, problemas de corrosão de equipamentos e redução da capacidade de troca térmica entre superfícies. Portanto, o biofilme consiste em um ponto de contaminação constante causando um grande problema para as indústrias alimentícias (FUSTER-VALLS et al., 2008).

As bactérias em biofilme mantêm um nível elevado de resistência a agentes antimicrobianos e podem conter um número suficiente de células para representar uma dose infecciosa potencial. A formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos é conhecida como um risco potencial para a saúde do consumidor, em especial, se a contaminação cruzada dos alimentos ocorre após os procedimentos de higienização (SPOERING; LEWIS, 2001).

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* destacam-se como bactérias formadoras de biofilmes em superfícies utilizadas em indústrias de alimentos.

O *S. aureus* é um microrganismo do grupo dos cocos Gram-positivos que, apesar de ser mesófilo, cresce em ampla faixa de temperatura, de 7 a 47°C, sendo entre 35 - 37°C a temperatura à qual a taxa específica de crescimento é máxima; e de pH, de 4 a 10, tendo como ótimo 6 a 7. É conhecido também como eubactéria halotolerante, desenvolvendo-se em meio com até 20% de cloreto de sódio (MADANI, 1998). Encontra-se na mucosa nasofaríngea de humanos e animais, constituindo parte da microbiota normal (FUEYO et al., 2005).

Com frequência *S. aureus* é encontrado em leite, em superfícies de contato do processamento e nas mãos de manipuladores de alimentos, fato preocupante pela capacidade do *S. aureus* causar toxinfecções alimentares (DE BUYSER et al., 2001; JORGENSEN et al., 2005).

Essa espécie causa intoxicação alimentar e a falta de higiene em ambientes onde ocorre a manipulação de alimentos leva a contaminação inclusive das superfícies, com consequente formação de biofilme (FUEYO et al., 2005).

E. coli são bacilos Gram-negativos retos que podem apresentar capsulas e possuir flagelos, colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais estabelecendo uma relação benéfica e mútua com o hospedeiro, entretanto algumas cepas podem ser virulentas e desencadear graves doenças (INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA, 2006). O processamento de alimentos pode apresentar precárias condições higiênicas, tornando-se comum a contaminação dos alimentos por *E. coli*, causada principalmente por contaminação fecal ou por contato com superfícies contaminadas (NASCIMENTO; STAMFORD, 2000).

As células do biofilme podem ser resistentes aos estresses ambientais, antibióticos e desinfetantes, como consequência são extremamente difíceis de erradicar em indústrias alimentícias (HOIBY, 2010; MAH; O'TOOLE, 2001).

Alguns estudos sobre o potencial de formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável utilizam diferentes fontes de nutrientes que simulam os resíduos industriais que servem de substrato para os microrganismos. Substratos alimentares como o leite, possuem lipases e proteases termoestáveis e a deterioração desse material se dá de

forma elevada com a multiplicação de microrganismos componentes do biofilme capazes de se desenvolver em condições inóspitas como de baixas temperaturas (ROSADO et al., 2006).

Até o presente momento, não foram encontrados estudos relacionados à formação de um biofilme multiespécie composto por *S. aureus* e *E. coli* em superfícies de aço inoxidável, utilizando como fonte de nutrientes resíduos industriais proteicos, como leite e extrato de carne.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Promover e quantificar a adesão e a formação de biofilme mono e multiespécie composto por *S. aureus* e *E. coli* em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes substratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Promover e quantificar a adesão e formação de biofilme monoespécie de *E. coli* em superfície de aço inoxidável AISI 304 após 24 e 48 horas em diferentes substratos (carne, leite e caldo MH).
- Promover e quantificar a adesão e formação de biofilme monoespécie de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável AISI 304 após 24 e 48 horas em diferentes substratos (carne, leite e caldo MH).
- Promover e quantificar a possível interação e a formação de biofilme multi-espécies de *E. coli* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável AISI 304 após 24 e 48 horas em diferentes substratos (carne, leite e caldo MH).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico de Biofilmes

O avanço sobre estudos a respeito da formação de biofilme cresceu consideravelmente nas últimas duas décadas, em comparação com seu crescimento ao longo de seu surgimento (CAIXETA, 2008).

Por anos células em suspensão foram denominadas como planctônicas, e a partir de longos estudos descobriu-se a capacidade de algumas bactérias planctônicas formarem biofilme por sua adesão em diversas superfícies e, neste caso, são chamadas de células sésseis (LUCCHESI, 2006).

Estudos detalhados sobre adesão de bactérias marinhas em cascos de navios, em superfícies de variados tipos como metal, plástico e vidro foram publicados pela primeira vez por Zobell em 1943 (LUCCHESI, 2006; CAIXETA, 2008).

Costerton em 1978 constatou que os microrganismos em sua maioria se encontravam fixos a suportes em ambientes naturais e não em suspensão, tal descoberta se tornou possível a partir de técnicas mais sofisticadas de microscopia. Apesar dos microrganismos planctônicos serem por anos referência na seleção de agentes antimicrobianos, são encontrados em suspensão, sendo assim mais sensíveis a agressões ambientais em comparação a forma sésil, ou seja, microrganismos aderidos composto por células de diferentes fisiologias denominados de biofilme (CAPELLETTI, 2006).

Desde então vem crescendo as pesquisas a respeito do biofilme, principalmente sobre os mecanismos fisiológicos e de controle das formas livres (planctônica) e sésseis (biofilme), pela sua importância em atividades humanas que podem trazer tanto benefícios quanto malefícios (CAPELLETTI, 2006; CAIXETA, 2008).

3.2 Composição e Estrutura do biofilme

Há no mínimo três formas diferentes de caracterizar o biofilme; a visão homogênea da estrutura do biofilme, plana e tradicional é a primeira; a chamada de “Modelo do Mosaico Heterogêneo” é a segunda, descoberta por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), onde foi avaliada amostras em superfícies internas de sistemas de distribuição de água e observado micro colônias de bactérias ligadas por substâncias poliméricas extracelulares com colunas envolvidas por fase líquida em que se encontravam protozoários. O modelo em formato de tulipa ou cogumelo é o terceiro tipo, o qual apresenta uma estrutura porosa com canais capilares de água que servem para distribuições de água e nutrientes (POULSEN, 1999; CAIXETA, 2008).

A massa total do biofilme é constituída em sua maioria por água, entre 70% e 97% como demonstrado na Tabela 1 (SUTHERLAND, 2001). Enquanto que menos de 10% da massa é representada pelos microrganismos, embora a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme seja composta por substâncias poliméricas excretadas por tais microrganismos (PEREIRA, 2001).

Tabela 1 – Composição da matriz do biofilme

Componente	% da matriz
Água	Até 97%
Células microbianas (muitas espécies)	2 – 5%
Polissacarídeos (homo e hetero)	1 – 2%
Proteínas (incluindo enzimas)	< 1 – 2%
DNA e RNA	< 1 – 2%
Íons	Livre

Fonte: SUTHERLAND, 2001.

A matriz extracelular ou EPS é considerada a unidade protetora e unificadora do biofilme, sendo seu componente principal os polissacarídeos. É ainda formada pelas próprias células e componentes do ambiente como proteínas, ácidos nucléicos,

glicoproteínas, fosfolipídios, detritos e matéria inorgânica, portanto complexa e heterogênea (CAPELLETI, 2006; LUCCHESI, 2006; SUTHERLAND, 2001).

Os exopolissacarídeos, assim como algumas proteínas de superfície, se relacionam com a adesão inicial das células de microrganismos a alguma superfície. (CAIXETA, 2008).

Hetero e homopolissacarídeos formam as estruturas, consideradas simples, de variados polissacarídeos de bactérias Gram-negativas. Unidades repetidas e alinhadas de dissacarídeos e até octassacarídeos diferentes, compostos de dois a quatro monossacarídeos distintos, com alguns contendo grupos acetila e piruvato, representam a composição dos heteropolissacarídeos (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Exopolissacarídeos podem ser sintetizados durante todo o crescimento microbiano ou somente no período da fase logarítmica ou estacionária. A limitação de um nutriente essencial, não sendo esta fonte de carbono ou outra fonte de energia, induz a sua produção (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

O EPS pode sequestrar metais, cátions e toxinas, protegendo assim contra radiações UV, modificações no pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI, 2008). Também age como adesivo e uma barreira defensiva, a qual protege a célula do arraste pelo fluxo de substâncias, e de condições de estresse, caracterizadas pela falta de nutrientes, presença de biocidas ou agentes antimicrobianos, entre outros (CAIXETA, 2008).

Algumas características da estrutura do biofilme podem ser destacadas, como: tratam-se de estruturas visco elásticas e hidratadas, onde o grau de elasticidade está relacionado à interação entre exopolissacarídeos, proteínas e superfície. Características físico-químicas do ambiente bem com a existência ou não de fluxo determinam o formato, espessura, alongamento, rigidez e densidade do biofilme. A presença de fluxo o torna mais alongado e rígido, tal fato se relaciona ao atrito mecânico presente.

A matriz constituída basicamente por EPS dá a proteção ao biofilme; são constituídos ainda por micro colônias móveis fixadas à superfície; apresentam microcanais internos, por onde transitam nutrientes e água, seja por difusão passiva ou com a ajuda de água através de uma capilaridade especial. Tais microcanais podem

ainda transportar oxigênio para o interior do biofilme, assim pode-se viver tanto seres aeróbios quanto anaeróbios (BOARI, 2008; CAIXETA, 2008; SUTHERLAND, 2001).

3.3 Formação do Biofilme

Marshall sugeriu, em 1971, que o biofilme era formado em duas fases. Sendo a primeira reversível, onde ocorre a adesão dos microrganismos à superfície por força de Van der Waals, interações hidrofóbicas e atração eletrostática; podendo ser removida por rinsagem. Já na segunda fase ocorre a interação física entre a célula e a superfície além da síntese do EPS, denominada matriz de glicocálix, por interações dipolo-dipolo, ligações covalente e iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Assim a célula bacteriana se liga ao substrato através das fimbrias poliméricas, o que torna a remoção do biofilme possível apenas com ação química (detergentes e sanitizantes), térmica (temperatura acima de 40 °C) e mecânica (por exemplo, esfregação, raspagem, etc.) (CAIXETA, 2008).

A Figura 1 abaixo representa as etapas de contato com a superfície e instalação do microrganismo, seguida de crescimento e divisão celular. Dessa forma ocorre a formação do material extracelular, que fortalece a interação entre as células e a superfície; polímeros extracelulares são responsáveis pela adesão irreversível, formando o biofilme. Após este momento outros microrganismos se aderem facilmente a matriz e com o tempo desprendem-se do biofilme maduro formando novos biofilmes e assim segue uma cadeia de contaminações (CAPELLETTI, 2006).

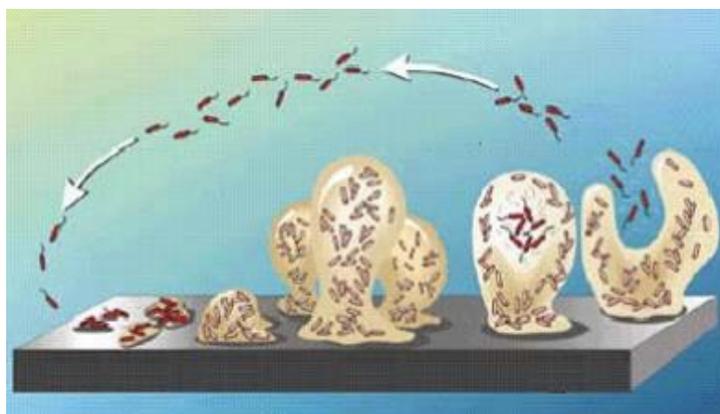


Figura 1: Etapas de Formação do Biofilme.

Fonte: CAPELLETTI, 2006.

A Figura 2 descreve a formação do biofilme mais detalhada, em cinco estágios:

- 1) Pré-adesão: alguns fatores podem estimular a adesão dos microrganismos em alguma superfície, como pH, temperatura, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença de compostos orgânicos e inorgânicos. A superfície pode ter suas propriedades alteradas por adsorção de nutrientes (FORSYTHE, 2002);
- 2) Adesão reversível: há interação entre a célula e a superfície e início da colonização. Apesar de não ser notado alterações fenotípicas, os genes produtores de exopolissacarídeos se ativam após 15 minutos de contato entre célula e superfície. As células aderidas podem retornar ao seu estado planctônico, por isso denomina-se adesão reversível. Forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, ácido-base de Lewis e hidrofobicidade são as principais neste estágio (BOARI, 2008; FORSYTHE, 2002);
- 3) Adesão irreversível: em geral, duas horas após a adesão primária, caracterizando-se por microcolônias, a motilidade é cessada. A matriz tridimensional e insolúvel de EPS constitui-se na principal força de ligação entre a célula e a superfície (BOARI, 2008);
- 4) Maturação: de três a seis dias após a adesão primária, podendo se estender a dez dias. A densidade populacional cresce, seja por divisão celular, redistribuição de células ou adesão de novas células planctônicas, assim como a produção e deposição de EPS, provocando aumento da espessura do biofilme e conferindo maior estabilidade da colônia contra flutuações, assim o biofilme está maduro (FORSYTHE, 2002);
- 5) Destacamento de células: nove a 12 dias após o início do processo, as células encontram-se móveis e semelhantes às planctônicas, sendo possível a contaminação tanto do alimento quanto a formação de um novo biofilme (FORSYTHE, 2002).

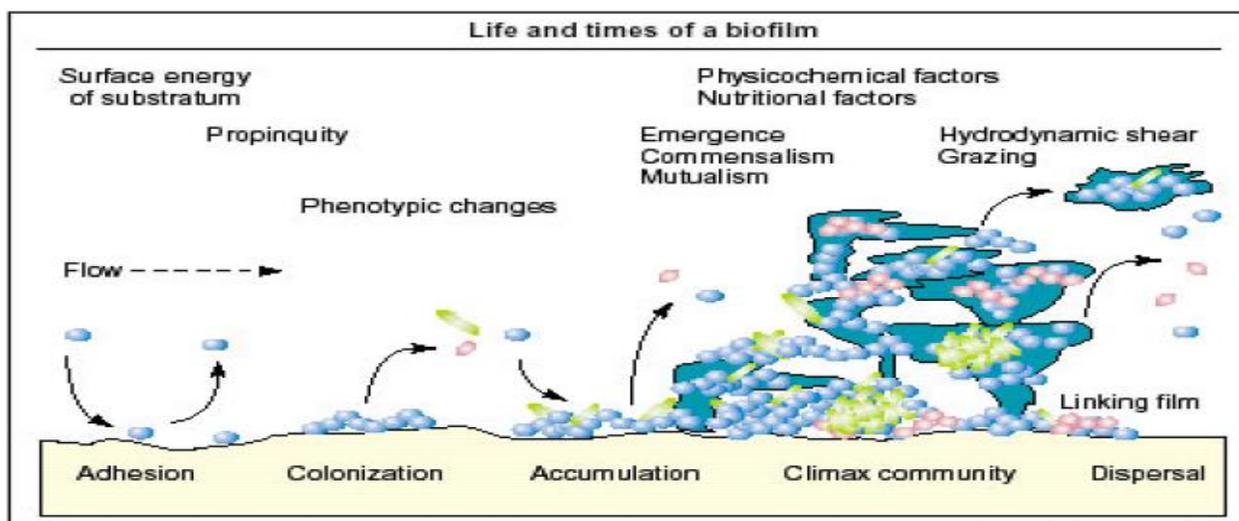


Figura 2: Ciclo de desenvolvimento de um Biofilme.

Fonte: CAIXETA, 2008.

3.4 Superfícies Envolvidas na Formação do Biofilme

Diversos microrganismos podem aderir em superfícies, bióticas ou abióticas, para formar o biofilme. Dentre estas superfícies algumas relacionadas a indústrias alimentícias são o aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha encontrados em ambientes e equipamentos utilizados para processar alimentos (RESENDE, 2005).

Uma superfície de boa qualidade é importante para a prevenção de biofilmes (HAUN, 2004). Quanto mais lisa e livre de imperfeições a superfície, menor a chance de se tornar o abrigo de células de microrganismos (CAIXETA, 2008). A adesão e posterior contaminação por microrganismos patogênicos ou deteriorantes dos alimentos relacionam-se às características macro e microscópicas das superfícies (ANDRADE, 2004).

Em indústrias alimentícias utiliza-se como principal material o aço inoxidável AISI (*American Iron and Steel Institute*) 304, o qual se compõe em % de peso por: Carbono – 0,025%; Silício – 0,44%; Manganês – 1,13%; Cromo – 18,23%; Níquel – 8,91%; Cobre – 0,23%; Nitrogênio – 0,0047%, sua superfície pode ser tratada, eletrostaticamente ou mecanicamente por exemplo, e tornar-se lisa, com diminutos riscos de adesão e formação do biofilme (HAUN, 2004).

Apesar deste material apresentar boa resistência a agentes oxidantes e sanificantes, como ácido peracético e hipocloritos, é suscetível a corrosão por íons clorados e componentes sulfurosos reduzidos (ISMAIL et al., 1999).

A formação do biofilme é afetada pela composição, rugosidade e porosidade das superfícies (PEREIRA et al., 2000).

O aço inoxidável difere entre si pelo grau de polimento empregado, que vai de 1, sem polimento, a 8, superfície espelhada. Com o objetivo de reduzir a rugosidade da superfície existem dois tratamentos adicionais, o polimento mecânico e o eletropolimento (JULLIEN et al., 2002).

Em indústrias alimentícias geralmente utiliza-se o aço inoxidável AISI 304 com polimento 4 (HAYES, 1993). A morfologia da superfície do aço inoxidável AISI 304 é avaliada comumente por meio de microscopia eletrônica de varredura, como demonstrado na Figura 3 abaixo.

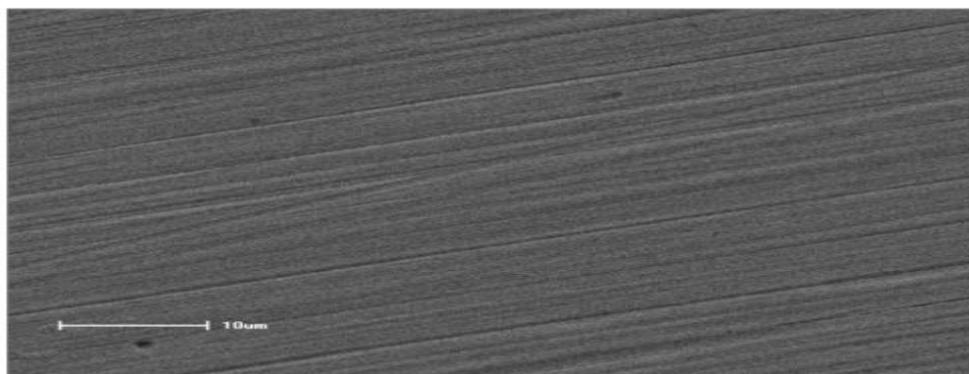


Figura 3: Microscopia Eletrônica de Varredura da Superfície de Aço Inoxidável AISI304.
Fonte: ANDRADE et al.,2012.

3.5 Substratos Envolvidos Na Formação Do Biofilme

Biofilmes compostos por microrganismos patogênicos apresentam-se comumente em indústrias alimentícias de processamento de leites, carnes, aves ou peixes, os quais servem de substrato para seu desenvolvimento (SREY; JAHID; HA, 2013).

O processamento industrial é responsável pela geração de diversos resíduos e a composição destes interfere diretamente nas características do biofilme a ser formado. Portanto, meios nutricionalmente mais ricos favorecem o desenvolvimento bacteriano e

consequentemente a formação de biofilme. Há um exemplo de um surto com *Salmonella* na Espanha, onde 2138 pessoas foram contaminadas pela presença de biofilme formado em uma tubulação no processamento de frangos, ao consumirem o produto mal cozido (PEREZ-RODRIGUEZ, et al., 2008).

A contaminação que os microrganismos podem causar em alimentos está diretamente ligada a sua força de atração com uma superfície contaminada e o substrato presente, bactérias como a *Listeria monocytogenes* em contato com extrato de carne apresentam um bom desenvolvimento de biofilme em diversas superfícies, porém quando em superfície de aço inoxidável tal atração se dá de forma mais fraca, ou seja, apesar do substrato de carne favorecer o crescimento do biofilme a superfície influencia na força de atração do biofilme (MIDELET , 2002).

Haun e Cristianini (2004) por exemplo, estudaram a formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em placas de aço inoxidável submersas em leite através de um sistema dinâmico e outro estático, representando trocadores de calor e tanques de armazenamento, sucessivamente. A partir do modelo estático obteve-se contagens acima de 10^5 UFC/cm², demonstrando que o acúmulo de resíduo uma vez em contato com a superfície por um determinado período favorece a formação do biofilme.

Existem poucos estudos com relação ao substrato de carne na formação de biofilmes microbianos. Porém, o trabalho de Burgos et al. (2013) demonstrou que o líquido liberado durante o processamento da carne auxilia no processo de formação de biofilme, enfraquecendo o potencial de limpeza de diversas formas de controle. A *Salmonella* foi frequentemente encontrada nos biofilmes formados a partir de substratos cárneos, portanto o consumo de tais alimentos mal cozidos ou crus podem levar a gastroenterites agudas, cujos sintomas são vômitos e diarreias, uma vez que a contaminação não se dá mais apenas pela forma planctônica, mas também por microrganismos organizados em biofilmes (SHI; ZHU, 2009; THALLINGER, et al. 2013).

A carne e derivados utilizados como substratos na formação de biofilme sobre superfícies de aço inoxidável vem sendo alvo de estudos por parte de indústrias alimentícias, principalmente pelo grande risco de contaminação cruzada. Um estudo observou o potencial formador de biofilme composto por *Salmonella* a partir de tais substratos, em superfícies de aço inoxidável bem como sua remoção com surfactantes

catiônico, aniônico, não-aniônico e biotensoativo, sendo que os mais eficientes na remoção foram os catiônicos (CTAB) e aniônicos (SDS) (H. WANG et al., 2016).

3.6 Microrganismos Envolvidos na Formação do Biofilme

Um vasto número de espécies de microrganismos apresenta maior aptidão de formar biofilmes, ou seja viver em sua forma sésil, em superfícies variadas, inclusive em condições adversas (CAPELLETTI, 2006).

Tal biofilme pode ser constituído de uma ou múltiplas espécies, as quais podem metabolizar produtos que sirvam de suporte para o crescimento das demais ou ainda fornecer ligantes para a adesão de outras. Na direção contrária há a competição por nutrientes e o acúmulo de produtos tóxicos que podem vir a inibir a diversidade de espécies (CAIXETA, 2008).

Como exemplo há inúmeras espécies, que através de pesquisas incansáveis vem demonstrando sua capacidade de formação de biofilmes; Hesham (2011) constatou a capacidades de estirpes de *Bacillus cereus* em formar biofilme sobre superfícies de poliestireno, quando em TSB diluído, tal capacidade era aumentada e também constataram maior habilidade de esporos do *B. cereus* na formação do biofilme em relação as células vegetativas.

Ainda sobre os microrganismos patogênicos presentes em indústrias alimentícias capazes de se aderirem e formarem o biofilme destaca-se a *Listeria monocytogenes*, que é conhecida por sua resistência ao calor e sobrevivência a temperaturas de refrigeração, alta concentração de sais, capacidade de colonização de superfícies e vetor de infecções alimentares graves (GANDHI; CHIKINDAS, 2007; PAN, BREIDT-JUNIOR; KATHARIOU, 2006); tais características tornam seu controle difícil e sua presença em indústrias de processamento de carnes e leites comum (CHAMBEL et al., 2007; CHASSEIGNAUX et al., 2002; CRUZ et al., 2008; LÓPEZ et al., 2008; SENCZEK; STEPHAN; UNTERMANN, 2000).

Vários estudos demonstram a capacidade desta bactéria se aderir e formar biofilmes em diversas superfícies do ambiente industrial. Segundo Boari (2008), sob condição de monocultivo e em temperatura de 18 °C, houve formação de biofilme por *S.*

aureus nas primeiras 48 horas. Já em temperatura inferior, como 7 °C tal fato ocorreu somente após 4 dias, o que indicou a relação da redução da temperatura com seu desempenho de formação. Porém, em ambas temperaturas, foi observada tendência linear de aumento das células sésseis ao longo dos 10 dias estudados.

Pompermayer e Gaylarde (2000), em seu trabalho sobre a adesão de *S. aureus* e *Escherichia coli*, sob condições de monocultivo e em cultivo misto, chegaram ao resultado de que o *S. aureus* apresentou melhor desempenho quando cresceu em condições de monocultivo; tal fato pode ser explicado pela superioridade de microrganismos Gram-negativos em se aderirem e formarem biofilmes devido aos aparatos celulares e flagelos, por eles apresentados, e também pelo seu menor tempo de geração, o que garante a sua dominância, em relação aos Gram-positivos.

Como *S. aureus* é uma bactéria mesófila, estudos comprovam que a refrigeração de alguns alimentos, como o leite cru, proporciona um controle de microrganismos mesofílicos indesejados, ou seja, ocorre o seu crescimento, porém de maneira inferior a bactérias psicotróficas por exemplo, como *Aeromonas* spp. (MARCHAND et al., 2007).

Diversas bactérias patogênicas, incluindo a *E. coli* vem demonstrando através de pesquisas sua capacidade de formação de biofilme, podendo levar a contaminação de alimentos devido a sua presença (CHAE; SCHRAFT, 2000; WIRTANEN et al., 1996).

Morelli et al. (2007) estudaram a adesão de *E. coli* O157:H7 em superfícies de aço inoxidável e PVC, utilizadas em indústrias de processamento de alimentos, em função do tipo de superfície e do tempo de contato. Os autores observaram que *E. coli* O157:H7, com capacidade para produzir exopolissacarídeos, apresentou maior grau de adesão nas superfícies avaliadas quanto maior o tempo de contato.

Dentre os microrganismos capazes de se aderirem e gerarem problemas a saúde os estudados no presente trabalho foram *S. aureus* e a *E. coli*.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

As linhagens das espécies utilizadas foram *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923, disponíveis no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão.

Os meios de cultura utilizados foram Mueller Hinton (MH) (Biomark Laboratories), Eosin Metilene Blue (EMB) (Biobras Diagnósticos) e Baird Parker (BP) (Acumedia), preparados de acordo com indicação do fabricante.

A superfície de aço inoxidável AISI 304 foi obtida comercialmente e cortada a laser com dimensões de 1,0x1,0x0,1cm³. Antes de cada experimento os cupons de aço eram devidamente higienizados e autoclavados.

O extrato de carne foi obtido conforme metodologia proposta por Carpentier Midelet (2002), que consiste no congelamento a -20°C de uma peça de carne envolta por papel alumínio seguido de armazenamento em geladeira por 48 horas a 10 °C, seguido de breve descongelamento, sendo o líquido obtido desse descongelamento utilizado como meio para crescimento do biofilme. O leite UHT utilizado foi obtido comercialmente na cidade de Maringá – PR.

4.2 Procedimentos

4.2.1 Esterilização dos materiais

Eppendorfs, cupons de aço inoxidável, pinças e ponteiros foram esterilizados em autoclave (Prismatec Autoclave Vertical CS) a 121°C por 15 minutos e armazenados vedados em local adequado até o momento do uso.

4.2.2 Preparo dos meios de cultura e salina

Foram preparados três meios de cultura: o ágar EMB para crescimento de *E. coli*, o ágar BP para *S. aureus* e o ágar MH para o crescimento de ambas espécies. Além disso, utilizou-se o caldo Miller Hinton, para o crescimento dos micro-organismos. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com o fabricante.

Ágar Baird Parker: Dissolveu-se 60 gramas em 1 litro de água destilada, após o processo de esterilização adicionou-se gema de ovo com telurito de potássio, sendo dissolvido 0,03 g de telurito de potássio em 3mL de água estéril e adicionado 2mL no meio BP após resfriado em banho-maria e 10mL de gema de ovo para 200mL de meio.

Ágar Mueller Hinton: Dissolveu-se 38 gramas em 1 litro de água destilada.

Caldo Mueller Hinton: Dissolveu-se 21 gramas em 1 litro de água destilada.

Ágar Eosin Metilene Blue: Dissolveu-se 36 gramas em 1 litro de água destilada.

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

Submeteu-se todo material obtido à esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, sendo os meios vazados em placas de Petri estéreis e armazenados sob 5°C até o uso.

4.2.3 Aderência e Crescimento do Biofilme

Ativou-se as bactérias *E. coli* e *S. aureus* que estavam em estoque congeladas a -20°C, colocando alíquotas em tubos contendo 3 mL de caldo Mueller Hinton 24 horas antes do ensaio, seguindo de incubação a 35°C. O caldo contendo o microrganismo foi diluído em salina 0,85%, na quantidade necessária para a equivalência com a escala de Mc Farland 0,5, conforme metodologia descrita pelo CLSI (2012). Logo após, cada uma das culturas foi diluída até que atingisse a concentração final de 10² UFC/ml em cada eppendorf contendo um cupom de aço inoxidável e um dos substratos (caldo Mueller Hinton, leite UHT ou caldo de carne).

Foram realizados três ensaios: 1) biofilme mono-espécie de *E. coli*, 2) biofilme mono-espécie de *S. aureus* e 3) biofilme multi-espécies de *S. aureus* e *E. coli*.

Após a adição dos inóculos, os eppendorfs foram armazenados em estufa a 35°C por 24 e 48 horas.

A formação dos biofilmes mono e multi-espécies utilizando os substratos de carne e leite foram avaliados após 24h e 48h à 25°C e 35°C.

4.2.4 Quantificação do biofilme

Após o período de 24 e 48 horas, os cupons de aço inoxidável foram retirados dos diferentes substratos, enxaguados em solução salina 0,85% para desprendimento de células fracamente aderidas. Em seguida os cupons foram transferidos para eppendorfs contendo 25µL de solução salina 0,85% e levados ao banho de ultrassom (Unique, 25kHz) por 10 minutos, visando a remoção das células fortemente aderidas. Em seguida se procedeu a diluição seriada em solução salina 0,85%.

A próxima etapa consistiu no plaqueamento das diluições de 24 horas e 48 horas, buscando avaliar a recuperação dos inóculos nos três meios de cultura; o Eosin Metilen Blue (EMB), Baird Parker (BP) e Miller Hinton (MH); onde foram plaqueados 20 microlitros de cada diluição em triplicata.

Após as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, para posterior contagem das colônias formadas.

Para a obtenção dos resultados, as colônias quantificadas no meio foram submetidas à fórmula abaixo:

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{(V_D / V_A) \cdot M \cdot D}{A}$$

Onde:

V_D : volume do diluente utilizado na rinsagem (mL)

V_A : volume da alíquota utilizada no plaqueamento (mL)

M: média da contagem obtida nas placas (UFC)

D: diluição realizada

A: área do cupom (cm²)

Após a realização das análises microbiológicas, os resultados obtidos foram transferidos a uma planilha do programa Excel (Microsoft, 2013) onde foram transformados em logaritmos na base 10, calculados as médias, o desvio-padrão e elaborados os gráficos.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo conduzidos três experimentos em dias diferenciados para cada análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através da metodologia de quantificação utilizada evidencia-se que as bactérias utilizadas neste estudo conseguiram se aderir e formar biofilme na superfície de aço inoxidável. Segundo Andrade et al. (1998) para se considerar um biofilme é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 à superfície. Por outro lado, Ronner e Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 respectivamente.

A Figura 4 apresenta o gráfico para a formação de biofilme de *E. coli* na superfície de aço inoxidável, utilizando como meio de crescimento o caldo MH incubado a 35°C , o extrato de carne e o leite, ambos incubados na temperatura de 25°C e 35°C para a formação do biofilme mono-espécie.

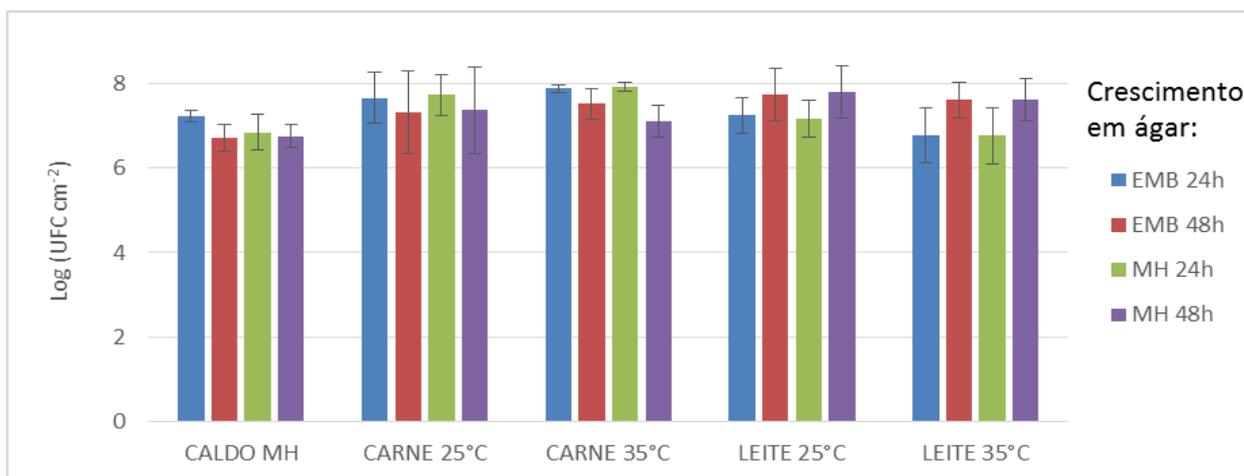


Figura 4: Quantificação do biofilme mono-espécie de *E. coli* em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes meios de crescimento.

Pode-se observar a aderência à superfície e crescimento da bactéria *E. coli* tanto no caldo MH quanto nas matrizes alimentares de carne e leite, seja em seu meio de cultura específico EMB ou no meio MH. É notável uma maior adaptação inicial do microrganismo quando em contato com o extrato de carne, pois houve uma maior contagem nas primeiras 24 horas, já na contagem realizada com 48 horas podemos evidenciar que o microrganismo possivelmente se encontra no início da fase de

declínio. Enquanto isso, a aderência e crescimento do biofilme no leite, ocorreram mais lentamente e através da contagem com 48 horas pode-se observar que o microrganismo ainda está em fase de crescimento. Todos os resultados demonstraram semelhança na recuperação no meio específico EMB e no meio MH.

Morelli et al. (2007) analisaram a adesão de *E. coli* O157:H7 em superfícies de aço inoxidável e PVC, adotadas em unidades de processamento de alimentos, em função do tipo de superfície e tempo de contato. Observaram que *E. coli* O157:H7, capaz de produzir exopolissacarídeos, apresentou formação de biofilme já nas primeiras 24 horas de contato e maior grau de adesão nas superfícies avaliadas de acordo com o aumento do tempo de contato, e assim como neste estudo, a cepa de *E. coli* formou biofilme com 24 h de contato e em contato com o substrato leite seu grau de adesão continuou ascendente com o maior tempo de contato.

A Figura 5 apresenta o gráfico para a formação de biofilme de *S. aureus* na superfície de aço inoxidável, utilizando como meio de crescimento o caldo MH incubado a 35°C, o extrato de carne e o leite, ambos incubados na temperatura de 25°C e 35°C para a formação do biofilme mono-espécie.

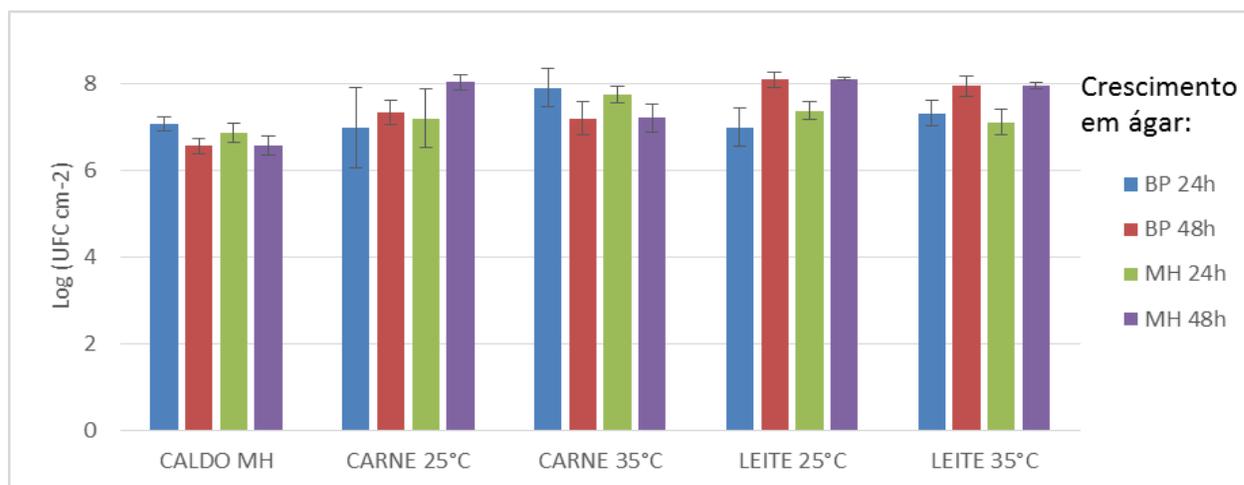


Figura 5: Quantificação do biofilme mono-espécie de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes meios de crescimento.

Observou-se que o crescimento de *S. aureus* no extrato de carne a 25°C ocorreu em até 48 horas. Por outro lado, na temperatura de 35°C, após 24h iniciou um declínio na contagem das células aderidas de *S. aureus*. tanto no meio específico BP

quanto no MH. Para o biofilme formado no leite, o *S. aureus* seguiu com seu desenvolvimento exponencial observado através da quantificação realizada com 48 horas em ambas as temperaturas de incubação.

Desta forma conclui-se que as duas matrizes alimentares se mostraram favoráveis a formação do biofilme de *S. aureus*, e ambas apresentaram contagens com 24 e 48 h equivalentes ou superiores quando comparado o biofilme formado em caldo MH. Isso se justifica pelo fato de que os substratos de carne e leite apresentam uma composição rica em nutrientes quando comparado ao caldo MH, com isso, os micro-organismos conseguem consumir mais nutrientes, se multiplicar mais, produzir mais EPS e assim formar mais biofilme.

Meira et al. (2012) destaca que o substrato e as características extrínsecas interferem na aderência bacteriana, assim seu estudo avaliou a aderência e formação de biofilme em aço inoxidável e polipropileno por cepas de *S. aureus* utilizando como substrato um caldo de vegetais, a temperatura de 7 °C e 28 °C. Os resultados obtidos demonstraram uma quantificação em torno de 4 log UFC/cm². Comparando com os resultados obtidos no presente estudo, houve uma maior quantificação de células em biofilme nos substratos carne e leite a temperatura de 25°C e 35°C em relação ao substrato de caldo de vegetais a temperatura de 7 °C e 28 °C.

O grande diferencial do presente trabalho foi avaliar a formação do biofilme composto por duas bactérias simultaneamente em uma mesma superfície (biofilme multi-espécie). Para isso, as cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram colocadas sob as mesmas condições de cultivo e o resultado para a quantificação do biofilme multi-espécie formado apresenta-se na Figura 6.

Primeiramente constatou-se que apenas no biofilme formado em extrato de carne houve crescimento conjunto das duas espécies, confirmado através da quantificação realizada nos meios específicos EMB e BP. Pode-se verificar que após 24 horas na temperatura de 25°C, não houve o crescimento de colônias de *S. aureus*, no entanto, após 48h, podemos observar o crescimento das duas espécies nesta temperatura. Isso demonstra uma maior facilidade para adesão e adaptação de bactérias Gram-negativas a superfícies do que bactérias Gram-positivas, conforme já relatado por Flach et al. (2005). Isso sugere que, após a adesão e desenvolvimento de

E. coli na superfície, o *S. aureus* conseguiu se aderir ao exopolissacarídeo já formado pela *E. coli*.

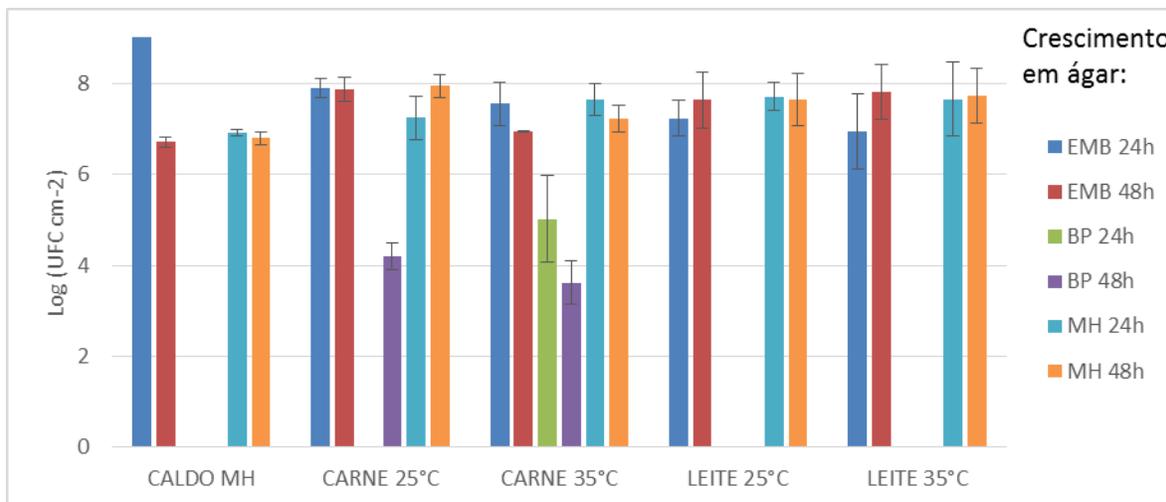


Figura 6: Quantificação do biofilme multi-espécie formado por *E. coli* e *S. aureus* em superfície de aço inoxidável utilizando diferentes meios de crescimento.

Pode-se observar que no biofilme formado em extrato de carne a 35°C, a temperatura mais elevada favoreceu a adesão e formação do biofilme multiespécie já nas primeiras 24h de contato.

Conforme relatado por Meire et al. (2012), a formação do biofilme sempre será maior na temperatura ideal de crescimento dos micro-organismos avaliados, pois a sua atividade metabólica está mais intensa nesta temperatura. A temperatura de 35°C é a ótima para as cepas avaliadas, portanto, elas conseguem se multiplicar mais e formar um biofilme mais robusto.

No biofilme multi-espécie formado em leite, assim como no biofilme formado em caldo MH, não houve crescimento no meio BP tanto em 24 quanto em 48 horas, evidenciando soberania da *E. coli* sobre o *S. aureus* nestes substratos. Embora *S. aureus* seja um micro-organismo comum em leite e consiga se multiplicar e formar biofilme mono-espécie nesta matriz, na presença de *E. coli* o *S. aureus* foi inibido. A competição por nutrientes e até mesmo o acúmulo de metabolitos tóxicos produzidos pelas espécies competidoras podem limitar a diversidade de espécies em um biofilme (ESPER, 2010).

Alarcón (2007) afirma que *E. coli* é considerado um microrganismo mais comensal, com poucas exigências nutricionais e com tempo de geração menor do que *S. aureus*, o que lhe permite superar a população deste último. Em seu estudo, ele avaliou o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em ricota, e verificou que o *S. aureus* é influenciado grandemente pela sua concentração inicial e pela concentração inicial da biota competitiva. A competição por nutrientes ou a produção de metabólitos ativos de acordo com o substrato presente podem ser algumas das causas importantes desse efeito inibitório observado tanto por Alarcón como no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos constatou-se a capacidade de a *E. coli* e *S. aureus* se aderirem a superfícies e formarem o biofilme, tanto mono quanto multiespécie, em superfície de aço inoxidável AISI 304, quando na presença de resíduos alimentares, que ocorrem na rotina industrial devido a um processo inadequado de higienização. Observou-se que o resíduo de extrato de carne favoreceu o desenvolvimento de biofilme multiespécie nas temperaturas avaliadas, sendo que a temperatura mais elevada facilitou a formação do biofilme multiespécie, pois com 24h de incubação já se constatou biofilme composto por *E. coli* e *S. aureus*. Assim, esse estudo sugere que na presença do extrato de carne o *S. aureus* se desenvolveu após a *E. coli* se aderir e produzir exopolissacarídeo, enquanto que na presença do leite e do caldo MH não houve a aderência de *S. aureus*, comprovando assim a influência dos resíduos na composição do biofilme que será formado em determinada superfície, caso existam falhas no processo de higienização industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em queijo ricota.** 2007. 66f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANDRADE, J. K., GALLI, A., BERBEL, L., CUNHA, M. T., GRASSI, M., TUSSOLINI, M., BANCZEK, E. P., RODRIGUES, P. R. P. **Aplicação e caracterização de camada de zircônio para a proteção contra corrosão do aço inoxidável AISI 304.** Informativo da Associação Brasileira do Aço Inoxidável, v.07,2012.

ANDRADE, N. J. **Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios.** In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR DE LEITE, 2., 2004, Viçosa: UFV, 2004. 14 p.

ANDRADE, N. J., BRIDGEMAN, T. A., ZOTTOLA, E. A. **Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods.** Journal of Food Protection, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

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

BURGOS, M. J. G., LOPEZ, R. L., AGUAYO, M. D. C. L., PULIDO, R. P., GALVEZ, A. (2013). **Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides.** Food Control, 30, 214e221.

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

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) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHAE, M.S., SCHRAFT, H., 2000. **Comparative evaluation of adhesion and biofilms formation of different *Listeria monocytogenes* strains.** International Journal of Food Microbiology 62, 103–111.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; Jordan S.; Perni S.; Shama G.; Adrião A.; Faleiro L.; Requena T.; Peláez C.; Andrew P.W.; Tenreiro, R. (2007). **Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial–temporal mapping along production cycle.** International Journal of Food Microbiology, 116, 52–63.

CHASSEIGNAUX, E., GERAULT, P., TOQUIN, M., SALVAT, G., COLIN, P., ERMEL, G. (2002). **Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants.** FEMS Microbiology Letters, 210, 271–275.

CLONTS, L. **Como evitar a formação de biofilmes.** Revista Controle de Contaminação, São Paulo, v. 109, p. 50-56, maio 2008.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;** Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CRUZ, C. D., SILVESTRE, F. A., KINOSHITA, E. M., LANDGRAF, M., FRANCO, B. D. G. M., DESTRO, M. T. (2008). **Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line.** Brazilian Journal of Microbiology, 39, 375–383.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE M.; LAFARGE V. **Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries.** International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.67, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

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

ESPER, L. M. R. ***Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) e *Bacillus cereus* [LM¹]: quorum sensing, formação de biofilme e ação de sanitizantes**. 2010. 125f. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO, G. **Biofilmes formados em materia-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(3), 291-296, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 151-153p.

FUEYO, J. M.; MENDONZA, M. C.; MARTÍN, M. C. **Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings**. *Microbes and Infection*, Paris, v. 7, n.2, p 187-194, 2005.

Fuster-Valls, N.; Herrero, M. H.; Mateo, M. M.; Jerez, J. J. R. **Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces**. *Food Control*, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

GANDHI, M., Chikindas, M. L. (2007). **Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive**. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15.

WANG, H., WANG, H., XING, T., WU, N., XU, X., ZHOU, G. **Removal of Salmonella biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme**. *LWT - Food Science and Technology* 66, 298 e 304, 2016.

HAUN, M.A.D.; CRISTIANINI, M. **Avaliação da Eficiência de um Esterilizador a Plasma na Inativação de *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos. UNICAMP, 2004.

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) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HAYES, P. R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Tradução Bernabé Sanz Pérez. Zaragoza: Acribia, p. 187-196, 1993.

HESHAM, M. E. **Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce**. Food Microbiology, 28, 1266e1274; 2011.

HOIBY, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). **Antibiotic resistance of bacterial biofilms**. International Journal of Antimicrobial Agents, 35, 322e332.

INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA. ***Escherichia coli*** . n.15 – Mai/Jun/2006.

ISMAIL, KH. M.; JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K.; EARTHMAN, J. C. **The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel**. Electrochimica Acta, v. 44, p. 4685-4692, 1999.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. **An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk**. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 267-272, 2005.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. **Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry**. Journal of Food Engineering, v. 56, p. 7-87, 2002.

LÓPEZ, V., VILLATORO, D., ORTIZ, S., LÓPEZ, P., NAVAS, J., DÁVILA, J. C., et al. (2008). **Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant**. Meat Science, 78, 130–134.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y.; **Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk.** Veterinary Microbiology. Amsterdam, v.59 p. 139-145, 1998.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. (2001). **Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.** Trends in Microbiology, 9, 34e39.

MARCHAND, S.; Coudijzera, K.; Heyndrickxa, M.; Dewettinckb, K.; Blocka, J. **Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk.** International Dairy Journal, 2007.

MEIRA, Q.G.S., BARBOSA, I.M., ATHAYDE, A.J.A.A., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P., SOUZA, E.L., 2012. **Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers.** Food Control 25, 469–475.

MIDELET, C. **Transfer of Microorganisms, Including *Listeria monocytogenes*, from Various Materials to Beef.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. France, p. 4015–4024, Vol. 68, No. 8, Aug. 2002.

MORELLI, A. M. F. **Adesão de *E. coli* O157:H7 em diferentes superfícies adotadas em unidades de processamento de alimentos.** Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora. MG: EPAMIG. v62, n.357. 2007.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M. **Incidência de *Escherichia Coli* O157:H7.** Revista de Higiene Alimentar, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 32-35, 2000.

PAN, Y., BREIDT-JUNIOR, F., KATHARIOU, S. (2006). **Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment.** Applied and Environmental Microbiology, 72, 7711–7717.

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**

anaerobic consortium. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 24, p. 181-186, 2000.

PEREIRA, O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.** 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.

PEREZ-RODRIGUEZ, F., VALERO, A., CARRASCO, E., GARCIA, R. M., ZURERA, G. (2008). **Understanding and modeling bacterial transfer to foods: a review.** Trends in Food Science & Technology, 19, 131 e 144.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. **The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to polypropylene.** Food Microbiology, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

RESENDE, J. G. O. **Formação de biofilme em aço inoxidável por Pseudomonas spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio.** 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

POULSEN, L. V. **Microbial Biofilm in Food Processing.** 1999. 6f. Department of Biotechnology, Centre for Advanced Food Studies, Building 221, Technical University of Denmark, 2800 Lyngby (Denmark).

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

ROSADO, M. S.; ANDRADE, N. J.; CARELI, R. T.; PEÑA, W. E. L.; LOPES, J. P. **Modelagem do processo de formação de biofilmes de Pseudomonas fluorescens em aço inoxidável, granito e mármore e avaliação das microtopografias dessas superfícies por microscopia eletrônica de varredura.** Higiene Alimentar. v21, n150, p. 119-120. 2006.

SENCZEK, D., STEPHAN, R., UNTERMANN, F. (2000). **Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of Listeria strains isolated from a meat processing plant over a 2 year period.** International Journal of Food Microbiology, 62, 155–159.

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

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, out/dez. 2004.

SPOERING, A. S., LEWIS, K. (2001). **Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobial.** Journal of Bacteriology, 183, 6746 e 6751.

SREY, S., JAHID, I. K., HA, S. D. (2013). **Biofilm formation in food industries: a food safety concern.** Food Control, 31, 572e585.

SUTHERLAND, I. W. **The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment.** Trends in Microbiology, n.5, v.9, p. 222-227, may, 2001.

THALLINGER, B., PRASETYO, E. N., NYANHONGO, G. S., GUEBITZ, G. M. (2013). **Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms.** Biotechnology Journal, 8, 97e109.

WIRTANEN, G., HUSMARK, U., MATTILA-SANDHOLM, T. **Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems.** Journal of Food Protection, v.59, n.7, p.727-733, 1996.