

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

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS,
ESCHERICHIA COLI E *CAMPYLOBACTER JEJUNI*: APLICAÇÃO DE
MODELAGEM PREDITIVA E ALTERNATIVAS PARA CONTROLE**

Autora: Daiane Carvalho

PORTO ALEGRE

2019

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

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS,
ESCHERICHIA COLI E *CAMPYLOBACTER JEJUNI*: APLICAÇÃO DE
MODELAGEM PREDITIVA E ALTERNATIVAS PARA CONTROLE**

Autora: Daiane Carvalho

**Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na Área de Medicina
Veterinária Preventiva - Sanidade Avícola**

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Daiane
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR SALMONELLA ENTERITIDIS,
ESCHERICHIA COLI E CAMPYLOBACTER JEJUNI: APLICAÇÃO DE
MODELAGEM PREDITIVA E ALTERNATIVAS PARA CONTROLE /
Daiane Carvalho. -- 2019.
162 f.
Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Adesão bacteriana. 2. Matadouros - frigoríficos
de aves. 3. Antimicrobianos. 4. Modelos matemáticos.
I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II.
Titulo.

Daiane Carvalho

FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e
Campylobacter jejuni: APLICAÇÃO DE MODELAGEM PREDITIVA E
ALTERNATIVAS PARA CONTROLE

Aprovada 29 MAR 2019

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da comissão

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Membro da comissão

Dr. Benito Guimarães de Brito
Membro da comissão

Dr. Thales Quedi Furian
Membro da comissão

Dedico esta tese aos meus pais, Maria e Alcides!

Isso tudo é por vocês e para vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades recebidas ao longo da minha caminhada e por me dar força e perseverança para seguir adiante, apesar das dificuldades.

Aos meus pais, Maria e Alcides, ao meu irmão, Thiago, e ao meu namorado, Rodrigo, por todo o apoio no decorrer destes quatro anos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, incentivando-me a estudar e nunca desistir dos meus sonhos! O amor de vocês foi fundamental para que eu concluísse mais esta etapa.

Ao meu orientador, professor Vladimir, agradeço imensamente pela oportunidade de trabalharmos juntos e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos professores Tadeu e Hamilton, meu eterno obrigada pelas conversas, conselhos e aprendizado, não só durante período do doutorado, mas ao longo de quase dez anos que estive no CDPA. Vocês sempre serão uma referência para mim!

Aos grandes amigos do CDPA, Karine, Dai Wilsmann., Bruna Emery, Hiran, Rafaela Menezes, Manu, Vivian, Renata, Carol e Elisar. Obrigada pelo companheirismo e por toda ajuda na execução dos experimentos. Sem vocês eu jamais teria conseguido! Agradeço também à Karen e ao Thales, pela amizade e por sua valiosa contribuição no desenvolvimento desta tese.

Aos meus irmãos de coração, Gabi e Gustavo, pela relação de cumplicidade e carinho que construímos ao longo dos anos. Vocês são essenciais na minha vida!

À professora Laura Beatriz Rodrigues, da Universidade de Passo Fundo, pelas grandes idéias que serviram de base para realização deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Porto Alegre, em especial ao Paulo Armendaris, pela contribuição nos experimentos com *C. jejuni*.

Ao Dr. Benito Guimarães de Brito, obrigada pela amizade e pelas grandes oportunidades que me foram dadas, dentro e fora do IPVDF.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código de financiamento 001 – e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro.

Por fim, agradeço à UFRGS e ao PPGCV, pela oportunidade de fazer toda minha pós-graduação em uma das universidades mais renomadas do Brasil.

RESUMO

Salmonella Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* são umas das principais causas de doenças transmitidas por alimentos, sendo a carne de frango considerada uma das principais fontes de infecção para o homem. No ambiente industrial, a formação de biofilme por estes microrganismos os torna mais resistentes aos processos de higienização, aumentando sua permanência nas plantas de processamento e favorecendo a contaminação do produto final. Neste contexto, este estudo teve por objetivo caracterizar fenotipicamente a formação de biofilmes mono e multiespécies por *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*, avaliar diferentes compostos antimicrobianos para prevenção e remoção do biofilme pré-formado, e aplicar a modelagem preditiva visando simular a adesão e a inativação de biofilmes multiespécies. A avaliação da formação de biofilme pela técnica de cristal violeta mostrou que das 33 cepas de *S. Enteritidis* testadas, 60% produziram biofilme a 25°C (temperatura ambiente), para *E. coli*, 41% formaram biofilme a 4°C (temperatura de refrigeração) e a 12°C (temperatura de sala de cortes e desossa) e para *C. jejuni*, 31,8% a 4°C, 12°C e a 25°C. Os ensaios de prevenção de biofilme em microplacas utilizando ácido cítrico, ácido málico e ramnolipídeo em diferentes concentrações demonstraram que todos estes compostos forneceram algum grau de prevenção a 4°C, 12°C e 25°C, independente do microrganismo. Da mesma forma, os ensaios de remoção utilizando, além dos ácidos orgânicos e do biosurfactante, o cloreto de benzalcônio, todos com cinco e dez minutos de contato, demonstraram boa atuação destas substâncias, sendo que no maior tempo de contato e nas maiores concentrações houve um melhor desempenho. De modo geral, cepas dos três microrganismos que aderiram isoladamente ao poliestireno das microplacas também o fizeram em superfícies de uso comum em matadouros – frigoríficos de aves (aço inoxidável e polietileno) sob a forma de biofilmes mono e multiespécie. Nos biofilmes multiespécie, com combinações das bactérias em duplas e em trio, *E. coli* apresentou maior capacidade de adesão, seguido de *S. Enteritidis* e, por último, *C. jejuni*, independente da superfície avaliada. Dos antimicrobianos testados por dez minutos nestes biofilmes formados a 4°C, 12°C e 25°C, o ácido cítrico demonstrou melhor eficácia na remoção, seguido do cloreto de benzalcônio. O tratamento com ramnolipídeo não demonstrou diferença em relação ao grupo controle. A partir dos dados gerados com os biofilmes multiespécies foi possível a obtenção de 47 modelos matemáticos com coeficiente de determinação significativo (R^2), destes 20 foram de adesão e 27 de inativação. Os dados obtidos neste estudo fornecem subsídios para que a indústria avícola crie programas de controle e erradicação de biofilmes, a fim de evitar o risco de contaminação do produto final.

Palavras – chave: adesão bacteriana, matadouros – frigoríficos de aves, antimicrobianos, modelos matemáticos

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Campylobacter jejuni are among the main causes of foodborne diseases, and the chicken meat is considered a major source of infection for humans. In the industrial environment, the biofilm formation by these microorganisms makes them more resistant to the hygiene processes, increasing their permanence in the processing plants and favoring contamination of the final product. In this context, this study aimed to characterize phenotypically monospecies and multispecies biofilms formed by S. Enteritidis, E. coli and C. jejuni; to evaluate different antimicrobial compounds for prevention and removal of formed biofilm; and applying the predictive modeling in order to simulate adhesion and the inactivation in multispecies biofilms. The evaluation of the biofilm formation by the violet crystal technique showed that of the 33 strains of S. Enteritidis tested, 60% produced biofilm at 25°C (room temperature), for E. coli 41% formed biofilm at 4°C (refrigeration temperature) and at 12°C (room temperature for cutting and deboning) and for C. jejuni 31.8% formed biofilm at 4°C, 12°C and 25°C. Biofilm prevention tests on microplates using citric acid, malic acid and rhamnolipid at different concentrations showed that all compounds provided some degree of prevention at 4°C, 12°C and 25°C, independent of the microorganism. Likewise, removal trials using benzalkonium chloride, in addition to organic acids and biosurfactant, with five and ten minutes of contact, showed good performance of these substances. The best result was obtained with ten minutes of contact and in the highest concentrations. In general, strains of the three microorganisms that adhered alone on polystyrene from microplates also adhered on surfaces commonly used in poultry slaughterhouses (stainless steel and polyethylene) in monospecies and multispecies biofilms. In the multispecies biofilms, with combinations of the bacteria in pairs and in trios, E. coli presented greater adhesion capacity, followed by S. Enteritidis and, finally, C. jejuni, independent of the evaluated surface. Of the antimicrobials tested for ten minutes in these biofilms formed at 4°C, 12°C and 25°C, the citric acid demonstrated a better removal efficiency, followed by benzalkonium chloride. Treatment with rhamnolipide did not show any difference in relation to the control group. From the data generated with the multispecies biofilms, it was possible to obtain 47 mathematical models with significant coefficient of determination (R^2), 20 of these models were adherence and 27 inactivation. The data obtained in this study provide subsidies for the poultry industry to create biofilm control and eradication programs, in order to avoid the risk of contamination of the final product.

Keywords: bacterial adhesion, poultry slaughterhouses, antimicrobials, mathematical models

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Percentuais de prevenção do biofilme de *Salmonella* Enteritidis a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (2%, 5% e 10%), ácido málico (2%, 5%, 10%) e ramnolipídeo (1%, 3%, 5%)..... 65
- Figura 2 -** Percentuais de prevenção do biofilme de *Escherichia coli* a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (2%, 5% e 10%), ácido málico (2%, 5%, 10%) e ramnolipídeo (1%, 3%, 5%)... 66
- Figura 3 -** Percentuais de prevenção do biofilme de *Campylobacter jejuni* a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (2%, 5% e 10%), ácido málico (2%, 5%, 10%) e ramnolipídeo (1%, 3%, 5%)..... 67
- Figura 4 -** Percentuais de remoção do biofilme de *Salmonella* Enteritidis formado a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (2%, 5% e 10%), ácido málico (2%, 5% e 10%), ramnolipídeo (1%, 3% e 5%) e cloreto de benzalcônio (50, 100 e 150 ppm) com cinco e dez minutos de contato..... 72
- Figura 5 -** Percentuais de remoção do biofilme de *Escherichia coli* formado a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (2%, 5% e 10%), ácido málico (2%, 5% e 10%), ramnolipídeo (1%, 3% e 5%) e cloreto de benzalcônio (50, 100 e 150 ppm) com cinco e dez minutos de contato..... 73
- Figura 6 -** Percentuais de remoção do biofilme de *Campylobacter jejuni* utilizando ácido cítrico (2%, 5% e 10%), ácido málico (2%, 5% e 10%), ramnolipídeo (1%, 3% e 5%) e cloreto de benzalcônio (50, 100 e 150 ppm) a 4°C, 12°C e 25°C com cinco e dez minutos de contato..... 74
- Figura 7 -** Comparação da adesão das cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* no poliestireno, aço inoxidável e polietileno através do método de contagem em placa (\log_{10} .UFC.cm⁻²)..... 76

Figura 8 -	Comparação da capacidade de adesão das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> considerando a mesma superfície através do método de contagem em placa (\log_{10} .UFC.cm ⁻²).....	77
Figura 9 -	Adesão da cepa de <i>Salmonella</i> Enteritidis no poliestireno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.....	77
Figura 10 -	Adesão da cepa de <i>Salmonella</i> Enteritidis no aço inoxidável observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.....	78
Figura 11 -	Adesão da cepa de <i>Salmonella</i> Enteritidis no polietileno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.....	78
Figura 12 -	Adesão da cepa de <i>Escherichia coli</i> no poliestireno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 2.000x.....	79
Figura 13 -	Adesão da cepa de <i>Escherichia coli</i> no aço inoxidável observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 2.000x.....	79
Figura 14 -	Adesão da cepa de <i>Escherichia coli</i> no polietileno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.....	80
Figura 15 -	Adesão da cepa de <i>Campylobacter jejuni</i> no poliestireno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 5.500x.....	80
Figura 16 -	Adesão da cepa de <i>Campylobacter jejuni</i> no aço inoxidável observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sumento 5.500x.....	81
Figura 17 -	Adesão da cepa de <i>Campylobacter jejuni</i> no aço polietileno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 5.500 x.....	81
Figura 18 -	Biofilme multiespécie de <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 1.800x; A2 Aumento	

	3.000x.....	83
Figura 19 -	Biofilme multiespécie de <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Campylobacter jejuni</i> formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 5.500x; A2 Aumento 10.000x.....	84
Figura 20 -	Biofilme multiespécie de <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Campylobacter jejuni</i> formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 5.500x; A2 Aumento 4.000x.....	85
Figura 21 -	Biofilme multiespécie de <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i> formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 5.500x; A2 Aumento 5.500x.....	86
Figura 22 -	Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> no aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.....	89
Figura 23 -	Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Campylobacter jejuni</i> no aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.....	92
Figura 24 -	Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> no aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.....	95
Figura 25 -	Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> no aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.....	99

Figura 26 - Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolípídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> no polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.....	100
Figura 27 - Modelos de predição de <i>Escherichia coli</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	104
Figura 28 - Modelos de predição de <i>Salmonella</i> Enteritidis (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	105
Figura 29 - Modelos de predição de <i>Escherichia coli</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	106
Figura 30 - Modelos de predição de <i>Salmonella</i> Enteritidis (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	107
Figura 31 - Modelos de predição de <i>Salmonella</i> Enteritidis (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Campylobacter jejuni</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	108
Figura 32 - Modelos de predição de <i>Campylobacter jejuni</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Campylobacter jejuni</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	109
Figura 33 - Modelos de predição de <i>Salmonella</i> Enteritidis (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Campylobacter jejuni</i> + <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	110
Figura 34 - Modelos de predição de <i>Campylobacter jejuni</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme	

	constituído por <i>Campylobacter jejuni</i> + <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	111
Figura 35 -	Modelos de predição de <i>Escherichia coli</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	112
Figura 36 -	Modelos de predição de <i>Campylobacter jejuni</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	113
Figura 37 -	Modelos de predição de <i>Escherichia coli</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	114
Figura 38 -	Modelos de predição de <i>Campylobacter jejuni</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	115
Figura 39 -	Modelos de predição de <i>Salmonella</i> Enteritidis (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	116
Figura 40 -	Modelos de predição de <i>Escherichia coli</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	117
Figura 41 -	Modelos de predição de <i>Campylobacter jejuni</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	118
Figura 42 -	Modelos de predição de <i>Salmonella</i> Enteritidis (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	119

Figura 43 -	Modelos de predição de <i>Escherichia coli</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	120
Figura 44 -	Modelos de predição de <i>Campylobacter jejuni</i> (\log_{10} UFC.cm ⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i>	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais modelos matemáticos utilizados para biofilmes.....	45
Tabela 2-	Frequência absoluta (%) e relativa (n/N) de cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis formadoras de biofilme a 25°C classificadas de acordo com a origem.....	59
Tabela 3-	Frequência absoluta (%) e relativa (n/N) de cepas de <i>Escherichia coli</i> formadoras de biofilme a 4°C e 12°C classificadas de acordo com a origem.....	60
Tabela 4-	Frequência absoluta (%) e relativa (n/N) de cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> formadoras de biofilme a 4°C, 12°C e 25°C classificadas de acordo com a origem.....	61
Tabela 5 -	Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C.	90
Tabela 6-	Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Campylobacter jejuni</i> em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C.....	93
Tabela 7-	Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C.....	96
Tabela 8-	Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis + <i>Escherichia coli</i> + <i>Campylobacter jejuni</i> em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C.....	101

Tabela 9 - Comparação da adesão de <i>S. Enteritidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. jejuni</i> sobre o aço inoxidável e polietileno considerando as diferentes combinações microbianas.....	102
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AC	Ácido cítrico
AM	Ácido málico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Ácido orgânico
APEC	<i>Avian pathogenic Escherichia coli</i>
APPCC	Análise de perigos e pontos críticos de controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	<i>Brain heart infusion broth</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
cm ²	Centímetro quadrado
CMM	Centro de Microscopia e Microanálise
CO ₂	Gás carbônico
DAEC	<i>Diffusely adherent Escherichia coli</i>
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DTA	Doenças transmitida por alimento
EAEC	<i>Enteraggregative Escherichia coli</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EHEC	<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EMB	<i>Eosin methylene blue agar</i>

EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
ExPEC	<i>Extraintestinal pathogenic Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSAI	<i>Food Safety Authority of Ireland</i>
g	Grama
GFN	<i>Global Foodborne Infections Network</i>
kV	Quilovolt
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mCCDA	<i>Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
N	Nitrogênio
n	Tamanho da amostra
N	Tamanho da população
nm	Nanômetro
NMEC	<i>Neonatal meningitis Escherichia coli</i>
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PPHO	Procedimento padrão de higiene operacional
QS	<i>Quorum sensing</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
STEC	<i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i>
SVS	Serviço de Vigilância em Saúde
TSA	<i>Tryptone soy agar</i>
TSB	<i>Tryptone soy both without dextrose</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

XLD *Xylose lysine desoxycholate agar*

XTT *2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) - 2H-tetrazolium-5-carboxanilide*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivo geral.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1	<i>Salmonella</i> Enteritidis.....	26
3.2	<i>Escherichia coli</i>.....	28
3.3	<i>Campylobacter jejuni</i>.....	30
3.4	Biofilmes bacterianos.....	32
3.5	Biofilmes na indústria de alimentos.....	34
3.5.1	Superfícies de adesão.....	37
3.5.2	Controle microbiológico de biofilmes através de procedimentos de higienização.....	38
3.5.3	Controle microbiológico através da temperatura.....	39
3.5.4	Métodos alternativos para controle do biofilme.....	40
3.5.4.1	Ácidos orgânicos.....	40
3.5.4.2	Biosurfactantes.....	42
3.6	Modelagem preditiva em microbiologia de alimentos.....	43
3.7	Principais métodos para avaliação dos biofilmes em superfícies abióticas.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	Local de estudo.....	48
4.2	Cepas bacterianas.....	48
4.3	Preparo do inóculo.....	48
4.4	Análises estatísticas.....	49
4.5	Experimento 1 - Formação de biofilmes monoespécie por <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> em microplacas de poliestireno.....	50
4.6	Experimento 2 - Prevenção e remoção de biofilmes monoespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> em microplacas de poliestireno.....	51
4.6.1	Avaliação da prevenção da formação do biofilme.....	52

4.6.2	Avaliação da remoção do biofilme pré-formado.....	52
4.6.3	Mensuração da prevenção e da remoção dos biofilmes.....	53
4.7	Experimento 3 – Comparação da capacidade de adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> em aço inoxidável, polietileno e poliestireno	53
4.7.1	Preparação das superfícies.....	54
4.7.2	Ensaio de adesão.....	54
4.7.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	55
4.8	Experimento 4 - Formação e remoção de biofilmes multiespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> em superfícies de matadouro-frigorífico de aves e desenvolvimento de modelagem preditiva.....	56
4.8.1	Formação dos biofilmes multiespécies.....	56
4.8.2	Remoção dos biofilmes multiespécies.....	57
4.8.3	Desenvolvimento de modelos matemáticos preditivos para os biofilmes multiespécies.....	58
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Experimento 1.....	59
5.2	Experimento 2.....	62
5.2.1	Ensaio de prevenção do biofilme	62
5.2.1.1	Ácido cítrico.....	62
5.2.1.2	Ácido málico.....	63
5.2.1.3	Ramnolípídeo.....	64
5.2.2	Ensaio de remoção do biofilme.....	68
5.2.2.1	Ácido cítrico.....	68
5.2.2.2	Ácido málico.....	69
5.2.2.3	Ramnolípídeo.....	70
5.2.2.4	Cloreto de benzalcônio.....	70
5.3	Experimento 3.....	76
5.4	Experimento 4.....	82
5.4.1	Biofilme multiespécies <i>S. Enteritidis</i> + <i>E. coli</i>	87
5.4.2	Biofilme multiespécies <i>S. Enteritidis</i> + <i>C. jejuni</i>	91
5.4.3	Biofilme multiespécies <i>E. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	94
5.4.4	Biofilme multiespécies <i>S. Enteritidis</i> + <i>E. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	97

5.4.5	Modelos de predição para os biofilmes multiespécies.....	102
6	DISCUSSÃO.....	122
6.1	Influência da temperatura e superfície na formação de biofilmes mono e multiespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i>.....	122
6.2	Uso de ácidos orgânicos, ramnolipídeo e cloreto de benzalcônio para controle do biofilme mono e multiespécie de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i>	126
6.3	Modelagem preditiva para biofilmes multiespécies de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i>.....	129
7	CONCLUSÕES.....	131
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	133
	REFERÊNCIAS.....	134
	APÊNDICE A – Identificação, fonte e ano de isolamento das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis avaliadas neste trabalho.....	154
	APÊNDICE B - Identificação e fonte de isolamento das cepas de <i>Escherichia coli</i>, isoladas entre 2002 e 2008, avaliadas neste trabalho.....	156
	APÊNDICE C – Identificação, fonte e ano de isolamento das cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> avaliadas neste trabalho.....	159
	APÊNDICE D – Identificação (bacterioteca CDPA) das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> e <i>Campylobacter jejuni</i> utilizadas nos experimentos 2, 3 e 4.....	162

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2017 a avicultura reafirmou-se como um dos setores de maior importância para a economia do Brasil. Com uma produção de cerca de 13 milhões de toneladas de carne de frango, o país destacou-se como o segundo maior produtor mundial, somente atrás dos Estados Unidos. Deste total, aproximadamente 33% da produção foram destinados ao mercado externo, consolidando o Brasil como o maior exportador desta *commoditie* (ABPA, 2018). Este elevado crescimento faz com que o setor venha buscando melhorias nos índices produtivos. Neste contexto, a preocupação com a sanidade dos plantéis e, conseqüentemente, com a inocuidade dos produtos destinados ao consumidor, passa a ser uma constante.

É conhecido que os produtos avícolas representam uma das principais fontes de infecção de *Salmonella* Enteritidis e de *Campylobacter jejuni* para humanos (EPPS *et al.* 2013; ANTUNES *et al.*, 2016; TARABEES *et al.*, 2017; ARGYRI *et al.*, 2018; HULANKOVA *et al.*, 2018). Além disso, alguns estudos sugerem que cepas de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) podem apresentar potencial zoonótico, sendo transmitidas ao homem através da carne de frango (MELLATA, 2013; MITCHELL *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015). A capacidade destes três microrganismos em formar biofilmes nas mais diversas superfícies encontradas na indústria avícola, como o aço inoxidável e polímeros, sob uma ampla faixa de temperatura (4°C a 42°C), tem sido abordada por diversos pesquisadores ao longo dos anos (SKYBERG *et al.*, 2007; TATCHOU-NYAMSI-KÖNIG 2008; FURUKAWA *et al.*, 2010; TEH *et al.*, 2014; GEHLEN, 2016; GOMES-CARRETERO *et al.*, 2017; MERINO *et al.*, 2019; ROSSI *et al.*, 2017; SERENO *et al.*, 2017; BORGES *et al.*, 2018). Em função destes patógenos serem encontrados isoladamente ou em conjunto em uma mesma superfície ou produto, existe a real possibilidade da interação entre eles através da formação de biofilmes multiespécies. Contudo, a relação e a interação entre *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli* na constituição dos biofilmes é pouco estudada.

A fim de promover o controle microbiológico e prevenir a adesão bacteriana, plantas de processamento são rotineiramente submetidas a procedimentos de limpeza e de desinfecção. No entanto, estudos demonstram que bactérias em biofilmes podem ser 100 vezes mais resistentes aos antimicrobianos em relação a sua forma planctônica (COS *et al.*, 2010; SIMÕES, 2011; AKBAS, 2015). Além disso, a toxicidade, a

corrosão e a contaminação do produto final poderia limitar o uso dos desinfetantes comerciais comumente empregados (SUNDHEIM *et al.*, 1998; LANGSRUD *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2011). Atualmente, compostos derivados de fontes naturais e com atividade antimicrobiana têm atraído a atenção devido ao seu *status* de seguro, como é o caso dos ácidos orgânicos e dos biosurfactantes, os quais já demonstraram serem eficazes no controle de biofilme na indústria de alimentos frente aos mais distintos microrganismos (GOMES; NITSCHKE, 2012; RIVARDO *et al.*, 2012; AKAR *et al.*, 2013; AKBAS; KOKUMER, 2015).

O desenvolvimento de um biofilme, bem como o seu controle, são processos complexos e influenciados por uma série de fatores biológicos, químicos e ambientais. Atualmente, com o intuito de promover um melhor entendimento da fisiologia microbiana, bem como sua interação com fatores críticos, como tempo e temperatura, modelos matemáticos preditivos vem sendo desenvolvidos. O emprego desta ferramenta no estudo de biofilmes tem obtido bons resultados, permitindo prever o fenômeno de formação e de remoção dos biofilmes mono e multiespécies, considerando-se variáveis como tempo, temperatura e ação de diferentes tratamentos para seu controle (BERNARDES, 2008; HORN; LACKNER, 2014; ZHANG, 2017).

Em relação ao exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a formação de biofilmes por *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* mono e multiespécie, e avaliar diferentes compostos antimicrobianos para a remoção e o controle da formação do biofilme constituído por estes microrganismos, bem como a aplicação de modelagem preditiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotipicamente a formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campyobacter jejuni*, avaliar diferentes compostos antimicrobianos para prevenção e remoção do biofilme já formado, e aplicar a modelagem preditiva visando simular a adesão e a inativação de biofilmes multiespécies.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de adesão e de formação de biofilme por cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em microplacas de poliestireno a 25°C, 12°C e 4°C em biofilmes monoespécie.
- Avaliar a eficácia de um biosurfactante (ramnolipídeo) e de dois ácidos orgânicos (cítrico e málico) em diferentes concentrações na prevenção da formação de biofilmes monoespécies de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em microplacas de poliestireno incubadas a 25°C, 12°C e 4°C.
- Avaliar a eficácia de um biosurfactante (ramnolipídeo), de dois ácidos orgânicos (cítrico e málico) e de um desinfetante a base de amônia quarternária (cloreto de benzalcônio) em diferentes concentrações e em diferentes tempos de contato na remoção de biofilmes monoespécies de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em microplacas de poliestireno incubadas a 25°C, 12°C e 4°C.
- Avaliar se as cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*, com capacidade de formação de biofilme no poliestireno, são também aptas a formar biofilme em superfícies encontradas em plantas de processamento de aves, como aço inoxidável e polietileno.
- Avaliar o comportamento de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* na formação de biofilmes multiespécies a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação em superfícies de aço inoxidável e de polietileno.
- Verificar a eficácia do biosurfactante (ramnolipídeo), de um dos ácidos orgânicos (o mais eficaz na remoção dos biofilmes monoespécie) e do desinfetante a base de amônia quarternária (cloreto de benzalcônio) na remoção do biofilme multiespécie,

utilizando-se as concentrações e o tempo de contato que se mostraram mais eficazes na remoção do biofilme monoespécie.

- Elaborar modelos matemáticos preditivos visando simular a adesão e a inativação de biofilmes multiespécies de *E. coli*, *S. Enteritidis* e *C. jejuni* em aço inoxidável e polietileno, considerando as variáveis tempo, temperatura e combinação microbiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella é um bastonete Gram-negativo, aeróbio ou anaeróbio facultativo e não formador de esporos, sendo em sua grande maioria móveis com flagelos peritríquios. Seu habitat natural é o trato intestinal dos humanos e dos animais (BERCHIERI JR; FREITAS NETO, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As salmonelas apresentam temperatura de crescimento entre 4°C e 45°C, com temperatura ótima entre 35°C e 37°C. Além disso, podem sobreviver e desenvolver-se em ambientes com variação de pH entre 3,0 e 9,4 (BHUNIA, 2008; KEERTHIRATHNE *et al.*, 2016). Esta bactéria pertence à família *Enterobacteriaceae* e são conhecidas duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*; *S. enterica* subsp. *salamae*; *S. enterica* subsp. *arizonae*; *S. enterica* subsp. *diarizonae*; *S. enterica* subsp. *houtenae* *S. enterica* subsp. *indica*. O grupo *S. enterica* subsp. *enterica* contempla tanto salmonelas associadas aos mamíferos quanto às aves. Em 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares de *Salmonella* através do esquema de Kauffmann-White-LeMinor (GRIMONT; WEILL, 2007; MALORNY; HAUSER; DIECKMANN, 2011).

Nas aves, as salmoneloses classificam-se em três grupos, conforme epizootiologia e patogenicidade dos diferentes sorovares. No grupo um estão incluídas *Salmonella* Galinarum e *Samonella* Pullorum, as quais causam, respectivamente, o tifo aviário e a pulorose. Ao grupo dois pertencem as *S. enterica* subsp. *enterica*, móveis e do tipo paratíficas, excluindo-se *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, e são responsáveis por causar o paratifo aviário. Este grupo dificilmente causa doença clínica em aves, mas tem potencial de causar gastroenterites em humanos. No grupo três estão os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, que dificilmente causam problemas em aves, mas são relacionados à grande maioria de surtos de salmonelose em humanos (BACK, 2010a).

Considerando que aves e produtos avícolas são a principal fonte de *Salmonella* para humanos, e que alguns sorovares são responsáveis por causar muitos prejuízos à avicultura, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou em 2003 o Plano Nacional de Sanidade Avícola (Instrução normativa nº 78 de 03/11/2003, modificada pela Instrução normativa nº 41 de 04/12/2017). Dentro deste programa, preconiza-se que os planteis devem ser livres para *S. Galinarum* e *S. Pullorum* e livres

ou controlados para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 2003; BRASIL 2017). Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução da diretoria colegiada (RDC) n° 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece como padrão microbiológico para carne de frango ausência de *Salmonella* sp. em 25g do produto (BRASIL, 2001).

Em aves jovens, o sorovar *S. Enteritidis* pode causar diarreia, desidratação, redução no consumo de alimentos, desuniformidade, empastamento da cloaca e amontoamento próximo a fonte de calor. Em aves adultas, geralmente a infecção é inaparente, mas algumas cepas podem causar anorexia, diarreia e redução na produção de ovos (GAST, 2008; BACK, 2010a).

Infecções por *Salmonella* em humanos são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO) afirma que *Salmonella* é responsável por um em cada quatro casos de diarreia no mundo (WHO, 2018). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) estima que ocorram 1,2 milhões de casos de salmonelose todos os anos, levando a 23 mil hospitalizações e 450 mortes. Os sorovares mais comumente associados às doenças transmitidas por alimentos (DTA) são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (CDC, 2018). Segundo dados da Autoridade em Segurança dos Alimentos da Europa (*European Food Safety Authority* – EFSA), mais de 100 mil casos de salmonelose são reportados em humanos todos os anos, ocasionando custos de mais de três bilhões de euros por ano. Em 2017, *Salmonella* foi a causa mais comum de DTA, sendo os produtos cárneos e os ovos as principais fontes de infecção. Além disso, *S. Enteritidis* é o sorovar mais associado à salmonelose, causando um em cada sete surtos de origem alimentar (EFSA, 2018). Ainda, de acordo com informações da Rede Global de Infecções por Alimentos (*Global Foodborne Infections Network* - GFN) da WHO, *S. Enteritidis* esteve em primeiro lugar em um ranking de 15 sorotipos mais isolados em humanos, animais e alimentos, no ano de 2014 na Europa (WHO, 2016).

No Brasil, um levantamento do Serviço de Vigilância em Saúde (SVS) apontou *Salmonella* spp. como sendo responsável por 525 casos dos mais de 1800 surtos alimentares que foram causados por bactérias entre os anos de 2007 e 2017. Contudo, destaca-se que durante este mesmo período, cerca de 66% dos alimentos incriminados nos surtos tiveram registro ignorado ou inconclusivo (BRASIL, 2017). No Rio Grande do Sul, *S. Enteritidis* foi o sorovar causador da maioria das salmoneloses alimentares

investigadas pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), entre 2007 e 2014 (BRASIL, 2014). Pode-se considerar ainda que há uma forte associação entre os surtos alimentares com contaminações cruzadas e tratamento térmico inadequado, principalmente em residências, restaurantes e padarias (BRASIL, 2014).

3.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bastonete Gram-negativo, possui metabolismo aeróbio e fermentativo, atuando também como anaeróbio facultativo. Esta bactéria pertence à família *Enterobacteriaceae* e é parte integrante da microbiota intestinal dos mamíferos e das aves (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Atualmente são conhecidos seis patótipos de *E. coli* patogênica intestinal: EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*), ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*), EIEC (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*), EAEC (*Enteraggregative Escherichia coli*), STEC/EHEC (*Shiga toxin-producing Escherichia coli/ Enterohemorrhagic Escherichia coli*) e DAEC (*E. coli* difusamente aderente) (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Há também o grupo de *E. coli* com patogenicidade extra intestinal (*Extraintestinal pathogenic Escherichia coli* - ExPEC). Dentro deste grupo estão cepas de *E. coli* conhecidas como UPEC (*UroPathogenic Escherichia coli*), NMEC (*Neonatal meningitis Escherichia coli*) e APEC (*Avian pathogenic Escherichia coli*) (RUSSO; JOHNSON, 2000; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Nas aves, cepas APEC são responsáveis por vários processos patológicos, atuando como agente primário ou secundário no desenvolvimento de aerossaculite, colisepticemia, pericardite, perihepatite, peritonite, salpingite, onfalite, sinovite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada e celulite (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Estas lesões são responsáveis por um elevado número de condenações em matadouros-frigoríficos de aves todos os anos (FERREIRA; SESTERHENN; KINDLEIN, 2012). Além disso, o vazamento de conteúdo intestinal ou contaminação externa proveniente dos animais que entram na linha de abate favorece a contaminação de carcaças com o conteúdo fecal, causando grandes transtornos à indústria. Outro agravante é a comprovação da capacidade de cepas de *E. coli* em formar biofilmes em superfícies onde ocorre processamento de carnes (GIAOURIS *et al.*, 2015).

Aslam *et al.* (2014) identificaram uma grande similaridade genética entre isolados de *E. coli* provenientes de carcaça de frangos e perus com cepas ExPEC de humanos. Não obstante, outros trabalhos também tem demonstrado o compartilhamento de genes entre cepas APEC e grupos de *E. coli* de importância para saúde pública. Em razão disso, sugere-se o potencial zoonótico das cepas aviárias (JOHNSON *et al.*, 2007; MITCHELL *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Dados da Organização Mundial da Saúde evidenciaram que *E. coli* está entre as quatro principais causas de surtos alimentares no mundo (WHO, 2017a). No Brasil, este patógeno foi responsável por 565 casos de DTA entre 2007 e 2017, sendo o principal agente etiológico bacteriano envolvido (BRASIL, 2017). Contudo, a identificação do sorotipo geralmente não é realizada, principalmente porque a metodologia para caracterização sorológica não está implementada na maioria dos laboratórios centrais (PAULA *et al.*, 2014).

Dentre os sorotipos de *E. coli* mais importantes e com maior casuística nos últimos anos, o O157:H7 assume um papel de grande importância. Os sinais clínicos observados são uma forte gastroenterite hemorrágica, além da síndrome urêmica hemolítica e trombocitopenia trombótica púrpura (FORSYTHE, 2013). Surtos relacionados a este patógeno ocorrem principalmente pela ingestão de carne bovina crua ou cozida insuficientemente. Contudo, já foi relatado o isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de carne de frango e suabe cloacal (DOYLE; SCHOENI, 1987; HESSAIN *et al.*, 2015; GURAN *et al.*, 2017). Silagyi *et al.* (2009) realizaram um estudo avaliando a capacidade de cepas de *E. coli* O157:H7 em aderir a superfícies de ambientes de processamento de alimento, incluindo em aço inoxidável. A presença da bactéria nestas superfícies pode levar à contaminação de produtos cárneos (aves, suíno e bovino).

De forma geral, todos os patótipos patogênicos de *E. coli* intestinais são potenciais causadores de gastroenterites em humanos. Por exemplo, o patótipo ETEC tem sido associado a quadros de diarreia do viajante, e é a maior causa de doenças diarreicas em países subdesenvolvidos. A principal fonte de infecção para o homem é pela contaminação de alimentos com fezes de animais ou de humanos (CDC, 2014).

E. coli também é um importante microrganismo indicador em programas de autocontrole microbiológico em matadouros-frigoríficos de aves, bovinos e suínos, principalmente nos Estados Unidos. No Brasil, a ANVISA, estabelece que, para carne de frango, o limite aceitável de coliformes não deve ser superior a 10^4 UFC/g (RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001) (BRASIL, 2001). No entanto, em 2018 foi colocado em

consulta pública um documento que propõe novos padrões microbiológicos para alimentos, reduzindo este limite para 5×10^3 UFC/g na carne e em miúdos de frango (ANVISA, 2018).

3.3 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter é um pequeno bacilo Gram-negativo (0,2 a 0,9 μm de largura e 0,5 a 5 μm de comprimento) em forma de asa de gaivota. Possui um único flagelo polar, o que lhe confere o movimento de saca-rolha. Caracteriza-se por ser um microrganismo microaerófilo estrito, necessitando de uma atmosfera com 5% de O_2 , 10% de CO_2 e 85% de N para se desenvolver, além de apresentar crescimento fastidioso. Bactérias deste gênero são sensíveis ao calor, à dessecação, aos desinfetantes e não formam esporos. Grande parte das cepas produz a enzima oxidase, e podem ou não produzir catalase. Geralmente, os isolados catalase positiva estão relacionados a casos clínicos em humanos (MEDEIROS, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Em cultivos mais antigos ou em condições de estresse, *Campylobacter* apresenta-se sob a forma cocóide degenerativa, tornando a bactéria em um estado viável (infectante), porém não cultivável (RAMAMURTHY *et al.*, 2014).

As espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* pertencem ao grupo das bactérias termofílicas e seu crescimento ocorre em temperaturas entre 41°C e 43°C. *C. jejuni* e *C. coli* são as espécies mais comumente isoladas em casos de gastroenterites em humanos (ROSSI JÚNIOR; BERCHIERI JÚNIOR; FELIPE, 2009; MEDEIROS, 2011). Antes de se ter conhecimento a respeito de suas exigências para cultivo em laboratório, não eram considerados microrganismos patogênicos importantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Atualmente, o uso de meios seletivos específicos para o isolamento de *Campylobacter*, além de técnicas moleculares, tem facilitado o estudo deste patógeno.

Campylobacter é encontrado como habitante da microbiota intestinal de aves, suínos, bovinos, animais silvestres e de estimação. Em aves, bactérias deste gênero podem causar uma enterite leve, na maioria das vezes sem sinais clínicos, lesões ou interferência no desempenho. Contudo, o principal motivo pelo qual se preconiza o controle deste patógeno em aves, é para reduzir os riscos de infecção em humanos (BACK, 2010b; NEWELL *et al.*, 2017). Na cadeia avícola, o risco de colonização do intestino das aves por *Campylobacter* ocorre desde a entrada do pintinho na granja até o

transporte das aves adultas ao matadouro-frigorífico. Dentro deste processo, as fontes de infecção para as aves podem ser a água, a cama do aviário, as aves silvestres, os insetos e as caixas utilizadas no transporte dos animais até o frigorífico. Além disso, os trabalhadores da granja podem carrear ou introduzir a bactéria no lote (SILVA *et al.*, 2011; NEWELL *et al.*, 2017).

O fato de a ave chegar para o abate carreando patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter* eleva as chances de contaminação de equipamentos durante o processamento. Pesquisas com genotipagem de *Campylobacter* já verificaram a similaridade genética entre cepas encontradas no intestino das aves e em amostras do produto final que será disponibilizado ao consumidor (ROSSI *et al.*, 2016). Apesar de todos os esforços visando reduzir o nível de contaminação nos matadouros-frigoríficos, como os processos de escaldagem, de higienização das superfícies e dos equipamentos e de resfriamento e congelamento, o produto final ainda é tido como potencial fonte de infecção para o homem (ATANASSOVA *et al.*, 2007; BERRANG *et al.*, 2007).

Na Europa, o regulamento da comissão (EU) 2017/1495 de 23 de agosto de 2017 estabeleceu padrões microbiológicos para *Campylobacter* spp. em carcaças de frango. De acordo com este documento, até 2020, para uma amostragem de 50 carcaças coletadas após o *chiller*, será permitido no máximo 20 positivas, com limite de 10^3 UFC/g. A expectativa é que este número de amostras positivas seja reduzido para 15 a partir de 2020, e para 10, a partir de 2025 (FSAI, 2017). No Brasil, ainda não há legislação que estabeleça padrões microbiológicos para *Campylobacter* sp. em alimentos.

Segundo informações do CDC, *Campylobacter* é uma das principais causas de doenças diarreicas nos EUA. A rede de vigilância americana (FoodNet) afirmou que a cada ano são diagnosticados cerca de 14 casos de campilobacteriose por 100 mil habitantes. Considerando os casos não notificados da doença, estima-se que mais de 1,3 milhões de pessoas sejam acometidas a cada ano, levando a aproximadamente 76 óbitos (CDC, 2017). Na Europa, a campilobacteriose acomete cerca de 190 mil pessoas a cada ano, mas se estima que este número seja maior, próximo a nove milhões. Do total de casos na Europa, cerca de 20 a 30% está relacionado aos produtos avícolas, principalmente à carne de frango. O custo da doença é de 2,4 bilhões de euros por ano, considerando os custos com tratamento e também pela perda de produtividade do paciente (EFSA, 2016). *Campylobacter*, juntamente com *Salmonella* e *E. coli*, são umas das causas mais comuns de DTA no mundo (WHO, 2017b).

No Brasil, entre 2000 e 2015, o Ministério da Saúde reportou 37 casos de campilobacteriose resultantes de cinco surtos. Cabe ressaltar, no entanto, que durante este mesmo período, menos da metade das DTA tiveram agente etiológico identificado (BRASIL, 2015). A baixa incidência de campilobacteriose no Brasil pode ser consequência da ineficiência dos programas de vigilância, o que pode levar a uma subnotificação dos casos. Outra possível explicação para estes dados, é que crianças em países em desenvolvimento podem ser expostas ao *Campylobacter* nos primeiros anos de vida, podendo levar estes indivíduos a produzir anticorpos específicos contra o patógeno, reduzindo o risco da doença na fase adulta (SILVA *et al.*, 2015).

Além das gastroenterites, a infecção por *C. jejuni* pode ter consequências mais graves, como a Síndrome de Guillian-Barré, uma polineuropatia aguda imunomediada que causa lesões na bainha de mielina, provocando artrites ou paralisia temporária, podendo levar ao óbito (ALLOS *et al.*, 1998; EFSA, 2011; NYATI; NYATI, 2013).

3.4 Biofilmes bacterianos

Biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos envoltos por uma substância polimérica extracelular (*extracellular polymeric substance* - EPS) aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON, 1995; JAMAL *et al.*, 2015). A fração de EPS corresponde a biopolímeros de origem microbiana, principalmente polissacarídeos, além de uma variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolípídeos e ácidos nucleicos. Todas estas substâncias conferem estabilidade mecânica ao biofilme, facilitam a adesão a superfícies e formam uma rede coesa e tridimensional, a qual interconecta e imobiliza o biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010; LAWRENCE; NEU, 2010).

A formação de biofilmes ocorre a partir de uma sequência de eventos. Inicialmente há a adesão das células planctônicas de maneira reversível a uma superfície que proporcione o adequado crescimento (estágio I), seguido de ligação irreversível das bactérias, as quais passam a formar microcolônias na matriz de EPS (estágio II). Progressivamente, as microcolônias se expandem e essa confluência leva a um fenótipo mais estruturado com espaços não colonizados (estágio III). Após, estes espaços não colonizados são preenchidos com bactérias, cobrindo toda a superfície (estágio IV) e possibilitando a visualização tridimensional do biofilme (estágio V). Por fim, as bactérias dispersam da estrutura sésil e retornam ao seu estado planctônico, podendo

colonizar outras superfícies (estágio VI) (LANDINI *et al.*, 2010; SREY; JAHID; HA, 2013).

Muitas das pesquisas envolvendo biofilmes tratam de comunidades microbianas constituídas por apenas uma espécie. Contudo, é cada vez mais claro que biofilmes mistos prevalecem na natureza, sendo muito mais complexos em suas inter-relações. Por isso, resultados *in vitro* obtidos de uma monocultura podem ser imprecisos e não representar a realidade. Nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas com biofilmes multiespécies, considerando-se estas comunidades como uma única unidade, a fim de se obter o completo entendimento das consequências das interações entre os diferentes tipos de microrganismos (BURMØLLE *et al.*, 2014).

Considerando que os biofilmes são comunidades de microrganismos, a comunicação entre eles é de grande importância. Consequentemente, as bactérias presentes nestas comunidades utilizam um sistema de comunicação chamado de *quorum sensing* (QS). QS é a habilidade de uma bactéria em detectar informações ou sinais de outras células em uma população, quando atingem a densidade crítica, ou seja, um *quorum*. Os biofilmes multiespécies iniciam a partir da adesão de um microrganismo dominante, e, através da sinalização emitida via QS, ocorre a adesão ao biofilme pré-formado. A maneira como ocorre a interação entre os microrganismos em um biofilme multiespécie tem papel fundamental no desenvolvimento da comunidade, uma vez que pode favorecer a evolução de determinadas espécies, tornando-as mais resistentes a condições adversas. Um exemplo é o fato de que microrganismos das camadas mais superficiais consomem o oxigênio (aeróbios), favorecendo o desenvolvimento e manutenção das células que necessitam de um ambiente com pouco oxigênio (microaerófilos ou anaeróbios) (HANSEN *et al.*, 2007; ELIAS; BANIN, 2012; YANG *et al.*, 2011). As interações interespécies podem promover aumento da tolerância aos antimicrobianos, elevar a virulência no caso de infecções e melhorar a degradação de compostos orgânicos, quando comparado às monoculturas (STEENACKERS *et al.*, 2012; OGLESBY-SHERROUSE *et al.*, 2014; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016). O efeito de proteção conferido pelo biofilme pode ser explicado por diversos fatores, dentre eles mudanças estruturais, redução nas taxas de difusão de substâncias na matriz, alterações no padrão de expressão gênica, diminuição das taxas de crescimento e multiplicação bacteriana (BURMØLLE *et al.*, 2014).

Uma comunidade microbiana complexa é caracterizada por relações interespecíficas de cooperação e/ou competição. Como exemplos de uma relação de

cooperação há o cometabolismo (produção ou remoção de metabólitos por uma espécie permitindo o crescimento de outra), coagregação (ligação célula-célula entre diferentes espécies) e transferência horizontal de genes (DNA plasmidial é transferido de uma espécie à outra via conjugação). Por outro lado, a disputa por nutrientes e a produção de substâncias por uma espécie que afete negativamente outra, caracterizam uma competição (BURMØLLE *et al.*, 2014).

Entre as interações microbianas mais estudadas, podem-se enfatizar os biofilmes constituídos por *Staphylococcus aureus* e *Candida Albicans* e *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, os quais estão geralmente associados a quadros crônicos de infecção em humanos. Há também biofilmes benéficos, responsáveis pela degradação de compostos orgânicos e inorgânicos durante o tratamento de águas poluídas e em processos de biorremediação, como é o caso dos biofilmes formados por *Burkholderia* sp. e *P. aeruginosa* (BURMØLLE *et al.*, 2014).

3.5 Biofilmes na indústria de alimentos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a contaminação do alimento pode ocorrer durante qualquer etapa do seu processamento, ou seja, desde a sua produção até o consumo. Esta questão assume ainda maior importância ao se considerar que muitos patógenos de relevância em saúde pública são transmitidos pelos alimentos. Um levantamento constatou que as DTA causaram cerca de 1000 surtos notificados entre 1996 e 2010, com uma projeção de 48 milhões de doentes, 128 mil hospitalizações e três mil mortes nos Estados Unidos por ano (SCALAN *et al.*, 2011). Além disso, já foram relatados surtos cujas causas foram patógenos associados a biofilmes (SREY; JAHID; HA, 2013).

Na indústria, os locais para formação de biofilme dependem da finalidade da planta de processamento, mas podem incluir água, leite e outros oleodutos líquidos, placas pasteurizadoras, membranas de osmose reversa, mesas, luvas de funcionários, carcaças de animais, superfícies de contato (plásticos, vidro, metal, madeira), silos de armazenamento de matérias-primas e aditivos, tubos de distribuição e material de embalagem. A presença do biofilme em carnes cruas, superfícies, ferramentas e utensílios oferecem problemas de contaminação cruzada e contaminação pós-processamento. Por esta razão, todo material que tenha contato com os alimentos deve ser higienizado frequentemente. Contudo, sabe-se que os microrganismos na forma de

biofilme são muito mais resistentes a situações de estresse comumente encontradas nos ambientes industriais (refrigeração, acidificação, sanificação e desinfecção). Por este motivo, a presença de biofilmes na indústria de processamento de pescado, leite, aves e carnes em geral passou a ser um grande problema, uma vez que pode levar à deterioração do produto e à perda das propriedades organolépticas. (HARVEY; KEENAN; GILMOUR, 2007; SOFOS; GEORNARA; 2010; PEÑA, 2010; GIAOURIS *et al.*, 2013; SADEKUZZAMAN *et al.*, 2015; GALIÉ *et al.*, 2018).

A presença de grande quantidade de matéria orgânica propicia a formação de biofilme nas indústrias alimentícias. Por exemplo, nas plantas de processamento de produtos lácteos, os processos e a estrutura utilizados (tanques de leite, tubulações, pasteurizadores, centrífugas de manteiga, tanques de queijo e ferramentas de embalagem) agem como substratos para a adesão de diferentes microrganismos em diferentes temperaturas. Estes biofilmes podem incluir a *Pseudomonas* spp. (psicrófilo) e *Geobacillus stearothermophilus* (termófilo). Na indústria de pescado, a presença de biofilmes formados por *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica* ou *Vibrio* spp. são um problema econômico e de saúde pública.

Na indústria avícola, a formação de biofilmes bacterianos pode ocorrer tanto em superfícies de processamento da carne de frango, quanto na própria carne. Diversos estudos têm pesquisado o desenvolvimento e a propagação destes biofilmes, bem como possíveis formas de prevenção e controle (SREY *et al.*, 2013; GIAOURIS *et al.*, 2015). Dentre os patógenos com capacidade para formar biofilmes que possuem relevância para a avicultura e saúde pública, destacam-se *Salmonella* spp., *E. coli* e *C. jejuni* (BELOIN; GHIGO, 2005; REESER, *et al.*, 2007; SKANDAMIS *et al.*, 2009; TEH; FLINT; FRENCH, 2010; STEENACKERS *et al.*, 2010; BRONNEC *et al.*, 2016).

Salmonella enterica é capaz de aderir a carnes e a outras matrizes alimentares facilmente, podendo levar a surtos associados a produtos avícolas. Já foi descrito que 50% a 100% dos isolados de *Salmonella* provenientes de ambientes avícolas tem capacidade de formar biofilmes (MARIN; LAINEZ, 2009; LAMAS *et al.*, 2018). Uma das principais fontes de contaminação por *Salmonella* é o biofilme formado nas estruturas utilizadas na fabricação de alimentos pré-cozidos, como o frango pré-cozido. Este processo provocou surtos de DTA que afetaram mais de duas mil pessoas na Espanha em 2005 (EUROSURVEILLANCE, 2005; GALIÉ *et al.*, 2018). Também já foi descrita a adesão de cepas de *S. Enteritidis* em temperaturas (3°C e 12°C) e superfícies (borracha, poliuretano e aço inoxidável) comumente encontradas nos

ambientes de processamento de carne de frango (CHIA *et al.*, 2009; ABDALLAH *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; BORGES *et al.*, 2018).

Assim como em outras espécies bacterianas, a formação de biofilme por *C. Jejuni* em superfícies de contato com alimentos, pode contribuir para sua persistência fora do hospedeiro. Em condições *in vitro*, biofilmes monoespécie deste patógeno já foram descritos no aço inoxidável, vidro e diferentes tipos de polímeros, como o poliestireno (JOSHUA *et al.*, 2006; SANDERS; FRANK; ARNOLD, 2008; HANNING; JARQUIN; SLAVIK, 2008; GUNTHER; CHEN 2009; LAMAS *et al.*, 2018). A viabilidade de *C. Jejuni* também já foi demonstrada em biofilmes constituídos por cinco outras espécies, como *S. Agona*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Estudos já demonstraram que a sobrevivência desta bactéria é favorecida em biofilmes mistos em comparação aos monoespécie, principalmente quando as condições ambientais não são favoráveis ao seu crescimento (TEH; FLINT; FRENCH, 2010; ICA *et al.*, 2012; TEH; LEE; DYKES, 2014). Porém, a maioria dos estudos avaliando a adesão de cepas de *Campylobacter* é realizada em condições de microaerofilia e em temperaturas superiores a 30°C, o que não representa de forma apropriada os parâmetros ambientais. Desta forma, a habilidade deste microrganismo em formar biofilme nos locais de processamento de alimentos ainda não é bem elucidada (TEH; LEE; DYKES, 2014).

A capacidade de adesão de cepas APEC já foi demonstrada por alguns autores. Peng *et al.* (2018) e Nielsen *et al.* (2018) evidenciaram a capacidade de adesão destes isolados em microplacas de poliestireno a 37°C através da técnica de cristal violeta. Rodrigues *et al.*, (2010) constataram uma produção de biofilme de fraca a moderada a 37°C em cepas provenientes de matadouro-frigorífico após higienização. Da mesma forma, Gehlen (2016) demonstrou a capacidade de adesão de *E. coli* originárias de plantas de processamento a 4°C, 12°C e 25°C no aço inoxidável, polietileno e poliuretano em biofilmes multiespécies com *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. No entanto, cabe enfatizar que estudos com biofilme avaliando isolados de *E. coli* provenientes de aves ou de plantas de processamento avícola, bem como avaliando superfícies e temperaturas encontradas nestes ambientes, são pouco frequentes.

3.5.1 Superfícies de adesão

O mecanismo de adesão de microrganismos a superfícies bióticas ou abióticas ocorre de forma natural em meios aquosos. Em matadouros-frigoríficos, a inadequada higienização das superfícies e a presença de água favorecem a formação de biofilmes. Da mesma forma, interações de hidrofobicidade entre a célula bacteriana e a superfície, características da superfície (rugosidade, estabilidade físico-química, resistência a corrosão), fatores ambientais (pH, temperatura, osmolaridade, nível de O₂ e nutrientes) e a presença de outras bactérias também podem afetar a adesão microbiana (GIAOURIS *et al.*, 2013).

Do ponto de vista de segurança dos alimentos, qualquer superfície que venha a ter contato com o alimento deve ser suave, impermeável, livre de rachaduras ou ranhuras, não porosa, não absorvente, não suscetível à contaminação ou não contaminante, não reativa, resistente à corrosão, durável e lavável. Além disso, não deve ser tóxica ou conter metais pesados (SCHMIDT; ERICKSON, 2005). Tendo em vista estas características, os materiais mais utilizados na indústria são o aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro (ANDRADE, 2008). Contudo, o intenso uso destas superfícies ocasiona desgastes e o acúmulo de sujidades, favorecendo a adesão de microrganismos (HOLAH; THORPE, 1990).

O aço inoxidável é um dos materiais mais utilizados na indústria e no ambiente doméstico. Suas vantagens em relação a outras superfícies são a resistência à corrosão, dureza, ampla variedade de derivações do produto, facilidade na fabricação e baixo custo (SCHMIDT *et al.*, 2012), além de resistir a altas temperaturas. É liso, impermeável e facilmente higienizado. Porém, quando danificado ou corroído, pode favorecer o acúmulo de resíduos de alimentos e microrganismos (ANDRADE, 2008; BERNARDES, 2008).

Os polímeros são outro tipo de material amplamente utilizado na indústria de alimentos. Suas características de simplificar o processo de produção dos alimentos e reduzir os custos, não deteriorar os alimentos do ponto de higiene e também de seguridade alimentar sem alterar o equilíbrio básico, tornam o seu uso muito atrativo (AKELAH, 2013). Dentre os polímeros de maior importância nas indústrias de processamento de carnes, em especial matadouros-frigoríficos de aves, está o polietileno. Esta superfície é utilizada para o preparo de diversos alimentos tanto em

escala industrial e em estabelecimentos comerciais, quanto no ambiente doméstico. Por esta razão, um dos principais problemas no uso do polietileno é a facilidade de contaminação cruzada, relacionada principalmente à capacidade de adesão dos microrganismos (CARPENTIER, 1997). Além disto, a superfície das placas de corte de polietileno é muito irregular, podendo ser desgastada facilmente, formando ranhuras que servirão para o acúmulo de resíduos e de bactérias (SINDE; CARBALLO, 2000).

3.5.2 Controle microbiológico de biofilmes através de procedimentos de higienização

A fim de garantir um produto microbiologicamente seguro ao consumidor, o Departamento de Inspeção Higiénico-sanitária de Alimentos de Origem Animal (DIPOA) estabeleceu programas de autocontrole nas indústrias. Dentre eles, o Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), que descreve os métodos de limpeza e desinfecção a serem realizados antes do início das operações (pré-operacional) ou durante as mesmas (operacionais) (BRASIL, 2005).

Os procedimentos de limpeza e desinfecção através de métodos físicos e químicos estão diretamente relacionados à qualidade do produto final (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; GIAOURIS *et al.*, 2013). Como exemplo de agentes químicos de amplo uso na indústria, pode-se destacar os desinfetantes. Uma vez que os desinfetantes não penetram na matriz do biofilme já formado, é necessário que seja realizado um processo de limpeza anterior ao seu uso, a fim de melhorar o desempenho da etapa de sanitização. A limpeza consiste na etapa da higienização onde há a remoção de resíduos sólidos de alimentos e de outras sujidades, os quais podem ser fonte de substrato para microrganismos e favorecer seu crescimento (MAUKONEN *et al.*, 2003). Os agentes de limpeza mais comuns são os surfactantes ou álcalis, utilizados para dissolver os resíduos de alimentos por meio da redução da tensão superficial, emulsificar gorduras e desnaturar proteínas. O uso destas substâncias associado ao uso de água quente sob pressão constitui o processo de limpeza (ANDRADE, 2008). Esta etapa é de grande importância para se obter sucesso na remoção de biofilmes, já que uma limpeza ineficaz impede que o desinfetante penetre na matriz do biofilme e elimine as células viáveis (GIAOURIS *et al.*, 2013).

O quaternário de amônio é um dos desinfetantes mais utilizados em estabelecimentos frigoríficos de aves (SIDHU; SORUM; HOLCK, 2002). É livre de odor, incolor, altamente estável e pouco corrosivo para metais, desde que usado nas

concentrações recomendadas. É mais efetivo contra microrganismos Gram-positivos do que em Gram-negativos, porém não atuam sobre esporos (PAULINO, 2006). Age em ambientes com matéria orgânica melhor do que outras classes de desinfetantes. Contudo, pode ser inativado por detergentes aniônicos ou polifosfatos inorgânicos. É facilmente degradado no ambiente, e atua em uma ampla faixa de pH, tendo sua ação comprometida sobre materiais fibrosos e em locais onde a dureza da água é maior (KUANA, 2009). Com relação ao risco ocupacional, não é irritante para a pele e possui baixa toxicidade (TANG *et al.*, 2011). Contudo, estudos já relataram que seu intenso uso em processos de desinfecção pode levar à adaptação microbiana (SUNDHEIM *et al.*, 1998; LANGSRUD; SUNDHEIM; BORGMANN, 2003; CARVALHO *et al.*, 2017). Segundo a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA), recomenda-se a utilização de uma concentração entre 50 a 200 ppm para superfícies onde há a manipulação ou o contato com o alimento (FDA, 2012).

3.5.3 Controle microbiológico através da temperatura

Além do processo de higienização de instalações e equipamentos, a garantia de um produto final inócuo do ponto de vista microbiológico é também reflexo de um rigoroso controle de temperatura (GEHLEN, 2016). A portaria n° 210 de 10 de novembro de 1998 do MAPA estabelece limites para a temperatura em ambientes específicos de matadouros-frigoríficos de aves durante o processamento da carne. Estabelecimentos que realizem desossa ou cortes devem ter temperatura ambiente máxima de 15°C, sendo a temperatura das carnes manipuladas não superior a 7°C (BRASIL, 1998). Nas plantas frigoríficas que exportam seus produtos para União Europeia (UE), a temperatura nesta sala não deve exceder 12°C, conforme descrito no regulamento 853/2004/CE (UNIÃO EUROPEIA, 2004). Para a temperatura de refrigeração de carcaça, cortes ou miúdos, recomenda-se manter a câmara entre 0 e 3°C, com 1°C de tolerância, estando assim em consonância com a legislação vigente (BRASIL, 1998).

3.5.4 Métodos alternativos para controle do biofilme

Apesar de serem amplamente utilizados para o controle microbiano na indústria de alimentos, os desinfetantes apresentam desvantagens bem conhecidas, como a toxicidade dos resíduos e a promoção de resistência antimicrobiana (LANGSRUD *et al.*, 2003). Além disso, a crescente percepção negativa do consumidor com relação ao uso de produtos químicos sintéticos e artificiais têm estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de produtos alternativos aos desinfetantes, especialmente aqueles considerados “naturais”. Neste contexto, estudos recentes têm demonstrado muitos métodos promissores para o controle da formação de biofilme em superfícies que entram em contato com os alimentos (GIAOURIS *et al.*, 2013). Dentre eles pode-se destacar o uso de fagos (SONI; NANNAPARENI, 2010; SREY; HA, 2013), biosanitizantes produzidos por bactérias não patogênicas (por exemplo, ácido láctico) (NDAHETUYE *et al.*, 2012), bacteriocinas (GÓMEZ *et al.*, 2012), ionização e radiação ultravioleta (BAE; LEE, 2012), tratamento com ultrassom (OULAHAL-LAGSIR *et al.*, 2000), água eletrolisada (AYEBAH *et al.*, 2006; WILSMANN, 2018), ozônio (BAUMANN; MARTIN; FENG, 2009) e produtos naturais como o mel a 0,5% (LEE *et al.*, 2011). Além destes métodos, pesquisas recentes analisando os efeitos de ácidos orgânicos e biosurfactantes têm apresentado resultados satisfatórios para fins de prevenção e remoção de biofilmes (NITSCHKE, 2012; RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014; AKBAS, 2015; AMRUTHA *et al.*, 2017).

3.5.4.1 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos (AO) são substâncias amplamente presentes na natureza como constituintes de plantas e animais. Ácidos orgânicos comerciais já são amplamente utilizados na indústria avícola. Misturas de ácidos e misturas tamponadas, incluindo sais ácidos, favorecem seu máximo efeito antimicrobiano. Estes produtos geralmente são adicionados na água ou na ração visando reduzir a contaminação por patógenos específicos, como *Salmonella* spp. (PANDE; MCWHORTER; CHOUSALKAR, 2018). Estas substâncias são seguras do ponto de vista de saúde animal e humana, visto que não apresentam resíduos tóxicos. Os AO são considerados tão eficientes quanto os desinfetantes, e possuem como vantagem a menor quantidade de produto utilizado, além da redução do consumo de água e de energia (AKBAS,

2015). Porém, o efeito antimicrobiano dos AO é afetado pelas características de cada composto, incluindo composição química, hidrofobicidade e tipo de AO (HSIAO; SIEBERT, 1999).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos AO ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que estas substâncias apresentam potencial bactericida e bacteriostático, conforme o estado fisiológico do organismo e as características do ambiente externo. A maioria destes compostos apresenta fraca natureza ácida. Logo, o pH é considerado um determinante da eficácia, pois afeta a concentração de ácido não dissolvido formado. Formas dissociadas de AO podem facilmente penetrar na membrana lipídica da célula bacteriana, acidificando o citoplasma. Uma vez que a bactéria necessita de pH neutro, ocorre a dissociação de ânions e prótons e a consequente expulsão de prótons. A exportação destes prótons requer um alto consumo de trifosfato de adenosina celular (ATP) e pode resultar em depleção de energia celular. Além disso, os AO podem inibir a função da membrana da célula e o transporte de nutrientes, evitando a síntese de macromoléculas e desnaturando o DNA (RICKE, 2003).

A atividade antimicrobiana dos AO sobre biofilmes já foi verificada para microrganismos de importância em saúde pública. Estudos têm demonstrado que alguns tipos de AO apresentam boa eficácia sobre patógenos alimentares, inclusive *S. Typhimurium*, em superfícies de contato com o alimento (SAMAPPITO; BUTKHUP, 2008; NAHAR; ULLAH; ISLAM, 2011; SINGLA; GANGULI, 2014). Borges, Saavedra e Simões (2012) avaliaram a atuação do ácido gálico e do ácido ferúlico na prevenção de biofilme por isolados de patogênicos de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*. Observou-se uma redução de mais de 70% na formação de biofilme, comprovando o potencial que estes fitoquímicos apresentam como estratégia para o controle de biofilmes. Amrutha *et al.*, (2017) demonstraram que os AO são eficazes não só no controle de biofilme de *Salmonella* spp., mas também na inibição da sinalização do QS.

O ácido cítrico (AC) é um ácido hidroxil tricarboxílico presente naturalmente na maioria das frutas cítricas, como limão e laranja. No entanto, sua produção para uso na indústria pode ser feita, em grandes volumes e a um baixo custo, a partir de processos fermentativos do fungo *Aspergillus niger*. Este fungo excreta quantidades significativas de AC quando cultivado em meio com alta concentração de açúcar, sais minerais e pH de 2,5 a 3,5 (SAUER *et al.*, 2008). O AC é reconhecido como seguro pelo

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture – USDA*), sendo aprovado em 2010 para utilização na indústria de carnes frescas e processadas e também na indústria avícola, desde que utilizados em concentrações específicas e pré-estabelecidas (USDA, 2011). O AC inibe as células bacterianas via quelação de metal, o qual é essencial para o crescimento do microrganismo.

O ácido málico (AM) é um ácido dicarboxílico encontrado em muitas frutas, como maçã, uva e pêra (AKBAS, 2015). Sua produção a nível industrial pode ser feita, assim como o AC, a partir de fermentação. *Aspergillus flavus* e *Saccharomyces cerevisiae* são consideradas as principais espécies fúngicas produtoras de AM (ZELLE *et al.*, 2008). Como antimicrobiano, possui mecanismo de ação em função do baixo pH (BEUCHAUT; GOLDEN, 1999) ou por causar um dano significativo no citoplasma da bactéria (ESWARANANDAM; HETTIARACHCHY; JOHNSON, 2004).

Apesar dos inúmeros estudos elucidando a eficiência dos ácidos orgânicos no controle de microrganismos, conforme descrito acima, outros autores já vem relatando que algumas cepas, principalmente de *Salmonella* Heidelberg, já adquiriram mecanismos de resistência aos ácidos, por exemplo como evidenciado por Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2010 e Santin *et al.*, 2017.

3.5.4.2 Biosurfactantes

Os biosurfactantes, também chamados de bioemulsificantes, são grupos de moléculas de superfície ativa, produzidos por microrganismos e com capacidade para interação com hidrocarbonetos. Por ser um composto anfílico, apresenta a capacidade de se acumular entre fases fluidas (óleo/água ou ar/água), reduzindo tensões superficiais e interfaciais, e formando emulsões. Estas características conferem aos biosurfactantes aplicações na área da biorremediação, processamento de alimentos e indústria farmacêutica (NITSCHKE; COSTA, 2007; RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014). Ramnolipídeo de *P. aeruginosa*, surfactina de *Bacillus subtilis*, emulsões de *Acinetobacter calcoaceticus* e sorolipídeos de *Candida bombicola* são alguns tipos de biosurfactantes. Algumas razões para o aumento do interesse neste tipo de produto são a alta biodegradabilidade e a baixa toxicidade; atividade antimicrobiana e antitumoral; estabilidade em condições extremas de pH, salinidade e temperatura; e possibilidade de

produção a partir de substratos renováveis em processos biotecnológicos (FLASZ, *et al.*, 1998; MOHAN; NAKHLA; YANFUL, 2006).

Na indústria de alimentos, o uso dos biosurfactantes tornou-se atrativo em função da sua capacidade emulsificante (BANNAT, *et al.*, 2000), antiadesiva e antimicrobiana (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Atualmente, os ramnolípeos são uma das classes mais promissoras de biosurfactantes, inclusive com aprovação do FDA para uso em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica nos Estados Unidos (NITSCHKE; COSTA, 2007; RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014). A ação antiadesiva dos biosurfactantes é muito desejável para indústria de alimentos, uma vez que é capaz de inibir a formação de biofilmes neste ambiente (RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014). Contudo, este efeito corresponde a uma pequena parte dos estudos com estas moléculas (NITSCHKE; COSTA, 2007; ZERAIK; NITSCHKE, 2010). Complementando as propriedades antiadesivas dos biosurfactantes, pode-se destacar a sua capacidade em remover biofilmes, a qual vem sendo avaliada em diversos estudos contemplando patógenos de importância em saúde pública (NITSCHKE *et al.*, 2009; GOMES; NITSCHKE, 2012; RIENZO *et al.*, 2016). O mecanismo de ação dos biosurfactantes ocorre pela alteração da hidrofobicidade da superfície bacteriana, interferindo na adesão às superfícies sólidas. O efeito do biosurfactante na prevenção e na destruição de biofilmes de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* já foi relatado. Porém, este efeito depende da hidrofobicidade inicial da bactéria, bem como do tipo de lipopeptídeo e da concentração (RIVARDO *et al.*, 2009).

3.6 Modelagem preditiva em microbiologia de alimentos

A microbiologia preditiva consiste em uma área do conhecimento capaz de prever o crescimento e a atividade de um microrganismo em um alimento ao longo do tempo através de equações matemáticas (JAY, 2005). As predições têm como princípio que as respostas das populações microbianas e as condições ambientais são reprodutíveis (ROSS; DALGAARD; TIENUNGOON, 2000). O uso desta ferramenta na área da tecnologia de alimentos iniciou em 1920 com a elaboração de modelos que calculavam o tempo de destruição térmica de patógenos relacionados à indústria de enlatados (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

Ao longo dos anos, o emprego da microbiologia preditiva na área de alimentos tem apresentado uma maior expressão. Este tipo de abordagem é muito útil na

implantação e avaliação de programas de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) na indústria de carnes, uma vez que é necessária uma capacidade para lidar quantitativamente com uma série de variáveis que influenciam a segurança dos alimentos. Desta forma, a modelagem pode descrever, por exemplo, o efeito da temperatura sobre o crescimento, inativação ou sobrevivência de microrganismos. A avaliação de risco também é outra aplicação importante da microbiologia preditiva, a fim de verificar se o consumo de determinado alimento pode comprometer ou não a saúde do consumidor. Segundo estes autores, estudos de vida de prateleira, desenvolvimento e pesquisas de novos produtos, são algumas das utilidades dos modelos para indústria da carne (MCDONALD & SUN 1999).

Com enfoque em saúde pública, Elias *et al.*, (2016) propuseram um modelo capaz de prever a multiplicação de *S. Enteritidis* em maionese caseira sob diferentes cenários de temperatura ao longo do tempo. Os autores constataram que a estocagem realizada em temperaturas abaixo 7°C são seguras ao consumidor. Seguindo neste propósito de seguridade dos alimentos, Lee *et al.*, (2014a) desenvolveram modelos de cinética de crescimento de *L. monocytogenes* em carne suína crua e obtiveram modelos acurados para expressar de maneira aceitável o crescimento do microrganismo, tendo sua principal aplicabilidade na definição de padrões para evitar a contaminação do produto.

Estudos utilizando a modelagem preditiva para predizer os fenômenos relacionados aos biofilmes iniciaram na década de 1970 através de modelos que consideravam um substrato e transporte em massa em biofilmes já formados (HARRIS; HANSFORD, 1976; HARREMOËS, 1978). A partir de 1980, tiveram início modelos incluindo biofilmes multiespécies e distribuição não uniforme dos diferentes tipos de biomassa (RITTMANN; MCCARTY, 1980; WANNER; GUJER, 1986). Contudo, estes modelos eram simples e consideravam apenas uma dimensão e a dinâmica de crescimento em fase estacionária. De 1990 até os dias atuais, impulsionados pelo grande desenvolvimento tecnológico, novos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de melhor compreender os biofilmes. Dados experimentais, multidimensionais e multiespecíficos foram desenvolvidos com o intuito de fornecer uma visão mais realista do biofilme, elucidando interações entre estas estruturas e o ambiente, bem como entre as espécies dentro de um mesmo biofilme. Escalas de tempo também passaram a ser consideradas (KREFT; BOOTH; WIMPENNY, 1998; ALPKVIST; KLAPPER, 2007). A principal razão para o crescimento dos estudos de modelagem para os biofilmes nos

últimos 30 anos ocorreu em função do aumento da aceitação de que os microrganismos estão, na realidade, organizados sob estas estruturas na natureza e não na forma planctônica (COSTERTON, 1995; HALAN; BUEHLER; SCHMID, 2012).

Com o objetivo de promover a formação de biofilmes considerados benéficos para prevenir a ocorrência daqueles considerados prejudiciais, é necessário o entendimento dos mecanismos que levem a sua formação, crescimento e renovação, bem como a sua organização e funcionalidade. O desenvolvimento de um biofilme consiste em um processo complexo e influenciado por fatores químicos, físicos e biológicos. Geralmente um modelo matemático traduz a compreensão conceitual do sistema do biofilme em termos matemáticos, combinando importantes processos envolvidos, mas omitindo os de menor relevância, e as soluções são obtidas através do uso de matemática ou ferramentas estatísticas (ZHANG, 2017). De acordo com Wanner *et al.*, (2006), a “regra de ouro” da modelagem é que “um modelo deve ser tão mais simples quanto possível, e tão complexo quanto necessário”. Na Tabela 1 estão descritos alguns dos modelos mais atuais utilizados para o estudo dos biofilmes como uma comunidade diversa:

Tabela 1- Principais modelos matemáticos utilizados para biofilmes.

Categoria do modelo	Modelos específicos/ferramentas matemáticas	Aspectos modelados do biofilme
Modelagem genética	Modelo de gene-central Modelo baseado em traços Modelo de <i>Quorum sensing</i>	Estrutura do biofilme, interação entre espécies na composição genética, interação entre espécies na diversidade de ecossistema, estrutura do biofilme
Modelo de análise de balanço de fluxo	Restrição Otimização do problema	Interação entre espécies, estrutura do biofilme
Modelo de inferência estatística	Método baseado em similaridade Método baseado em regressão	Interação entre espécies, estabilidade da comunidade

Modelo de cinética de crescimento	Modelo baseado no indivíduo	Estrutura do biofilme, interação com o ambiente, propriedades mecânicas
-----------------------------------	-----------------------------	---

Fonte: Zhang (2017)

Os modelos baseados em inferência estatística partem do princípio que dentro do biofilme raramente encontra-se uma só espécie. Geralmente as espécies coexistem e possuem relações muito complexas (comensalismo, mutualismo, competição parasitismo e amensalismo), afetando toda estrutura e funcionalidade do biofilme. Todas estas interações podem ser avaliadas através de inferência estatística baseado em correlações (JAMES; BEAUDETTE; COSTERTON, 1995; FUHRMAN, 2009; FREILICH *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014b).

Apesar da grande importância que o estudo dos biofilmes vem assumindo ao longo dos anos, ainda há poucos trabalhos elucidando a aplicação de modelagem preditiva para melhor entendimento dos biofilmes na indústria de alimentos.

3.7 Principais métodos para avaliação dos biofilmes em superfícies abióticas

Considerando a importância que os biofilmes assumem na medicina humana, veterinária e áreas relacionadas à biotecnologia, o contínuo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, métodos bioquímicos e técnicas de imagem são importantes a fim de proporcionar um melhor entendimento destas estruturas complexas. Nesse sentido, diferentes metodologias vêm sendo desenvolvidas e empregadas ao longo dos anos.

A viabilidade de células bacterianas dentro da matriz do biofilme pode ser detectada através do monitoramento da sua atividade metabólica, avaliação de elétrons respiratórios por sal de tetrazólio (*2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) - 2H-tetrazolium-5-carboxanilide - XTT*), integridade de membrana (coloração *live/dead* por SYTO 9 ou iodeto de propídeo) ou habilidade de crescimento. Além disso, a quantidade total de DNA viável pode ser verificada através de qPCR (STIEFEL *et al.*, 2016). Da mesma forma, os componentes da matriz de EPS do biofilme podem ser visualizados e quantificados. Proteínas podem ser coradas utilizando-se corantes específicos (SYPRO RUBI, CBQCA ou NanoOrange) ou detectadas através de reações específicas, como o

método de Lowry (STIEFEL *et al.*, 2016). Os polissacarídeos também podem ser corados a partir de fluorescência ou outros corantes, como o Calcofluor (CHEN *et al.*, 2007).

Um dos métodos mais simples para quantificação dos biofilmes é o uso do cristal violeta, o qual é muito utilizado para avaliação da biomassa total. Este corante liga-se de forma indiferente às cargas negativas, tendo como alvo diversas moléculas das membranas das bactérias e da matriz de EPS. Após a coloração, o corante é solubilizado com o uso de um solvente, como ácido acético ou etanol. Esta quantidade de corante solubilizado é mensurada por leitura de absorbância, sendo diretamente proporcional à quantidade de células aderidas no biofilme. Estudos que visam avaliar a eficiência de procedimentos de limpeza e desinfecção requerem a associação de métodos que quantifiquem a biomassa não removida pelo tratamento, como o cristal violeta, com métodos que avaliem a viabilidade bacteriana do biofilme remanescente, como a contagem microbiana (STEPANOVIC *et al.*, 2000; PANTANELLA *et al.*, 2013). Para a enumeração de bactérias de um biofilme através do método de contagem em placa, primeiramente é necessário realizar a desadesão das bactérias da superfície através do uso de ultrassom ou vórtex (WEBBER *et al.*, 2015). Em seguida, as células viáveis são quantificadas através de diluições seriadas e plaqueamento em meios seletivos, com ou sem antibióticos (biofilmes multiespécies), ou meios não seletivos (biofilmes monoespécie) (ASSÉRÉ; OULAHAL; CARPENTIR, 2008; WEBBER, 2015; GEHLEN, 2016).

Para a visualização da estrutura do biofilme, a utilização da análise de microscopia tem sido relatada na literatura (HILBERT *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2017; DHOWLAGHAR *et al.*, 2018). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste em uma ferramenta que visa à observação da superfície das microcolônias, bem como de todo o biofilme (PANTANELLA *et al.*, 2013). Algumas de suas vantagens são a alta resolução e a magnificação. No entanto, a MEV convencional requer desidratação e revestimento metálico de amostras biológicas antes da observação. Uma vez que os biofilmes consistem principalmente de água, a desidratação pode modificar a estrutura do biofilme. Uma observação direta através da MEV pode revelar que as bactérias presentes no biofilme são extensivamente rodeadas por um material fibroso e amorfo, o qual representa a matriz de EPS (ASAHI *et al.*, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), exceto as análises de MEV dos experimentos 3 e 4, que foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS.

4.2 Cepas bacterianas

Foram utilizadas 33 cepas de *S. Enteritidis*, classificadas previamente como produtoras de biofilme a 4°C e a 12°C (BORGES *et al.*, 2018); 73 cepas de *E. coli* formadoras de biofilme a 25°C (RODRIGUES *et al.*, 2019); e 89 cepas de *C. jejuni*. As informações referentes à origem e ao ano de isolamento dos isolados estão descritas nos APÊNDICES A, B e C. Todas as cepas pertencem à bacterioteca do CDPA e se encontram estocadas a -80°C em caldo infusão cérebro–coração (*brain heart infusion both* - BHI) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) com 25% de glicerol (Synth; Diadema, Brasil). As cepas foram confirmadas quanto à pureza através do cultivo em meios seletivos: ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (*modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar* – mCCDA) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) para *C. jejuni*; ágar eosina azul de metileno (*eosin methylene blue agar* – EMB) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) para *E. coli*; ágar de desoxicolato lisina xilose (*xylose lysine desoxycholate agar* – XLD) (Merck; Darmstadt, Alemanha) para *S. Enteritidis*.

4.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo para os ensaios com biofilmes mono e multiespécie foram realizados de acordo com Stepanovik *et al.* (2007), com adaptações. Inicialmente, as cepas de *E. coli*, *S. Enteritidis* e a cepa padrão (*S. Typhimurium* - ATCC 17025), foram enriquecidas em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica por 18-24 horas a 37±1°C. A partir deste cultivo inicial, os isolados foram plaqueados em ágar triptona de soja (*tryptone soy agar* - TSA) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) e incubados por 18-24 horas a 37±1°C. Após, foi feita a

inoculação de uma colônia de cada cepa do TSA em caldo triptona de soja sem glicose (*tryptone soy both without dextrose* - TSB) (Difco Laboratories; Detroit, Estados Unidos), seguido de incubação por ± 18 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. As turvações do TSB foram ajustadas até a escala 1 de McFarland, correspondendo a um intervalo de 0,224 a 0,300 em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm (SP-22 – Biospectro; São Paulo, Brasil). Para os isolados de *C. jejuni*, primeiramente foi realizado o cultivo direto em ágar mCCDA, seguido de incubação em estufa bacteriológica $42 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, sob uma atmosfera com 5% de O_2 , 10% de CO_2 e 85% de N, obtida através de um gerador de microaerofilia (Probac; São Paulo, Brasil). Após, as colônias foram inoculadas em caldo TSB, ajustando-se a turvação até a escala 1 de McFarland, conforme descrito anteriormente.

4.4 Análises estatísticas

O programa GraphPad Prism foi utilizado para a análise estatística dos dados. Foi adotado como referencial para as análises um nível de significância de 5%.

- Estatística descritiva: Utilizada para determinar o agrupamento das cepas conforme o perfil de formação de biofilme (formador e não formador) (experimento 1); para expressar os percentuais de prevenção e remoção de biofilme (experimento 2); para expressar a média e o desvio padrão das contagens microbianas nas diferentes superfícies (experimento 3 e 4) e tratamentos (experimento 4).
- Teste Qui-quadrado: Utilizado para avaliar as diferenças de proporção dos isolados aderentes e não aderentes entre origens e, entre as temperaturas para uma mesma origem (experimento 1); para verificar diferenças nas proporções de isolados quanto ao percentual de prevenção/remoção do biofilme entre os tratamentos em uma mesma temperatura e entre as temperaturas (experimento 2).
- Teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni: Foram utilizados para analisar a adesão nas diferentes temperaturas e superfícies nos biofilmes multiespécies, bem como diferenças entre os tratamentos de remoção do biofilme (experimento 4).

- Teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações: Utilizados quando os pré-requisitos para ANOVA não foram atendidos, como para comparar a adesão dos três microrganismos nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliestireno (experimento 3).

4.5 Experimento 1 - Formação de biofilmes monoespécie por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em microplacas de poliestireno

O objetivo deste experimento foi realizar um *screening* de isolados das três espécies para a formação de biofilme a 4°C, 12°C e 25°C. A escolha destas temperaturas teve como base a simulação dos ambientes de processamento e manipulação dos alimentos em matadouro-frigorífico (4°C e 12°C) (BRASIL, 1998; UNIÃO EUROPEIA, 2004), bem como a temperatura ambiente (25°C) (WHO, 2003). Para este experimento, foram utilizadas todas as cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*.

A metodologia utilizada para avaliar a produção de biofilme dos isolados foi adaptada a partir da técnica proposta por Stepanovic *et al.* (2007). Após o ajuste dos inóculos, 200µL de cada suspensão bacteriana foram inoculados, em triplicata, em microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). Foi utilizado um controle positivo (*S. Typhimurium* ATCC 17025) e um negativo (TSB sem glicose estéril) em cada placa, também inoculados em triplicata. As microplacas foram incubadas a 25±1°C (*S. Enteritidis*, *C. jejuni*), 12±1°C (*E. coli*, *C. jejuni*) e 4±1°C (*E. coli*, *C. jejuni*), sob condições de aerobiose. Para *S. Enteritidis* e *E. coli* o tempo de incubação foi de 24 horas e para *C. jejuni* 96 horas. Os resultados da incubação de *E. coli* a 25°C e *S. Enteritidis* a 12°C e a 4°C foram obtidos de trabalhos anteriores (BORGES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e descartado. Os poços foram lavados por três vezes com 200 µL de solução salina estéril a 0,85%. A fixação do biofilme foi feita com a adição de 200µL de metanol (Nuclear; Diadema, Brasil) durante 20 minutos. Após a remoção do metanol, as placas foram secas e coradas com 200µL de solução de cristal violeta de *Hucker* a 2% (MediQuímica; Porto Alegre, Brasil) durante 15 minutos. Após este período, as placas foram lavadas em água corrente e secas novamente. Em seguida, foram adicionados 200µL de ácido acético glacial 33% (Nuclear; Diadema, Brasil) para leitura da densidade óptica em leitor de

microplacas (ELX800 Biotek; Winooski, Estados Unidos) utilizando-se um filtro de 550nm.

A interpretação dos resultados teve como referências os parâmetros de densidade óptica (DO) proposto por Stepanovic *et al.* (2007). A densidade óptica de cada cepa (DOa) foi obtida a partir média aritmética dos três poços. O ponto de corte (DOcn) foi estabelecido como o valor correspondente a três desvios acima da média aritmética dos valores dos três poços do controle negativo. Para a determinação da formação de biofilme, utilizou-se o seguinte critério: não formador de biofilme (DOa \leq DOcn) e formador de biofilme (DOa $>$ DOcn). Além da triplicata biológica, também foi realizada uma triplicata técnica. Foram consideradas cepas formadoras de biofilme, aquelas que demonstraram capacidade de adesão nos três ensaios.

4.6 Experimento 2 - Prevenção e remoção de biofilmes monoespécies de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em microplacas de poliestireno

Para este experimento, foram utilizadas cepas classificadas como formadoras de biofilme a 4°C, 12°C e 25°C, de acordo com os critérios do experimento 1. Ao total foram analisados 21 isolados de *S. Enteritidis*, 30 de *E. coli* e 24 de *C. jejuni* (APÊNDICE D). Como controle positivo da formação de biofilme nas três temperaturas foi utilizada uma cepa padrão de *S. Typhimurium* (ATCC 17025).

Foram testadas as seguintes substâncias: um biosurfactante (raminolipídeo de *P. aeruginosa* [90% - R90, Agae Technologies; Corvalis, Estados Unidos]), dois ácidos orgânicos (ácido cítrico [99% - C0759, Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemanha] e ácido málico [M8304, Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemanha]) e um desinfetante (cloreto de benzalcônio [Êxodo Científica; Hortolândia, Brasil]). Foram avaliadas três concentrações para cada produto: 1%, 3% e 5% para o biosurfactante; 2%, 5% e 10% para os ácidos orgânicos; e 50ppm, 100ppm e 150ppm para o desinfetante. A escolha das concentrações dos ácidos orgânicos e do biosurfactante foi baseada em dados disponíveis na literatura quanto ao uso destes produtos para o controle de biofilmes na indústria de alimentos (GOMES; NITSCHKE, 2012; AKBAS; KOKUMER, 2015; AKBAS; CAG, 2016). As concentrações do desinfetante seguiram as recomendações do FDA para superfícies que tenham contato com os alimentos (FDA, 2012).

Todos os compostos foram diluídos em água destilada a fim de se obter as concentrações desejadas. Para os ácidos orgânicos, foi preparada uma solução mãe a

10%, a qual teve o pH ajustado entre 3,128 a 4,761, para o ácido cítrico, e a 3,459 a 5,097, para o ácido málico. Para os ensaios de prevenção do biofilme foram testados o biosurfactante e os ácidos orgânicos. Para os ensaios de remoção foram avaliados o biosurfactante, os ácidos orgânicos e o desinfetante. O desinfetante não foi utilizado para os ensaios de prevenção dos biofilmes pois, comumente na indústria, este produto é utilizado no processo de higienização, após a limpeza, seguido de enxágue, a fim de evitar a presença de princípio ativo residual nas superfícies que entrarão em contato com o alimento.

A metodologia utilizada para a avaliação da eficácia dos antimicrobianos foi adaptada a partir das técnicas propostas por Gomes e Nitschke (2012) e Akbas e Cag (2016).

4.6.1 Avaliação da prevenção da formação do biofilme

Microplacas de poliestireno foram previamente tratadas com 200 μ L dos antimicrobianos em suas respectivas concentrações, seguido de incubação a 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 12 \pm 1 $^{\circ}$ C e 4 \pm 1 $^{\circ}$ C por 24 horas. Para cada temperatura foi utilizada uma microplaca de cada concentração para as três substâncias avaliadas. Como controle, utilizou-se uma microplaca tratada apenas com água destilada estéril para cada temperatura. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi removido e foi realizada uma lavagem com 200 μ L de água destilada estéril, seguida de secagem em estufa a 37 $^{\circ}$ C por uma hora.

Após, foram adicionados 200 μ L de cada inóculo, em triplicata. Também foi inoculado um controle negativo (TSB sem glicose estéril). As microplacas foram incubadas novamente a 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 12 \pm 1 $^{\circ}$ C e 4 \pm 1 $^{\circ}$ C em aerobiose por 24 horas para *S. Enteritidis* e *E. coli*, e por 96 horas para *C. jejuni*. Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e foi realizada a coloração e a leitura das microplacas, conforme descrito anteriormente.

4.6.2 Avaliação da remoção do biofilme pré-formado

Foi feita a inoculação de 200 μ L de cada suspensão bacteriana e do controle negativo (TSB sem glicose estéril), em triplicata, em microplacas, seguida de incubação a 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 12 \pm 1 $^{\circ}$ C e 4 \pm 1 $^{\circ}$ C em aerobiose por 24 horas para as cepas de *S. Enteritidis* e *E. coli*, e por 96 horas para os isolados de *C. jejuni*. Após a incubação, o conteúdo dos

poços foi aspirado e foi realizada uma lavagem com solução salina 0,85%, para remoção das células planctônicas. O biofilme pré-formado foi submetido ao tratamento com 200µL de cada concentração das substâncias testadas. Antes do tratamento, os antimicrobianos foram divididos em alíquotas e mantidos por uma hora nas temperaturas de 4°C, 12°C e 25°C, a fim de se evitar a interferência da temperatura na ação das substâncias. A avaliação da ação dos tratamentos na remoção dos biofilmes foi realizada em dois tempos de contato (cinco e dez minutos). Como controle, utilizou-se uma microplaca tratada apenas com água destilada estéril por 10 minutos para cada temperatura. Após os tempos de contato, foi realizada a coloração e a leitura das microplacas, conforme descrito anteriormente.

4.6.3 Mensuração da prevenção e da remoção dos biofilmes

A capacidade de uma substância em prevenir a formação de biofilmes ou de remover o biofilme pré-formado foi avaliada através da determinação do percentual de biomassa removido ou não formado em relação ao controle. Este percentual foi obtido através da seguinte fórmula (PITTS *et al.*, 2003):

$$\% \text{ prevenção/remoção de biofilme da cepa} = \frac{(C-B) - (T-B)}{(C-B)} \times 100$$

Onde:

C: Média da triplicata da densidade óptica do controle sem tratamento;

T: Média da triplicata da densidade óptica de cada tratamento;

B: Média da triplicata da densidade óptica do controle negativo de cada placa.

4.7 Experimento 3 – Comparação da capacidade de adesão de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em aço inoxidável, polietileno e poliestireno

Para este experimento foram selecionadas, aleatoriamente, dez cepas de *S. Enteritidis*, dez de *E. coli* e cinco de *C. jejuni* (APÊNDICE D). Estes isolados foram classificados como formadores de biofilme, de acordo com os critérios do experimento 1. A metodologia empregada para esta etapa do estudo foi realizada de acordo com Webber *et al.*, (2015) e Gehlen (2016), com algumas modificações.

4.7.1 Preparação das superfícies

Foram utilizados cupons de aço inoxidável (AISI 316), polietileno e poliestireno confeccionados nas dimensões de 1cm (largura) x 1cm (comprimento) x 0,1cm (espessura). O aço e o polietileno são amplamente utilizados em matadouros-frigoríficos de aves. O poliestireno foi avaliado com o objetivo de comparar esta superfície com as demais, visto que é o material mais utilizado nos experimentos de avaliação da formação de biofilme em microplacas.

Os cupons foram submetidos à limpeza manual com auxílio de esponja não abrasiva, água e detergente neutro líquido, seguido de enxágue, imersão em água destilada por 24 horas, imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 24 horas em temperatura ambiente e um novo enxágue com água destilada. Os cupons de aço inoxidável e polietileno foram esterilizados em autoclave 121°C por 30 minutos, e os de poliestireno foram esterilizados em luz ultravioleta por 2 horas para cada lado da superfície.

4.7.2 Ensaio de adesão

Para a avaliação da adesão microbiana, utilizou-se uma microplaca estéril de poliestireno com 12 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil) para cada cepa testada. Após o preparado dos inóculos, foram adicionados 3 mL (10^8 UFC/mL) de cada suspensão bacteriana em nove poços. Em seguida, os cupons de aço inoxidável, polietileno e poliestireno foram adicionados e as placas foram incubadas em aerobiose a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para *S. Enteritidis* e *E. coli*, e 96 horas para *C. jejuni*. Cada superfície foi testada em triplicata em uma mesma microplaca. Após a incubação, os cupons foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e lavados com 5mL de água peptonada 0,1% (Merck; Darmstadt, Alemanha), para remoção das células planctônicas. Posteriormente, os cupons foram introduzidos em tubos de fundo cônico tipo Falcon (Olen; São José dos Pinhais, Brasil) contendo 5mL de água peptonada 0,1% com esferas de vidro. A desadesão das células sésseis foi feita através da agitação do material em agitador de tubos tipo vórtex (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil) durante um minuto.

Para a contagem bacteriana, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) em solução salina 0,85% para cada cupom. Em seguida foi feito o plaqueamento em meio EMB para *E. coli*, em XLD para *S. Enteritidis* e em mCCDA para *C. jejuni*, utilizando-

se o método de contagem em gota (*Drop plate*), inoculando-se cinco gotas de 10 μ L para cada diluição. As placas de ágar EMB e XLD foram incubadas a 37 \pm 1 $^{\circ}$ C por 24 horas em condições de aerobiose. As placas de mCCDA foram incubadas a 42 \pm 1 $^{\circ}$ C por 48 horas em microaerofilia.

Para determinar a contagem de cada microrganismo, foi considerada a área de superfície dos dois lados do cupom, bem como sua área lateral. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{UFC.cm}^{-2} = (\text{Vd/Va}) \times \text{M} \times (\text{D/A})$$

Onde:

Vd: volume do diluente utilizado no enxágue (5 mL),

Va: volume da alíquota utilizada no plaqueamento (0,05 mL),

M: média da contagem obtida nas placas (UFC),

D: diluição utilizada na contagem,

A: área do cupom (2,4 cm²).

4.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi realizada com o objetivo de comparar a adesão dos três microrganismos nas superfícies testadas. A preparação do material para execução dos ensaios foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido pelo CMM-UFRGS. Uma cepa de cada gênero foi selecionada aleatoriamente (*S. Enteritidis* – n $^{\circ}$ 06, *E. coli* – n $^{\circ}$ 73, *C. jejuni* – n $^{\circ}$ 32). Primeiramente, foi feito o preparo do inóculo e a incubação com os cupons a 25 $^{\circ}$ C por 24 horas (*S. Enteritidis* e *E. coli*) e 96 horas (*C. jejuni*), em aerobiose. Após, foi realizada a lavagem dos cupons com 5mL de água destilada estéril. Em seguida, as superfícies foram imediatamente acondicionadas em solução de fixação (1,2mL de Glutaraldeído 25%, 5mL de tampão fosfato 0,2M e 3,8mL de água destilada) a 4 $^{\circ}$ C por sete dias. Foram, então, realizadas três lavagens de 30 minutos cada com solução de tampão fosfato 0,2M e água destilada, na proporção 1:1, seguido por desidratação em concentrações crescentes de acetona (30% por 10 minutos, 50% por 10 minutos, 70% por 10 minutos, 90% por 10 minutos, 90% por 20 minutos, 100% por 10 minutos, 100% por 20 minutos) (Merck; Darmstad, Alemanha). Os cupons foram secos no aparelho de Ponto Crítico (Balzers CPD030; Baltec, Alemanha), utilizando dióxido

de carbono líquido como fluido de transição, e recobertas com uma camada fina de 20nm de ouro (SCD 050; Baltec, Alemanha). A visualização de uma parte das imagens foi realizada em microscópio eletrônico JSM- 6060 (Jeol; Tóquio, Japão) operando a 10 kV e outra parte em microscópio eletrônico Zeiss EVO MA 10 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operando a 8 kV.

4.8 Experimento 4 - Formação e remoção de biofilmes multiespécies de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em superfícies de matadouro-frigorífico de aves e desenvolvimento de modelagem preditiva

Para este experimento, utilizou-se apenas uma cepa de cada gênero formadoras de biofilme a 4°C, 12°C e 25°C (APÊNDICE D). Para execução dos ensaios multiespécies foram realizadas quatro combinações de microrganismos: 1) *E. coli* + *S. Enteritidis*; 2) *E. coli* + *C. jejuni*; 3) *S. Enteritidis* + *C. jejuni*; 4) *E. coli* + *C. jejuni* + *S. Enteritidis*. A seleção dos produtos, das suas concentrações e do tempo de contato foi determinada de acordo com os dados obtidos no experimento 2, sendo selecionados aqueles que, de modo geral, apresentaram melhores resultados de eficiência antimicrobiana para os três microrganismos avaliados. Foram selecionados o ramnolípídeo 5%, o cloreto de benzalcônio 150 ppm e o ácido cítrico a 10%, utilizando o tempo de contato de dez minutos. A metodologia empregada nesta etapa do estudo foi desenvolvida de acordo com o trabalho elaborado por Gehlen (2016), com modificações.

4.8.1 Formação dos biofilmes multiespécies

Para a formação dos biofilmes, foram utilizadas microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços de fundo plano. Nas combinações microbianas em dupla, foram adicionados 1mL de TSB estéril e 1mL da suspensão bacteriana de cada microrganismo a ser testado. Para a combinação com as três bactérias, foram adicionados aos poços 750µL de TSB estéril e 750µL do inóculo de cada bactéria. Os cupons de aço inoxidável e de polietileno, preparados conforme descrito anteriormente, foram imersos individualmente nos poços e incubados a 25±1°C, 12±1°C e 4±1°C. Foram utilizados três tempos de incubação: 4, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene operacional e pré-operacional em matadouros-frigoríficos de aves

(ROSSONI; GAYLARDE 2000; KUSUMANINGRUM *et al.*, 2003). Foi utilizada uma microplaca para cada combinação de microrganismos, tipo de superfície, temperatura e tempo de incubação.

Para os biofilmes multiespécies foi realizada também a MEV para cada combinação de microrganismos, utilizando-se apenas os cupons de aço inoxidável a 25°C e com 24 horas de incubação. O processo de fixação, desidratação, ponto crítico e metalização foi realizado conforme o protocolo descrito anteriormente. A escolha da superfície de aço inox para realização da microscopia deu-se em função de ser, entre as três superfícies avaliadas, a mais comum em matadouros-frigoríficos, estando presente em praticamente todas as etapas do abate de aves.

4.8.2 Remoção dos biofilmes multiespécies

Após os tempos de incubação determinados, os corpos de prova foram retirados do meio de cultivo e lavados com 5 mL de água peptonada 0,1%, para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram transferidos para outra microplaca contendo 3 mL de cada antimicrobiano (ramnolipídeo 5%, ácido málico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) e água destilada estéril (grupo controle), em triplicata. Antes do início dos tratamentos, os antimicrobianos eram divididos em alíquotas menores, e mantidos por uma hora nas temperaturas de 4°C, 12°C e 25°C, a fim de se avaliar a interferência da temperatura na ação destas substâncias.

Os tratamentos foram realizados a 4°C, 12°C e 25°C por 10 minutos. Após, os cupons foram imersos em 5mL de água peptonada 0,1% com agentes neutralizantes (Tween 80 - polisorbato [Dinâmica; Diadema, Brasil]; lecitina de soja [Sundown Naturals; São Paulo, Brasil]; e tiosulfato de sódio [Dinâmica; Diadema, Brasil]) e esferas de vidro por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por um minuto, para desadesão das células sésseis. Foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) e contagem através de *Drop plate* em ágar EMB para *E. coli*, XLD para *S. Enteritidis* e mCCDA para *C. jejuni*. A interpretação dos resultados teve como base a área das superfícies de aço e polietileno, conforme descrito anteriormente.

4.8.3 Desenvolvimento de modelos matemáticos preditivos para os biofilmes multiespécie

Modelos matemáticos de regressão linear foram desenvolvidos com base nas variáveis combinação microbiana (*E. coli* + *S. Enteritidis*; *E. coli* + *C. jejuni*; *S. Enteritidis* + *C. jejuni*; *E. coli* + *C. jejuni* + *S. Enteritidis*), temperatura (4°C, 12°C e 25°C), superfície (aço inoxidável e polietileno), tempo de incubação (4, 12 e 24 horas) e tratamento (controle, ramnolipídeo 5%, ácido málico 10% e cloreto de benzalcônio 150ppm). A variável a ser predita correspondeu a quantidade de células aderidas nas superfícies para cada microrganismo, sendo os resultados expressos em UFC.cm⁻². O grau de ajuste dos modelos foi obtido através da análise do coeficiente de determinação. Todas as equações e os coeficientes de determinação foram gerados no *software* GraphPad Prism, utilizando-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Formação de biofilmes monoespécie por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em microplacas de poliestireno

Das 33 cepas de *S. Enteritidis* avaliadas, observou-se cerca de 60% (20/33) delas apresentaram capacidade de formação de biofilme a 25°C, sendo dessas três amostras provenientes de carcaça, quatro de órgãos de aves, quatro de suabe de arrasto e nove de produtos avícolas envolvidos em surtos salmonelose (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência absoluta (%) e relativa (n/N) de cepas de *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilme a 25°C classificadas de acordo com a origem.

Origem (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 25°C (n/N)
Carcaça (5/33)	60 (3/5) ^a
Órgão de aves (6/33)	66,6 (4/6) ^a
Suabe de arrasto (9/33)	44,4 (4/9) ^a
Produto avícola envolvido em surto de salmonelose (12/33)	75 (9/12) ^a
% Total (n/N)	60, 6 (20/33)

* Letras iguais na mesma coluna entre diferentes origens não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Todas as cepas de *E. coli* provenientes de lesão de colibacilose e superfície de matadouro – frigorífico demonstraram capacidade de adesão a 4°C e a 12°C. Dos isolados de celulite, aproximadamente 53% formaram biofilme a 4°C e 51,2% a 12°C. Das cepas de cama de aviário, 35% demonstraram habilidade em formar biofilme a 4°C e 40% a 12°C. Ainda, foi verificado que 41% (30/73) dos isolados tiveram capacidade de formação de biofilme nas temperaturas de 4°C e 12°C. Deste total, 20 eram

originários de lesão de celulite, seis de cama de aviário, três de lesão de colibacilose e uma amostra de superfície de matadouro-frigorífico (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência absoluta (%) e relativa (n/N) de cepas de *Escherichia coli* formadoras de biofilme a 4°C e 12°C classificadas de acordo com a origem.

Origem (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 4°C (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 12°C (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 4°C e 12°C (n/N)
Lesão celulite (45/73)	53,4 (24/45) ^a	51,2 (23/45) ^a	44,4 (20/45) ^a
Cama de aviário (20/73)	35 (7/20) ^a	40 (8/20) ^a	40 (6/20) ^a
Lesão colibacilose (6/73)	50 (3/6) ^a	50 (3/6) ^a	50 (3/6) ^a
Superfície matadouro-frigorífico (2/73)	50 (1/2) ^a	50 (1/2) ^a	50 (1/2) ^a
% Total (n/N)	48 (35/73)	48 (35/73)	41 (30/73)

* Letras iguais na mesma coluna entre diferentes origens não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Das 73 cepas de *C. jejuni* provenientes de carcaça/cortes de frango, 31,8% formaram biofilme a 4°C e a 25°C e 31,5% a 12°C. Dos sete isolados de água de *chiller/pré-chiller*, 71,4%, 57,1% e 42,5% tiveram a habilidade de formar biofilme a 4°C, 12°C e a 25°C, respectivamente. A única cepa de suabe de cloaca formou biofilme em todas as temperaturas avaliadas. Das oito cepas de caixa de transporte, 25% aderiram a 4°C e 12°C e 62,5% a 25°C. No geral, das 89 cepas de *C. jejuni*, 24 (27%) delas apresentaram habilidade de adesão a 4°C, 12°C e a 25°C, das quais 18 isolados eram provenientes de carcaça ou cortes de frango, três de água do *chiller* ou *pré-chiller*, uma de suabe de cloaca e duas de caixa de transporte de aves (Tabela 4). Cabe ressaltar ainda que, duas cepas de carcaça e uma de água de *chiller/pré-chiller* formaram biofilme a 4°C e 12°C e a 12°C e 25°C, respectivamente (dados não apresentados).

Tabela 4 - Frequência absoluta (%) e relativa (n/N) de cepas de *Campylobacter jejuni* formadoras de biofilme a 4°C, 12°C e 25°C classificadas de acordo com a origem.

Origem (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 4°C (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 12°C (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 25°C (n/N)	% cepas formadoras de biofilme a 4°C, 12°C e 25°C (n/N)
Carcaça/cortes de frango (73/89)	31,8 (24/73) ^a	31,5 (23/73) ^a	31,8 (24/73) ^a	24,7 (18/73) ^a
Água chiller/ pré-chiller (7/89)	71,4 (5/7) ^a	57,1 (4/7) ^a	42,8 (3/7) ^a	42,8 (3/7) ^a
Suabe de cloaca (1/89)	100 (1/1) ^a	100 (1/1) ^a	100 (1/1) ^a	100 (1/1) ^a
Suabe de caixa de transporte (8/89)	25 (2/8) ^a	25 (2/8) ^a	62,5 (5/8) ^a	25 (2/8) ^a
% Total (n/N)	36 (32/89)	33,7 (30/89)	37 (33/89)	27 (24/89)

* Letras iguais na mesma coluna entre diferentes origens não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Não foi constatada diferença significativa na proporção de isolados formadores e não formadores de biofilme para as três espécies avaliadas, considerando as diferentes origens (p<0,05). Da mesma forma, para as cepas de *C. jejuni* e *E. coli*, que tiveram sua capacidade de formar biofilme verificada em mais de uma temperatura, não foi observada diferença na adesão entre as temperaturas considerando a mesma origem de isolamento (p<0,05).

5.2 Experimento 2 - Prevenção e remoção de biofilmes monoespécies de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em microplacas de poliestireno

Os resultados dos ensaios de prevenção e remoção do biofilme de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*, utilizando AC, AM, ramnolipídeo e CB foram expressos em gráficos demonstrando os percentuais de prevenção/remoção do biofilme para cada espécie avaliada. A fim de facilitar a interpretação dos dados, foi realizada a seguinte classificação: 1) Cepas que não tiveram prevenção/remoção do biofilme; 2) cepas que tiveram prevenção/remoção de até 50% do biofilme; e 3) cepas que tiveram prevenção/remoção de mais de 51% do biofilme.

5.2.1 Ensaios de prevenção do biofilme

5.2.1.1 Ácido cítrico

Ao avaliar o efeito de prevenção do biofilme de *S. Enteritidis* utilizando o AC (Figura 1A), verificou-se que a 4°C não houve diferença significativa na proporção de cepas entre os percentuais de prevenção do biofilme para as concentrações de 2% e 10% e 5% e 10%, mas houve entre 2% e 5% ($p < 0,05$). A 5% e a 10%, nesta temperatura, pôde-se constatar que cerca de 70% dos isolados teve a formação do biofilme prejudicada em maior ou menor grau. A 12°C observou-se que, para a maioria das cepas, o efeito antiadesivo do AC foi nulo a 2% e a 5%, contudo, a 10% o AC forneceu até 50% de prevenção do biofilme para cerca de 60% das cepas, e mais de 51% para 5% delas. A 25°C o AC a 10% teve seu melhor desempenho para *S. Enteritidis*, prevenindo mais de 50% do biofilme para quase todas as cepas analisadas. Ao analisar o efeito da temperatura sobre a mesma concentração do AC, verificou-se que seu uso a 2% não teve influência da temperatura quanto à prevenção do biofilme ($p > 0,05$). A 5%, o AC demonstrou teve sua eficácia comprometida a 12°C, não fornecendo qualquer efeito de prevenção do biofilme para praticamente 70% das cepas. A 10% foi observado um melhor desempenho do produto a 25°C em relação ao seu uso a 4°C ($p < 0,05$).

Para os isolados de *E. coli* e *C. jejuni*, o percentual de prevenção do biofilme não variou significativamente entre as concentrações dentro da mesma temperatura para todas as temperaturas avaliadas ($p > 0,05$) (Figuras 2A e 3A). Contudo, a 25°C todas as concentrações tiveram melhor eficácia na prevenção do biofilme para *E. coli* ($p < 0,05$).

Para *C. jejuni*, apenas o AC a 2% apresentou diferença significativa de atuação entre as temperaturas, sendo observado um melhor desempenho a 25°C, reduzindo em mais de 51% a formação do biofilme para aproximadamente 60% das cepas ($p < 0,05$).

De modo geral, pôde-se verificar que o AC teve atuação antimicrobiana sobre a formação do biofilme de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em todas as concentrações e temperaturas avaliadas. No entanto, a 25°C foi constatada uma melhor eficácia deste AO na prevenção do biofilme.

5.2.1.2 Ácido málico

A prevenção do biofilme de *S. Enteritidis* utilizando AM não apresentou diferença significativa entre as concentrações para a mesma temperatura ($p > 0,05$) (Figura 1B). No entanto, foi constatada uma melhor atuação desta substância a 25°C, independente da concentração avaliada, prevenindo mais de 51% da formação do biofilme para mais de 60% das cepas ($p < 0,05$).

Para os isolados de *E. coli*, não se observou diferença de atuação do AM entre as concentrações, dentro da mesma temperatura, a 4°C e 25°C (Figura 2B). A exceção foi para o AM a 12°C, que apresentou diferença no grau de prevenção do biofilme em todas as concentrações ($p < 0,05$). Ao analisar o efeito da temperatura sobre cada concentração, observou-se que para mais de 60% dos isolados a prevenção do biofilme não ocorreu a 4°C utilizando o AM a 2%. A 12°C e a 25°C, este número caiu para 50%, e aproximadamente 40%, respectivamente ($p < 0,05$). A 10%, o AM demonstrou diferença de desempenho somente a 12°C, e a 5% não houve diferença significativa sobre a prevenção do biofilme entre as temperaturas ($p < 0,05$).

Não foi verificada diferença no efeito antiadesivo das diferentes concentrações do AM sobre a formação de biofilme das cepas de *C. jejuni* a 4°C e 25°C (Figura 3B). Apenas a 12 °C houve diferença significativa entre as concentrações, sendo observado um maior número de isolados que tiveram mais de 51% de prevenção do biofilme a 5% e 10% em relação a 2% ($p < 0,05$). Ainda, não foi constatada influência da temperatura sobre o efeito antibiofilme do AM para as cepas *C. jejuni* em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,05$). Pôde-se observar que, de modo geral, o AM demonstrou efeito antibiofilme em todas as concentrações e temperaturas avaliadas para os três microrganismos. Porém, o melhor desempenho foi observado a 12°C e 25°C, principalmente quando utilizado a 5% e 10%.

5.2.1.3 Ramnolipídeo

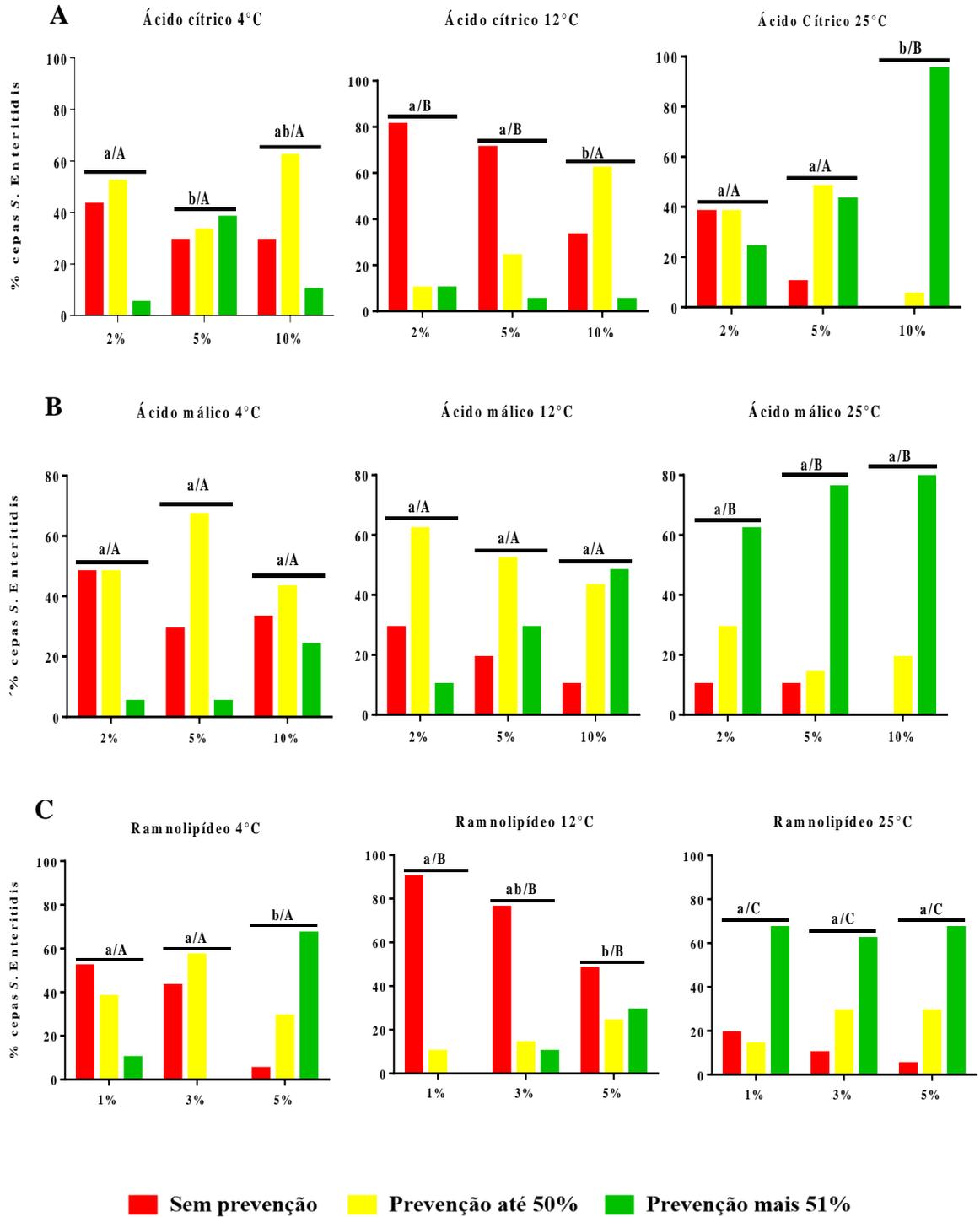
O efeito antiadesivo do ramnolipídeo para *S. Enteritidis* a 4°C foi maior a 5%, sendo observado um efeito de prevenção maior que 51% para mais de 60% das cepas avaliadas (Figura 1C). A 12°C foi verificado um baixo percentual de prevenção do biofilme entre as cepas, sendo que a 1% e 3% não houve atividade antibiofilme para mais de 70% delas. A 25°C não foi observada diferença significativa nos percentuais de prevenção do biofilme entre as concentrações ($p>0,05$). Ao analisar o ramnolipídeo 1%, observou-se diferença na proporção dos isolados entre os percentuais de prevenção do biofilme para todas as temperaturas, sendo o melhor efeito antiadesivo verificado a 25°C ($p<0,05$). A 5% não houve diferença na prevenção do biofilme em temperaturas avaliadas, e 3% não houve diferença entre 12°C e 25°C ($p>0,05$).

Os percentuais de prevenção para *E. coli* demonstraram diferença significativa na proporção de isolados entre todas as concentrações a 12°C, mas não a 4°C e a 25°C (Figura 2C) ($p<0,05$). Ainda, o ramnolipídeo a 1% e 3% apresentou uma melhor atuação a 25°C, fornecendo efeito antiadesivo para cerca de 70% dos isolados. A 5% esta substância também teve seu melhor desempenho, reduzindo a formação do biofilme em mais de 51% para aproximadamente 80% das cepas de *E. coli* ($p<0,05$).

Para *C. jejuni* (Figura 3C), não foi verificada diferença significativa entre as concentrações do ramnolipídeo considerando a mesma temperatura, bem para uma mesma concentração entre as temperaturas ($p<0,05$).

Assim como os AO, o ramnolipídeo atuou prevenindo o biofilme em todas as concentrações e temperaturas testadas. No entanto seu efeito antimicrobiano variou conforme o microrganismo. Para *S. Enteritidis*, o ramnolipídeo apresentou melhor atuação a 4°C e 25°C nas maiores concentrações. Para *E. coli* a 12°C, esta substância teve melhor desempenho a 3% e 5%, e a 25°C em basicamente todas as concentrações avaliadas. Com relação as cepas de *C. jejuni*, este biosurfactante teve comportamento antibiofilme similar, independente da temperatura e concentração.

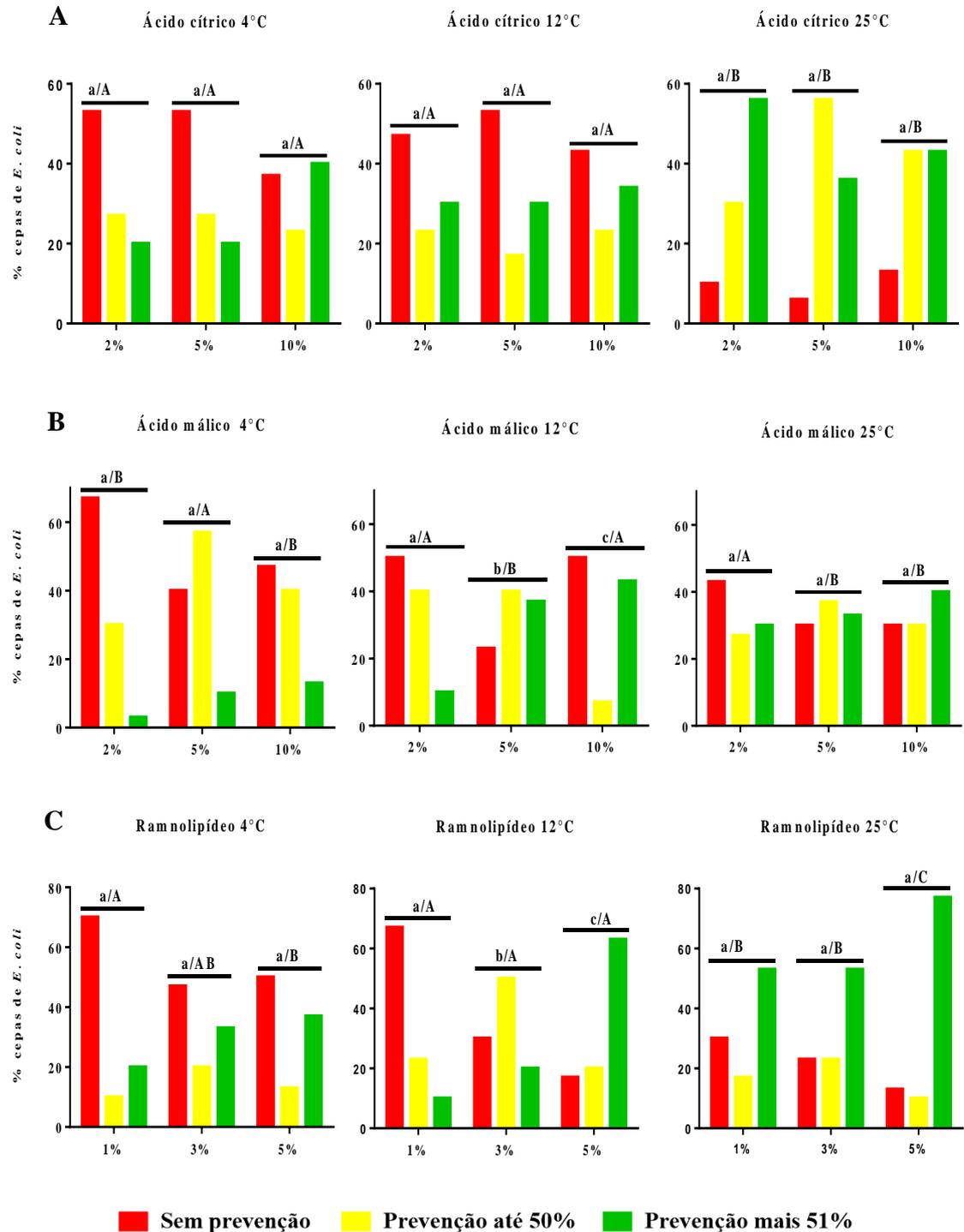
Figura 1 – Percentuais de prevenção do biofilme de *Salmonella* Enteritidis a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (A) a 2%, 5% e 10%, ácido málico (B) a 2%, 5%, 10% e ramnolipídeo (C) a 1%, 3%, 5%.



*Letras minúsculas iguais entre as concentrações na mesma temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

**Letras maiúsculas iguais para a mesma concentração entre as temperaturas não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

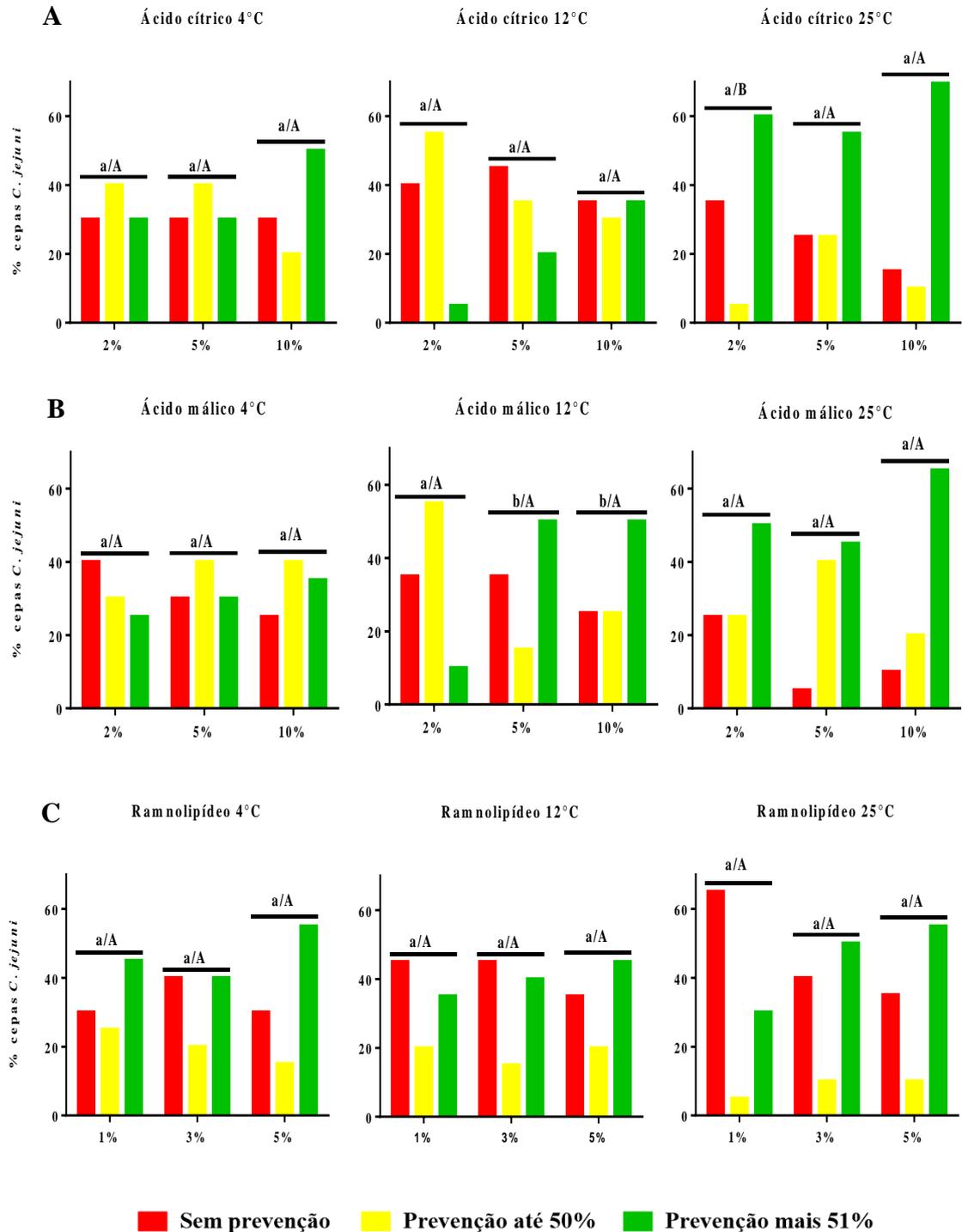
Figura 2 – Percentuais de prevenção do biofilme de *Escherichia coli* a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (A) a 2%, 5% e 10%, ácido málico (B) a 2%, 5%, 10% e ramnolípídeo (C) a 1%, 3%, 5%.



*Letras minúsculas iguais entre as concentrações na mesma temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

**Letras maiúsculas iguais para a mesma concentração entre as temperaturas não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Figura 3 – Percentuais de prevenção do biofilme de *Campylobacter jejuni* a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (A) a 2%, 5% e 10%, ácido málico (B) a 2%, 5%, 10% e ramnolipídeo (C) a 1%, 3%, 5%.



*Letras minúsculas iguais entre as concentrações na mesma temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

**Letras maiúsculas iguais para a mesma concentração entre as temperaturas não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

5.2.2 Ensaio de remoção do biofilme

5.2.2.1 Ácido cítrico

Ao avaliar o efeito do AC em percentuais de remoção do biofilme em *S. Enteritidis* (Figura 4A), verificou-se diferença significativa entre quase todas as concentrações dentro de cada temperatura avaliada ($p < 0,05$). A 4°C foi constatada que para cerca de 80% das cepas, a remoção do biofilme com AC nas concentrações de 5% com dez minutos e 10% nos dois tempos de contato foi de até 50%. A 12°C o AC obteve o melhor desempenho quando utilizado a 10% por dez minutos, sendo que apenas 10% das cepas não tiveram qualquer indício de remoção do biofilme. A 25°C esta substância forneceu percentuais de remoção do biofilme de *S. Enteritidis* superiores a 40% nas concentrações de 5% e 10%, independente do tempo de exposição. Ao considerar o efeito da temperatura sobre uma mesma concentração e tempo de contato, observou-se que o AC 5% e 10% com dez minutos de contato foram os tratamentos que forneceram variação significativa na proporção de isolados entre os níveis de remoção do biofilme para todas as temperaturas testadas ($p < 0,05$). De modo geral, uma melhor atuação do AC para *S. Enteritidis* foi obtida a 25°C, seguida de 4°C e 12°C. Cabe ressaltar também que este efeito de remoção é mais evidente para as maiores concentrações, 5% e 10%.

Para os isolados de *E. coli* (Figura 5A), observou-se a 4°C uma proporção similar de cepas que não tiveram qualquer grau de remoção, que tiveram remoção até 50% e mais de 51% nas concentrações de 2% e 5% com cinco e dez minutos de contato. Um melhor desempenho foi verificado a 10%, independente do tempo de exposição a este AO. Nesta concentração, o percentual de cepas que obtiveram algum grau de remoção de biofilme foi significativamente superior em relação as demais concentrações ($p < 0,05$). A 12°C, o AC não foi capaz de prevenir a formação do biofilme mais de 45% das cepas quando utilizado a 2% por cinco e dez minutos e a 5% por cinco minutos. Com o aumento da concentração para 10%, foi possível verificar um incremento na proporção de cepas de *E. coli* que tiveram remoção do biofilme pré-formado ($p < 0,05$). A 25°C não foi verificada diferença significativa na atuação do AC entre as concentrações utilizadas ($p > 0,05$). O efeito da temperatura sobre a atuação do AC foi observado apenas para 2% independente do tempo de exposição, sendo o melhor desempenho a 4°C, onde 60% das cepas teve até 50% do biofilme removido ($p < 0,05$).

De fato, ao analisar a eficácia do AC entre as temperaturas, observou-se que, de um modo geral, a 4°C esta substância teve melhor atuação em relação a 12°C e 25°C.

A atuação do AC sobre o biofilme pré-formado de *C. jejuni* (Figura 6A) demonstrou que a 4°C a concentração de 10% com dez minutos de contato teve melhor atuação, removendo o biofilme em mais de 51% para quase 60% das cepas ($p < 0,05$). A 12°C não foi verificada diferença significativa de desempenho entre as concentrações ($p > 0,05$). A 25°C foi observada uma atuação similar entre as concentrações, com exceção de 2% com cinco minutos de contato, a qual demonstrou efeito de remoção inferior comparado as demais concentrações ($p < 0,05$). A influência da temperatura sobre a remoção do biofilme de *C. jejuni* foi constatada para 2% com 10 minutos de exposição, 5% independente do tempo de contato e 10% com cinco minutos de contato. A 12°C e 25°C, a quantidade de cepas que teve o biofilme removido em mais de 51% foi significativamente superior nestas concentrações, em relação a 4°C ($p < 0,05$). Assim como para *S. Enteritidis*, o AC teve uma melhor eficácia na remoção do biofilme a 12°C e 25°C comparado a 4°C para quase todas as concentrações.

5.2.2.2 Ácido málico

Ao analisar a atuação do AM sobre as cepas de *S. Enteritidis* (Figura 4B) a 4°C e 12°C, verificou-se que a 5% e 10%, esta substância teve melhor desempenho comparado a 2% ($p < 0,05$). A 25°C apenas a 10%, independente do tempo de contato, observou-se melhor atuação na remoção do biofilme em relação as demais concentrações avaliadas ($p < 0,05$). A influência da temperatura sobre a ação do AM foi constatada apenas para 2%, sendo o pior desempenho observado a 12°C, seguido de 4°C e 25°C, quando utilizado com cinco minutos de contato. Já 2% com 10 minutos de contato teve sua melhor atuação a 4°C ($p < 0,05$).

A ação de destruição do biofilme de *E. coli* com AM não demonstrou diferença significativa entre as concentrações para a mesma temperatura (Figura 5B) ($p > 0,05$). Contudo, houve diferença de atuação do AM entre as temperaturas quando utilizado a 10%, independente do tempo de exposição, sendo observado um melhor desempenho a 25°C comparado a 4°C e 12°C ($p < 0,05$).

Para as cepas de *C. jejuni* (Figura 6B), o AM não demonstrou diferença significativa de desempenho entre as concentrações a 4°C e 12°C ($p < 0,05$). A 25°C, foi verificado que, a partir do uso desta substância a 5%, a quantidade de isolados que

tiveram o biofilme removido também aumentou em relação a 2% ($p < 0,05$). A influência da temperatura na atuação do AM foi verificada para 2% nos dois tempos de contato, 5% com cinco minutos e 10% com dez minutos ($p < 0,05$). De modo geral, observou-se que a 12°C e a 25°C houve um aumento na quantidade de isolados que tiveram o biofilme removido em mais de 51% em relação a 4°C.

5.2.2.3 Ramnolipídeo

O ramnolipídeo, quando utilizado a 4°C, apresentou significativamente mais isolados de *S. Enteritidis* com algum grau de remoção de biofilme a 3% e 5%, quando comparado a 1% ($p < 0,05$) (Figura 4C). A 12°C, foi observado um melhor desempenho desta substância quando feito o uso a 5%, independente do tempo de contato ($p < 0,05$). A 25°C, não se evidenciou qualquer diferença de atuação entre as concentrações ($p > 0,05$). Para quase a totalidade das concentrações não foi verificada influência da temperatura sobre a atuação do ramnolipídeo, a não ser para 1% com dez minutos de contato, a qual teve melhor desempenho a 25°C, seguido de 12°C e 4°C ($p < 0,05$).

Para as cepas de *E. coli* (Figura 5C), não foi observada diferença significativa quanto à remoção do biofilme entre as concentrações considerando as temperaturas de 12°C e 25°C ($p > 0,05$). A 4°C, o ramnolipídeo a 3% e a 5% apresentaram remoção do biofilme para a maioria dos isolados ($p < 0,05$). A temperatura influenciou na atuação do ramnolipídeo apenas quando utilizado a 1% com cinco minutos de contato, sendo verificada uma melhor atuação a 25°C, comparado a 4°C e 12°C ($p < 0,05$).

O desempenho do biosurfactante (Figura 6C) na remoção do biofilme de *C. jejuni* foi similar entre as concentrações na mesma temperatura ($p < 0,05$). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa para mesma concentração entre as temperaturas ($p > 0,05$).

5.2.2.4 Cloreto de benzalcônio

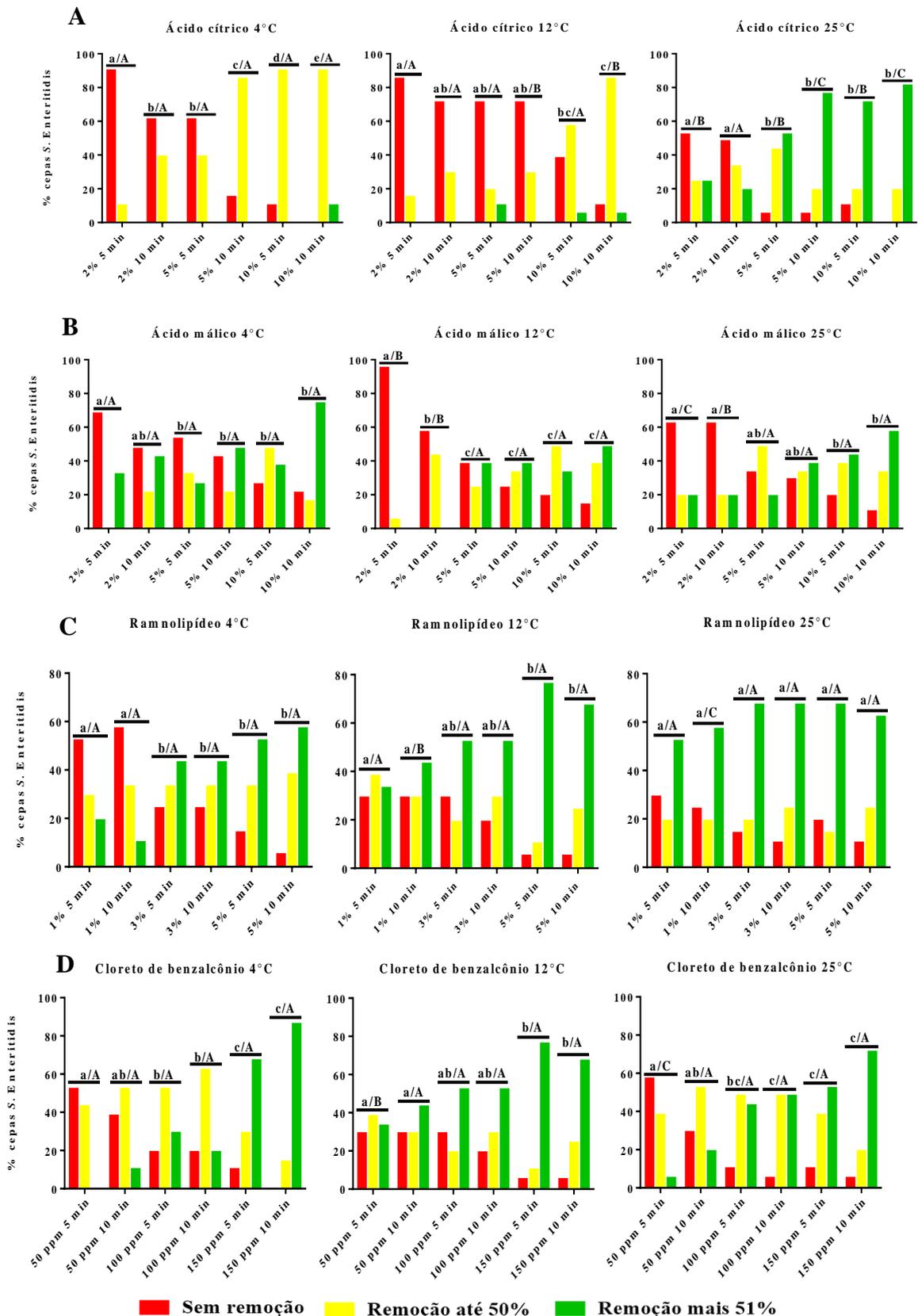
Para as cepas de *S. Enteritidis* o cloreto de benzalcônio (CB) a 4°C teve melhor atuação na remoção do biofilme quando empregado a 150 ppm, seguido de 100 ppm e, por último, 50 ppm, independente do tempo de contato ($p < 0,05$) (Figura 4D). A 12°C os maiores percentuais de remoção do biofilme foram fornecidos pelo uso do desinfetante a 150 ppm ($p < 0,05$). A 25°C este melhor desempenho foi observado a 100 ppm com dez

minutos e 150 ppm em ambos os tempos de contato avaliados ($p < 0,05$). A influência da temperatura sobre a remoção do biofilme foi verificada apenas para 50 ppm com cinco minutos ($p < 0,05$).

Não foi observada diferença significativa na atuação do CB para as cepas de *E. coli* entre as concentrações dentro mesma temperatura para todas as temperaturas testadas ($p > 0,05$) (Figura 5D). Apenas 150 ppm com cinco minutos de contato teve atuação similar na remoção do biofilme entre 4°C e 12°C. Para os outros cinco tratamentos foi evidenciado um melhor desempenho a 25°C, seguido de 12°C e 4°C ($p < 0,05$).

Assim como observado para *E. coli*, não foi constatada diferença significativa na remoção do biofilme de *C. jejuni* (Figura 6D) entre as concentrações e seus respectivos tempos de contato dentro da mesma temperatura ($p > 0,05$). Contudo, a 25°C todas as concentrações tiveram melhor eficiência na remoção do biofilme comparado a 4°C e 12°C ($p < 0,05$).

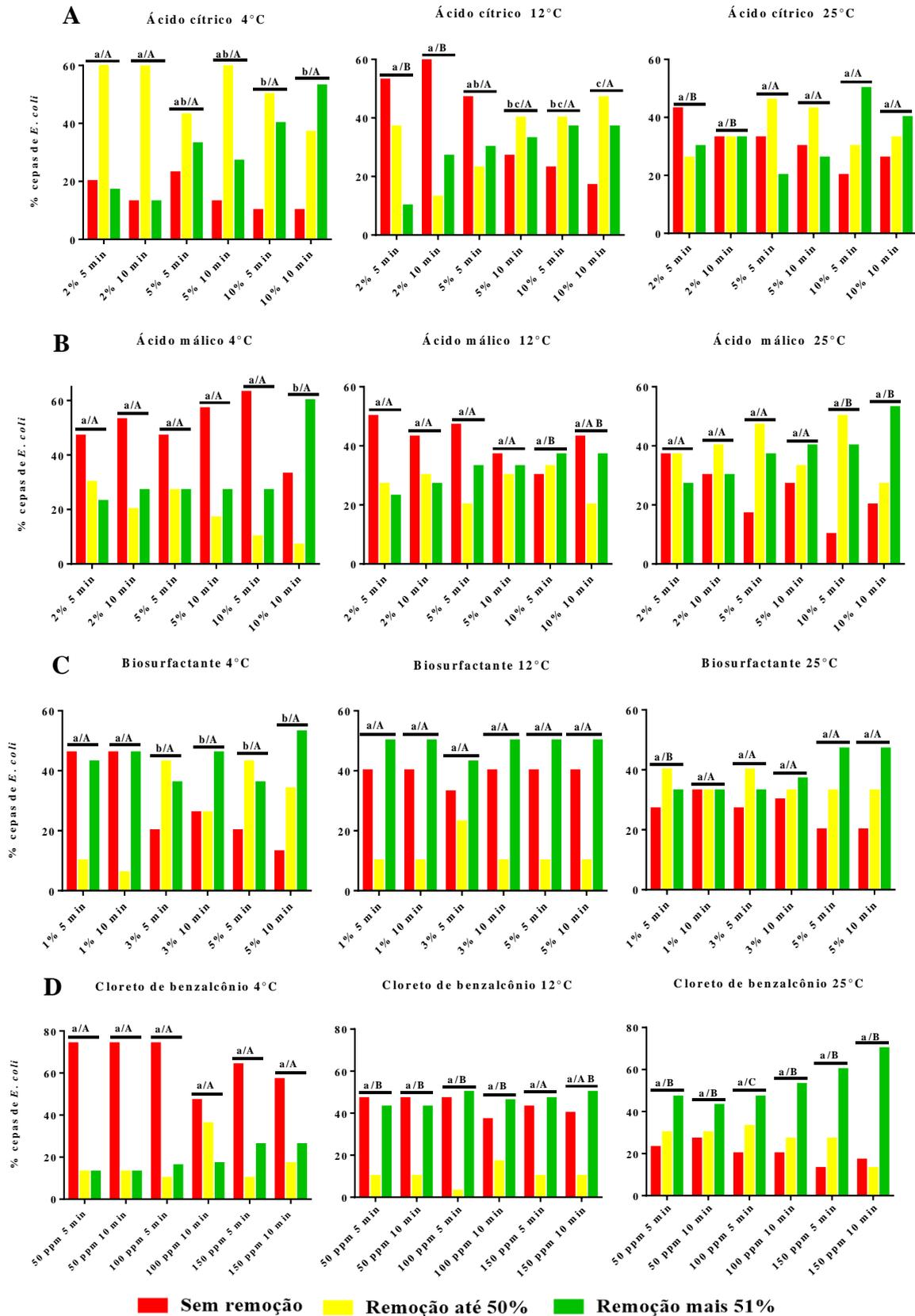
Figura 4 – Percentuais de remoção do biofilme de *Salmonella Enteritidis* formado a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (A) a 2%, 5% e 10%, ácido málico (B) a 2%, 5% e 10%, ramnolípídeo (C) a 1%, 3% e 5% e cloreto de benzalcônio (D) a 50, 100 e 150 ppm com cinco e dez minutos de contato.



*Letras minúsculas iguais entre os tratamentos para a mesma temperatura não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

**Letras maiúsculas iguais para o mesmo tratamento entre as diferentes temperaturas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

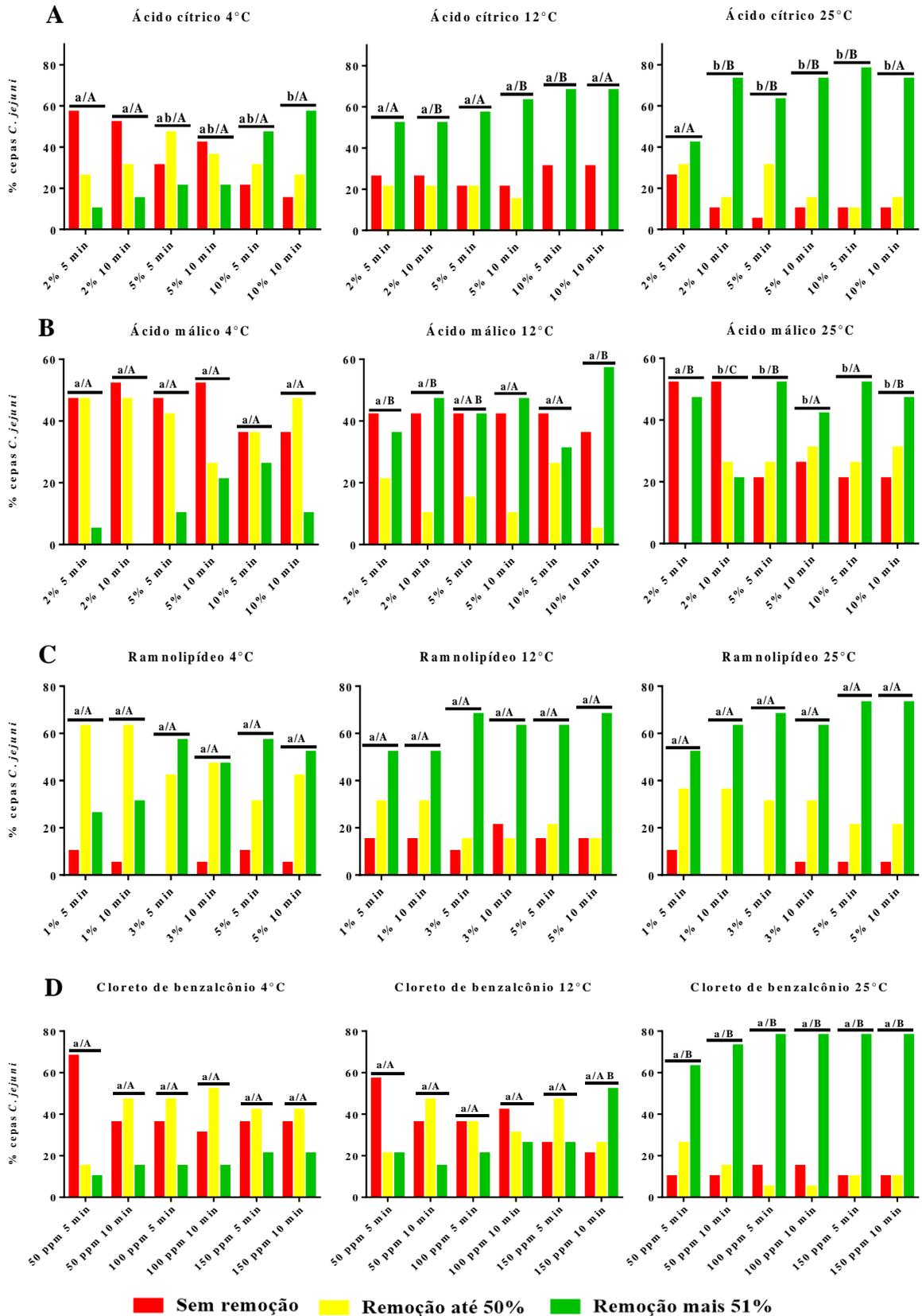
Figura 5 – Percentuais de remoção do biofilme de *Escherichia coli* formado a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (A) a 2%, 5% e 10%, ácido málico (B) a 2%, 5% e 10%, ramnolípídeo (C) a 1%, 3% e 5% e cloreto de benzalcônio (D) a 50, 100 e 150 ppm com cinco e dez minutos de contato.



*Letras minúsculas iguais entre os tratamentos para a mesma temperatura não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

**Letras minúsculas iguais para o mesmo tratamento entre as diferentes temperaturas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Figura 6 – Percentuais de remoção do biofilme de *Campylobacter jejuni* formado a 4°C, 12°C e 25°C utilizando ácido cítrico (A) a 2%, 5% e 10%, ácido málico (B) a 2%, 5% e 10%, ramnolípídeo (C) a 1%, 3% e 5% e cloreto de benzalcônio (D) a 50, 100 e 150 ppm com cinco e dez minutos de contato.



*Letras minúsculas iguais entre os tratamentos para a mesma temperatura não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

**Letras maiúsculas iguais para o mesmo tratamento entre as diferentes temperaturas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

Em resumo, os melhores resultados para prevenção da produção do biofilme de *S. Enteritidis* com AC e ramnolipídeo foram obtidos a 4°C e 25°C, já com AM foi 25°C. Para *E. coli*, os melhores resultados do AC foram a 25°C e do ramnolipídeo e AM a 12°C e 25°C. Para *C. jejuni*, todos os antimicrobianos atuaram de maneira semelhante, independente da temperatura.

A remoção do biofilme pré-formado de *S. Enteritidis* com AC teve melhor resultado quando utilizado a 25°C, já com AM, CB e ramnolipídeo o efeito antimicrobiano foi semelhante entre as temperaturas. Para *E. coli*, o AC, AM e o ramnolipídeo tiveram desempenho similar independente da temperatura, mas o CB teve melhor atuação a 12°C e 25°C. Para *C. jejuni* o CB e o AC tiveram resultados mais promissores a 25°C, o AM a 12°C e 25°C e o ramnolipídeo não demonstrou efeito da temperatura na remoção do biofilme deste patógeno.

5.3 Experimento 3 - Comparação da capacidade de adesão de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em aço inoxidável, polietileno e poliestireno

Todos os resultados das contagens foram expressos em \log_{10} UFC/cm.². Para as cepas de *S. Enteritidis* e *E. coli*, não foi verificada diferença significativa na adesão entre as três superfícies avaliadas ($p < 0,05$). A quantidade de células aderidas para *S. Enteritidis* variou entre 5,74 e 6,43 para o poliestireno, 5,10 e 6,44 para o aço inoxidável e 5,99 e 6,52 para o polietileno. Para *E. coli*, a adesão no poliestireno foi entre 5,99 e 6,75, de 5,50 a 6,70 no aço inoxidável e de 5,86 a 6,68 no polietileno.

Com relação as cepas de *C. jejuni*, observou-se uma maior habilidade de adesão no aço inoxidável em comparação com os polímeros ($p < 0,05$). A adesão das cepas variou entre 4,51 e 4,67 no aço inoxidável, 3,80 e 4,25 no poliestireno e 4,03 e 4,36 no polietileno. Na Figura 7 constam os gráficos comparando a adesão dos três microrganismos nas superfícies avaliadas.

Ao comparar a capacidade de adesão dos microrganismos considerando a mesma superfície (Figura 8), verificou-se que apenas o *C. jejuni* apresentou menor aderência em todas as superfícies avaliadas, quando comparado a *S. Enteritidis* e *E. coli* ($p < 0,05$).

Nas Figuras de 9 a 17 constam as imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a adesão de cada microrganismo nas diferentes superfícies avaliadas.

Figura 7 - Comparação da adesão das cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* no poliestireno, aço inoxidável e polietileno através do método de contagem em placa (\log_{10} .UFC.cm⁻²).

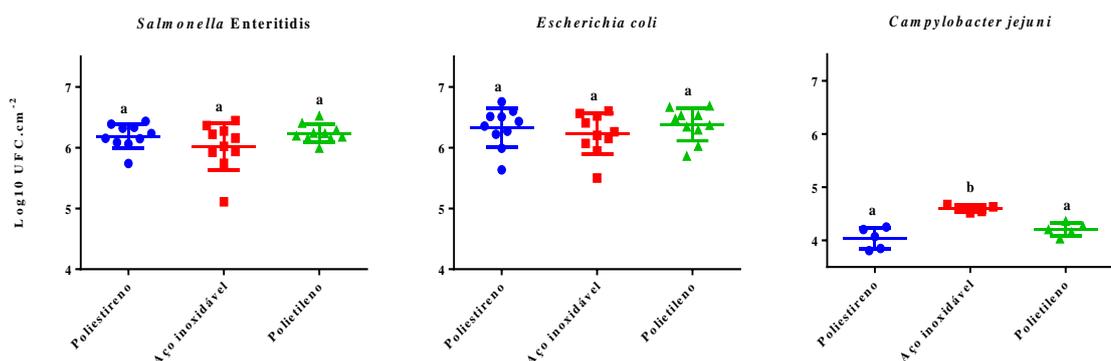


Figura 8 - Comparação da capacidade de adesão das cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* considerando a mesma superfície através do método de contagem em placa (\log_{10} .UFC.cm⁻²).

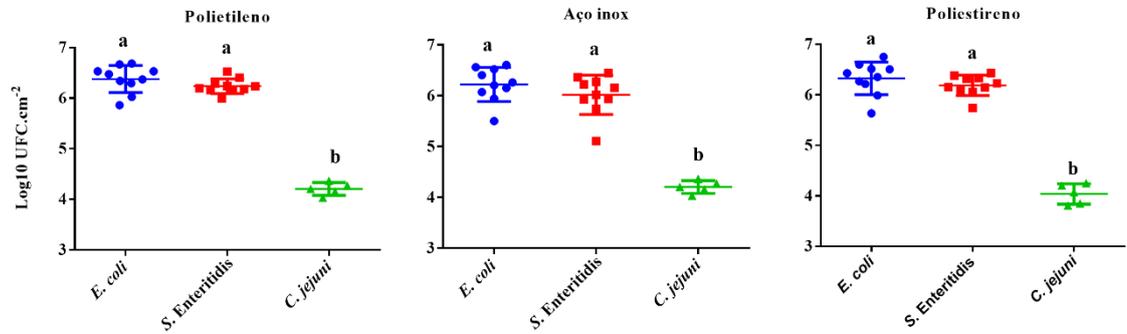


Figura 9 - Adesão da cepa de *Salmonella* Enteritidis no poliestireno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.

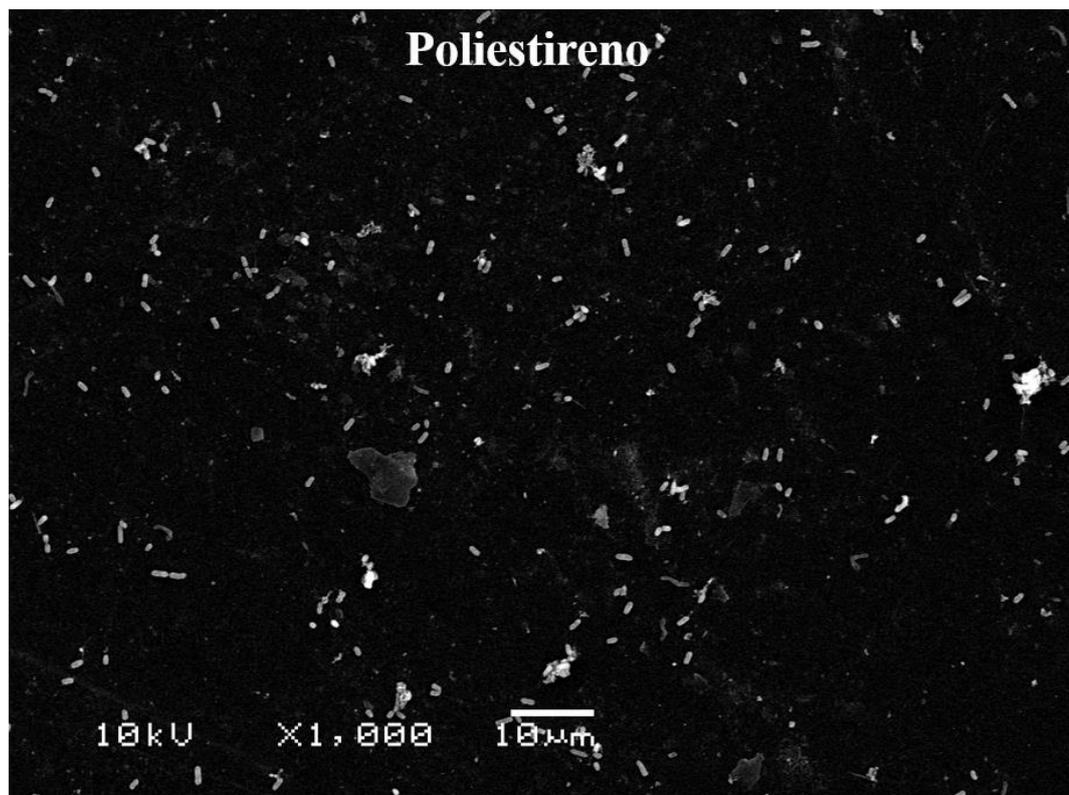


Figura 10 - Adesão da cepa de *Salmonella* Enteritidis no aço inoxidável observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.

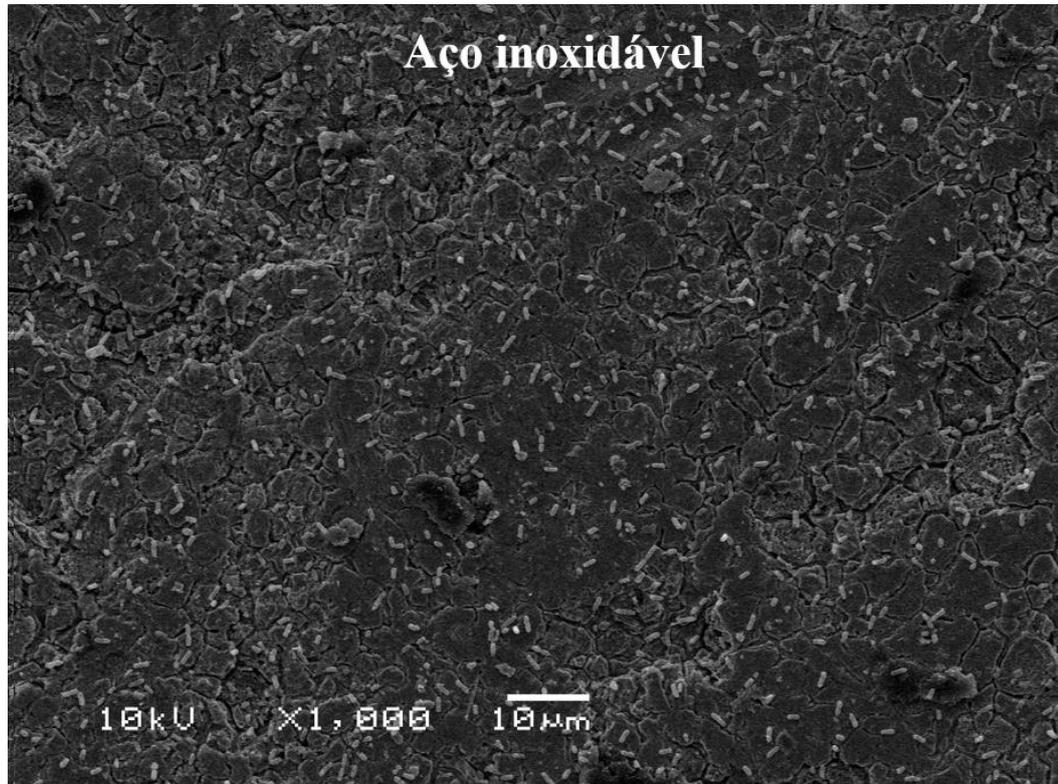


Figura 11 - Adesão da cepa de *Salmonella* Enteritidis no polietileno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x

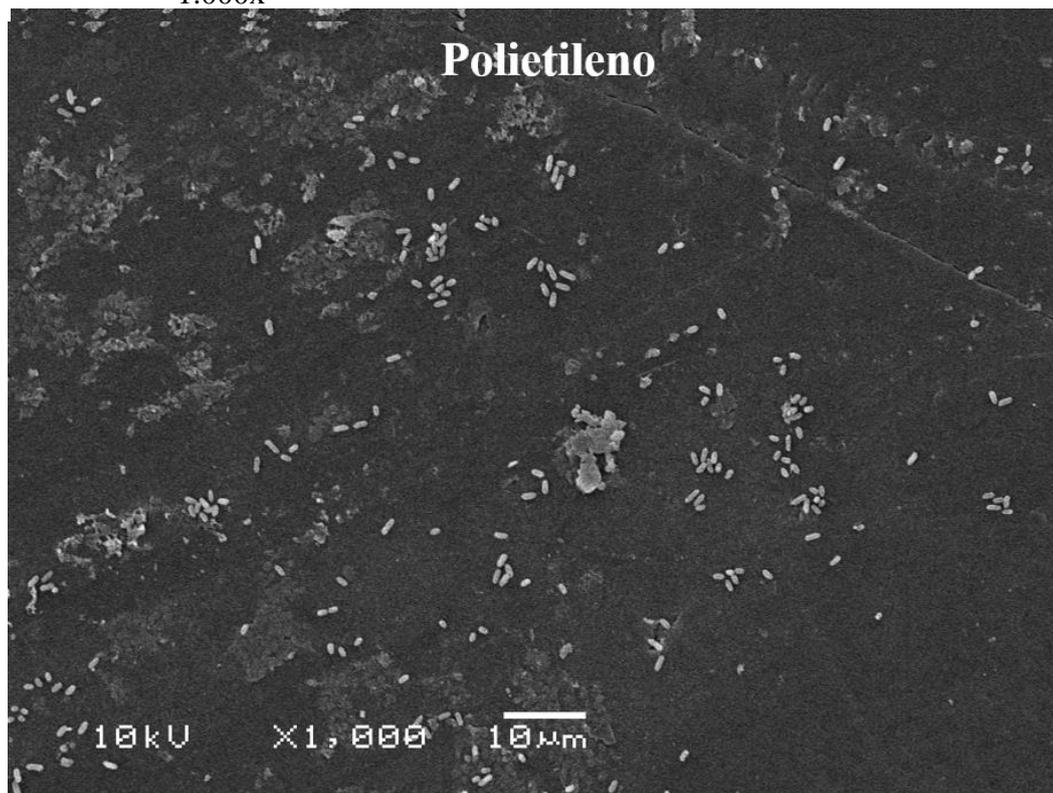


Figura 12 - Adesão da cepa de *Escherichia coli* no poliestireno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 2.000x.

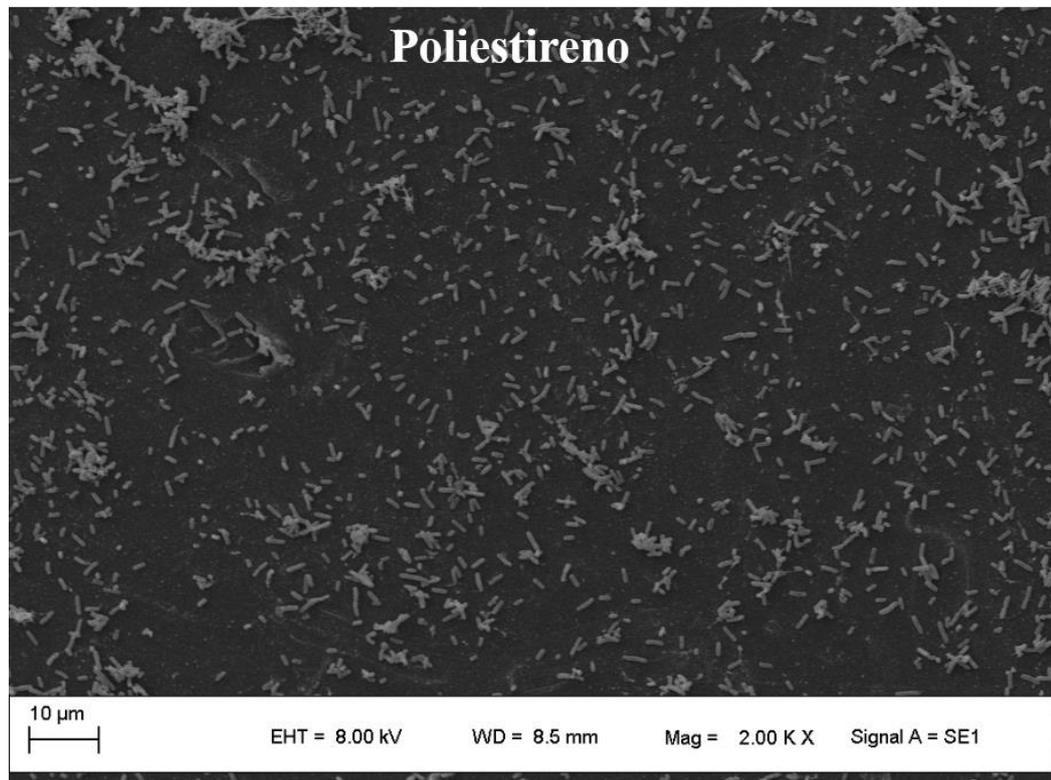


Figura 13 - Adesão da cepa de *Escherichia coli* no aço inoxidável observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 2.000x.

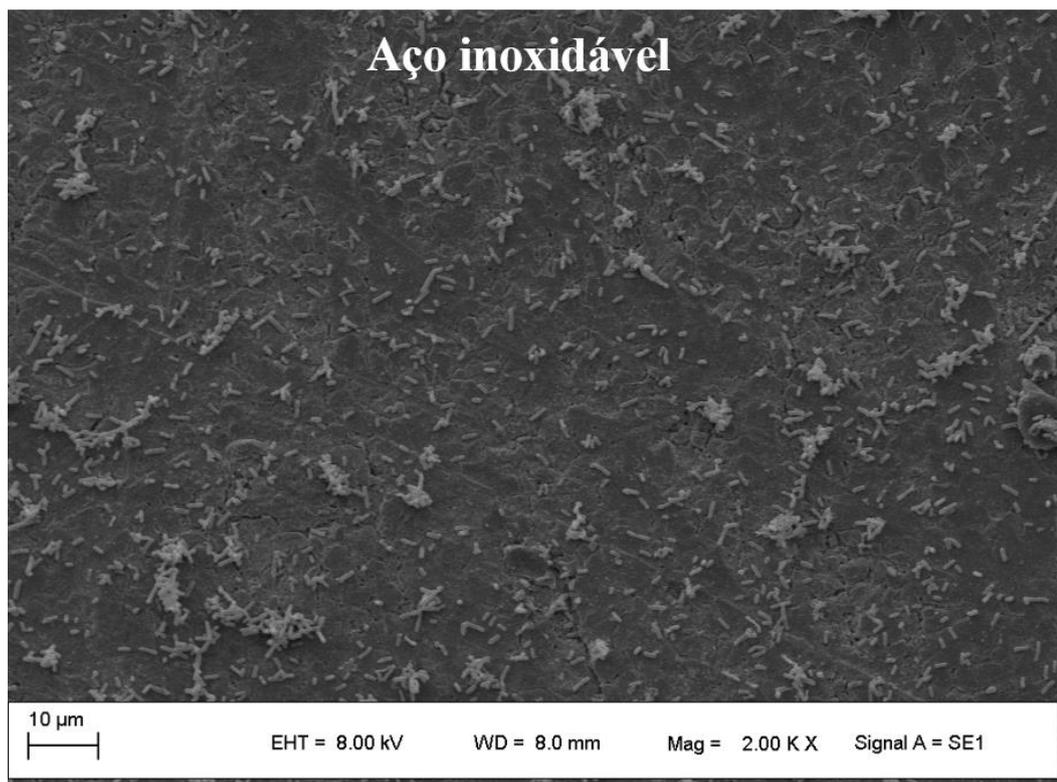


Figura 14 - Adesão da cepa de *Escherichia coli* no polietileno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 1.000x.

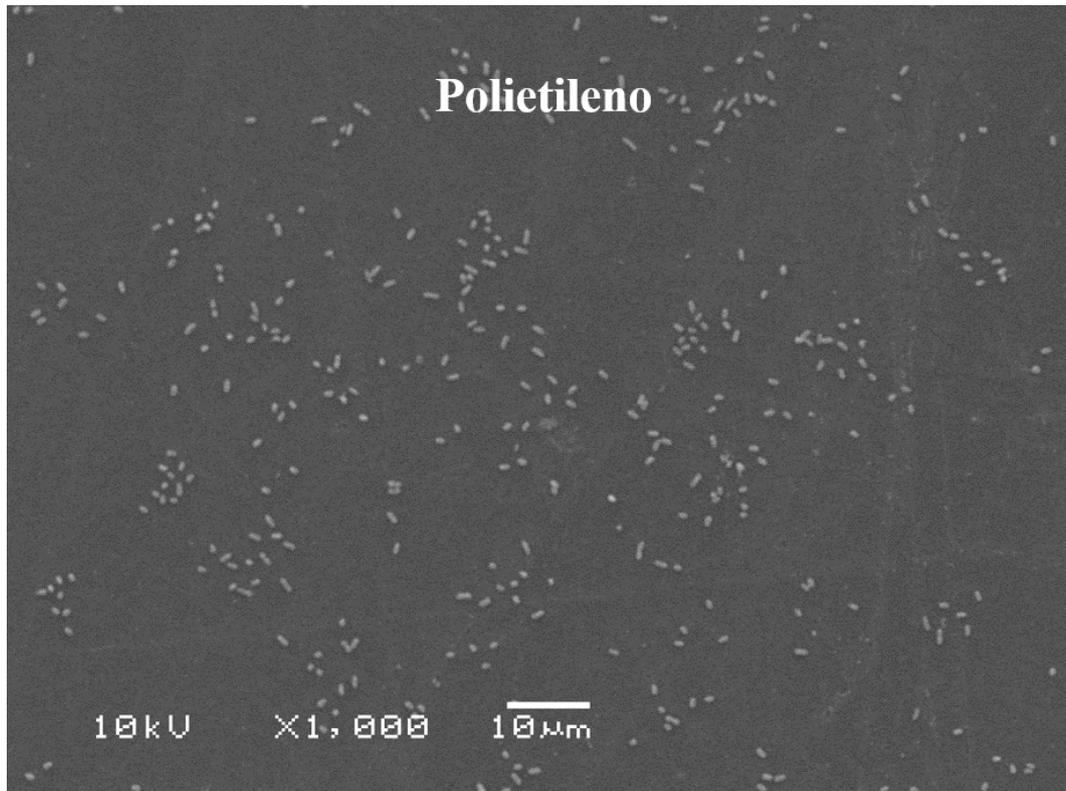


Figura 15 - Adesão da cepa de *Campylobacter jejuni* no poliestireno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 5.500x.

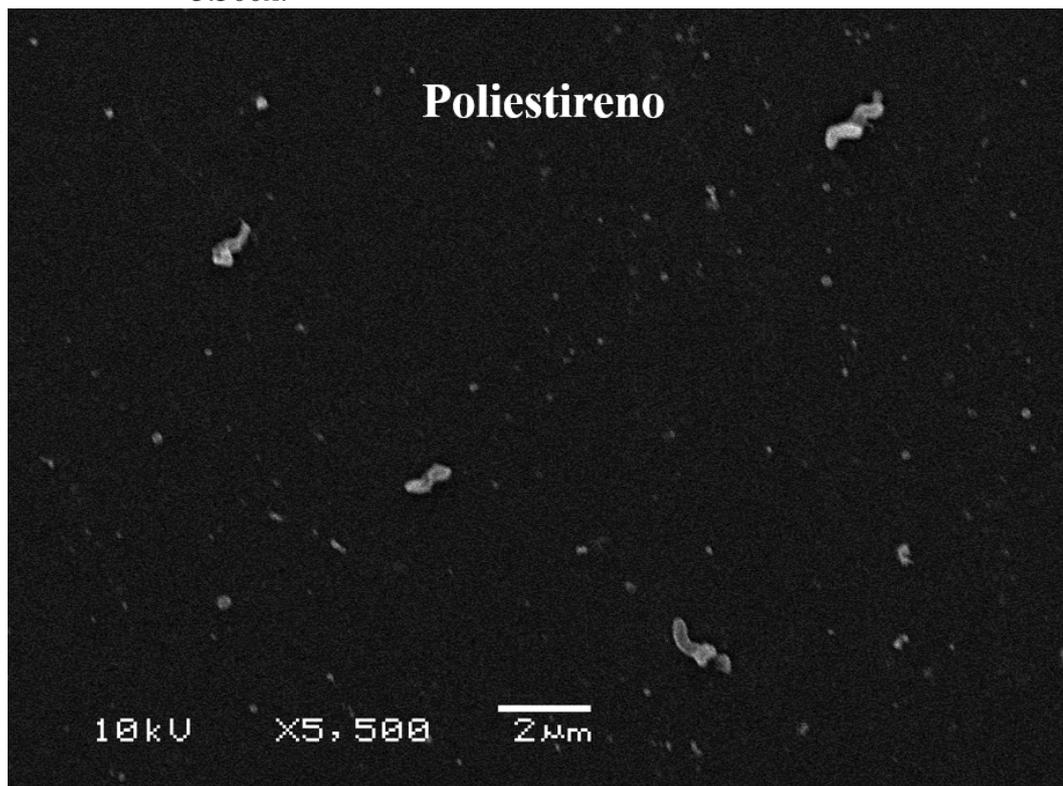


Figura 16 - Adesão da cepa de *Campylobacter jejuni* no aço inoxidável observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sumento 5.500x.

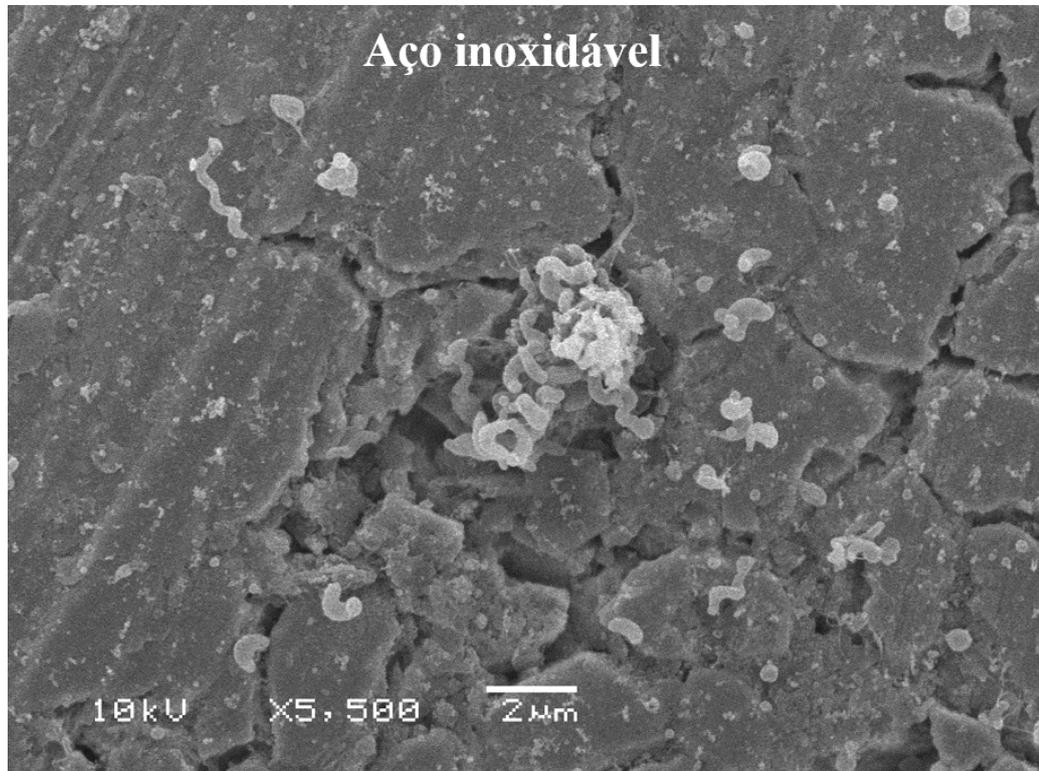
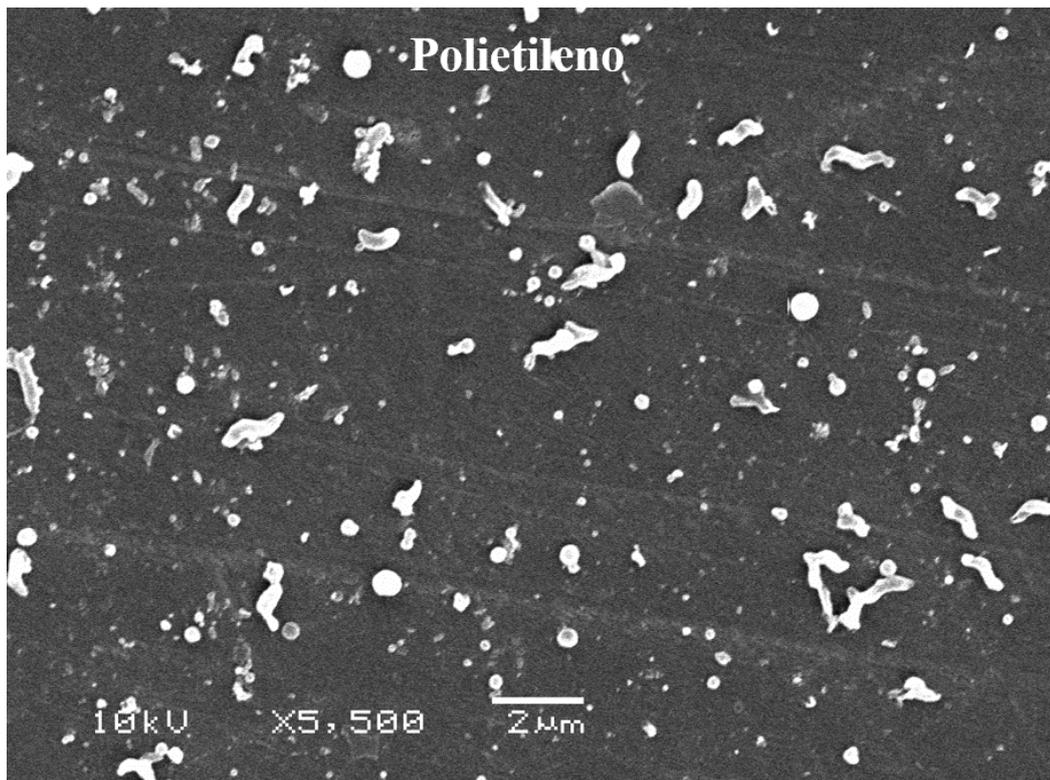


Figura 17 - Adesão da cepa de *Campylobacter jejuni* no aço polietileno observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Aumento 5.500 x.



5.4 Experimento 4 - Formação e remoção de biofilmes multiespécies de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em superfícies de matadouro-frigorífico de aves e desenvolvimento de modelagem preditiva

As cepas analisadas nesta etapa do estudo foram capazes de interagir para formação de biofilmes multiespécie em todas as combinações microbianas (1- *E. coli* + *S. Enteritidis*; 2- *E. coli* + *C. jejuni*; 3- *S. Enteritidis* + *C. jejuni*; 4- *E. coli* + *C. jejuni* + *S. Enteritidis*), temperaturas (4°C, 12°C e 25°C), superfícies (aço inoxidável e polietileno) e tempos de incubação (4, 12 e 24 horas).

Considerando o inóculo inicial de 10^8 UFC/mL de cada microrganismo, a taxa de recuperação nas superfícies variou entre 10^5 UFC.cm⁻² ($5 \log_{10}$.UFC.cm⁻²) a 10^6 UFC.cm⁻² ($6 \log_{10}$ UFC.cm⁻²) para *S. Enteritidis* e *E. coli*, e aproximadamente 10^4 UFC.cm⁻² ($4 \log_{10}$ UFC.cm⁻²), para *C. jejuni*, independente das condições testadas. Não foi evidenciada diferença significativa na adesão dos microrganismos (grupo controle) entre 4, 12 e 24 horas de incubação, considerando a mesma combinação microbiana, temperatura e superfície ($p > 0,05$). Nas figuras de 18 a 21 está representada a adesão dos três patógenos no aço inoxidável, de acordo com a combinação microbiana.

Figura 18 - Biofilme multiespécie de *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 1.800x; A2 Aumento 3.000x.

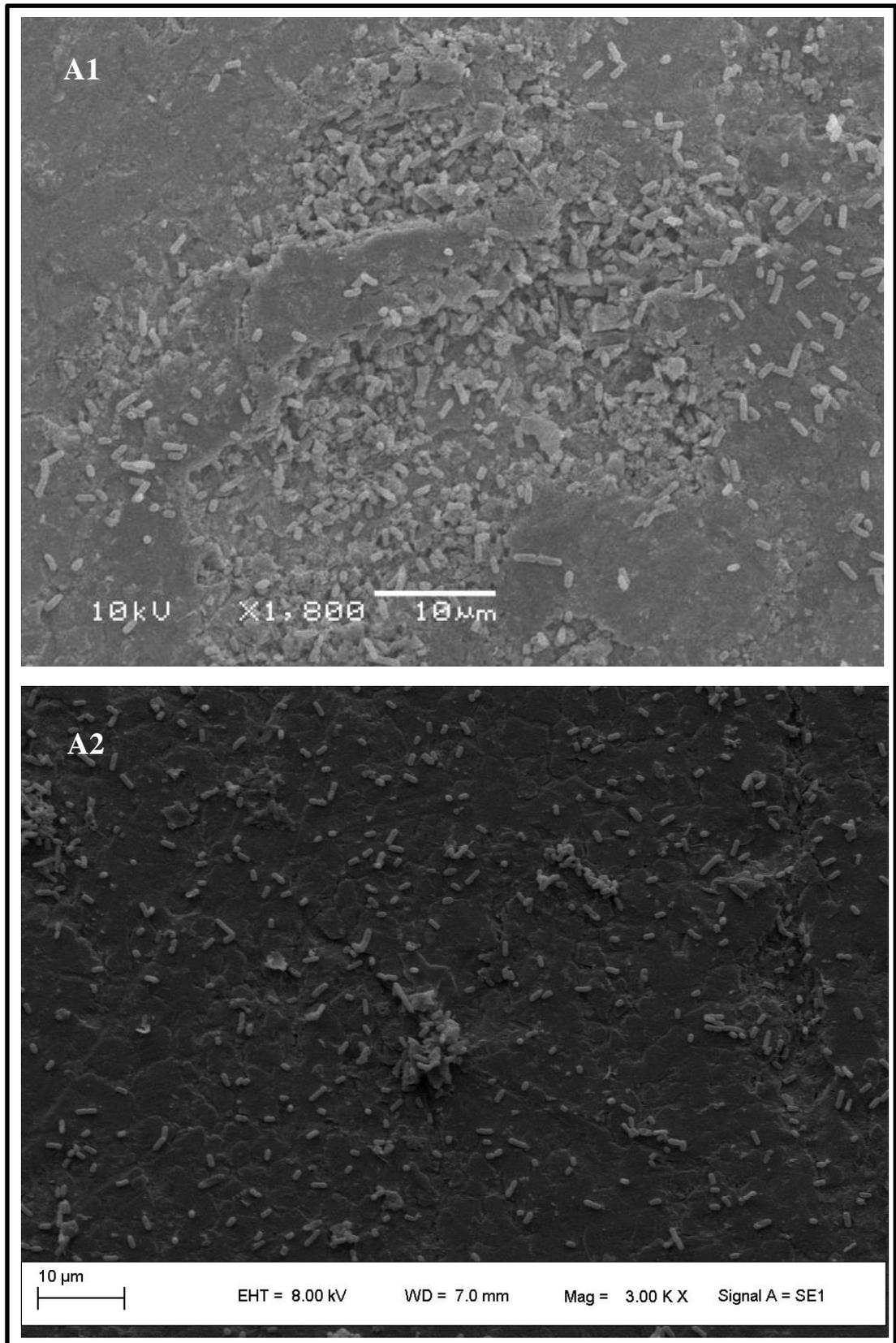


Figura 19 - Biofilme multiespécie de *Salmonella* Enteritidis + *Campylobacter jejuni* formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 5.500x; A2 Aumento 10.000x.

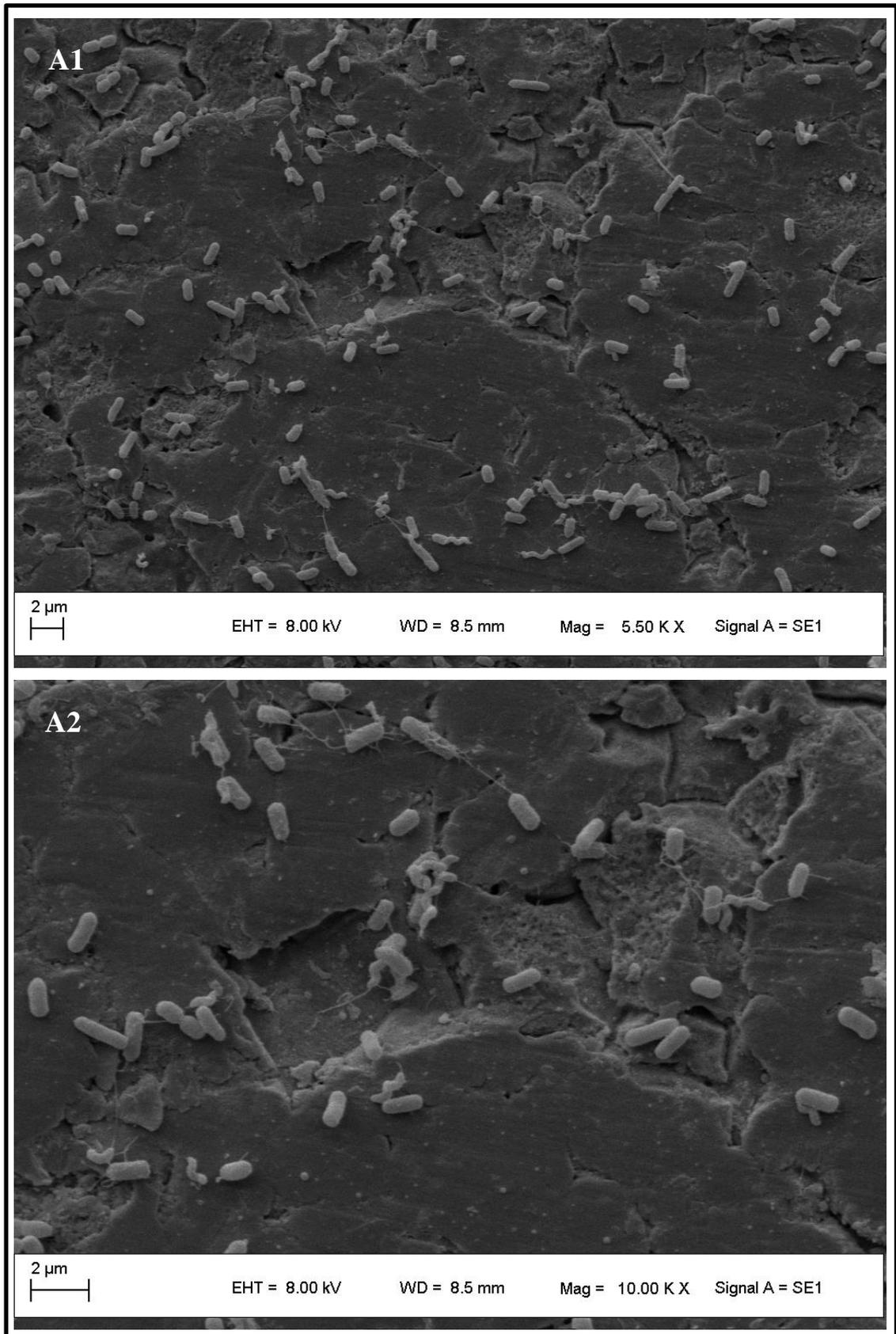


Figura 20 - Biofilme multiespécie de *Salmonella* Enteritidis + *Campylobacter jejuni* formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 5.500x; A2 Aumento 4.000x.

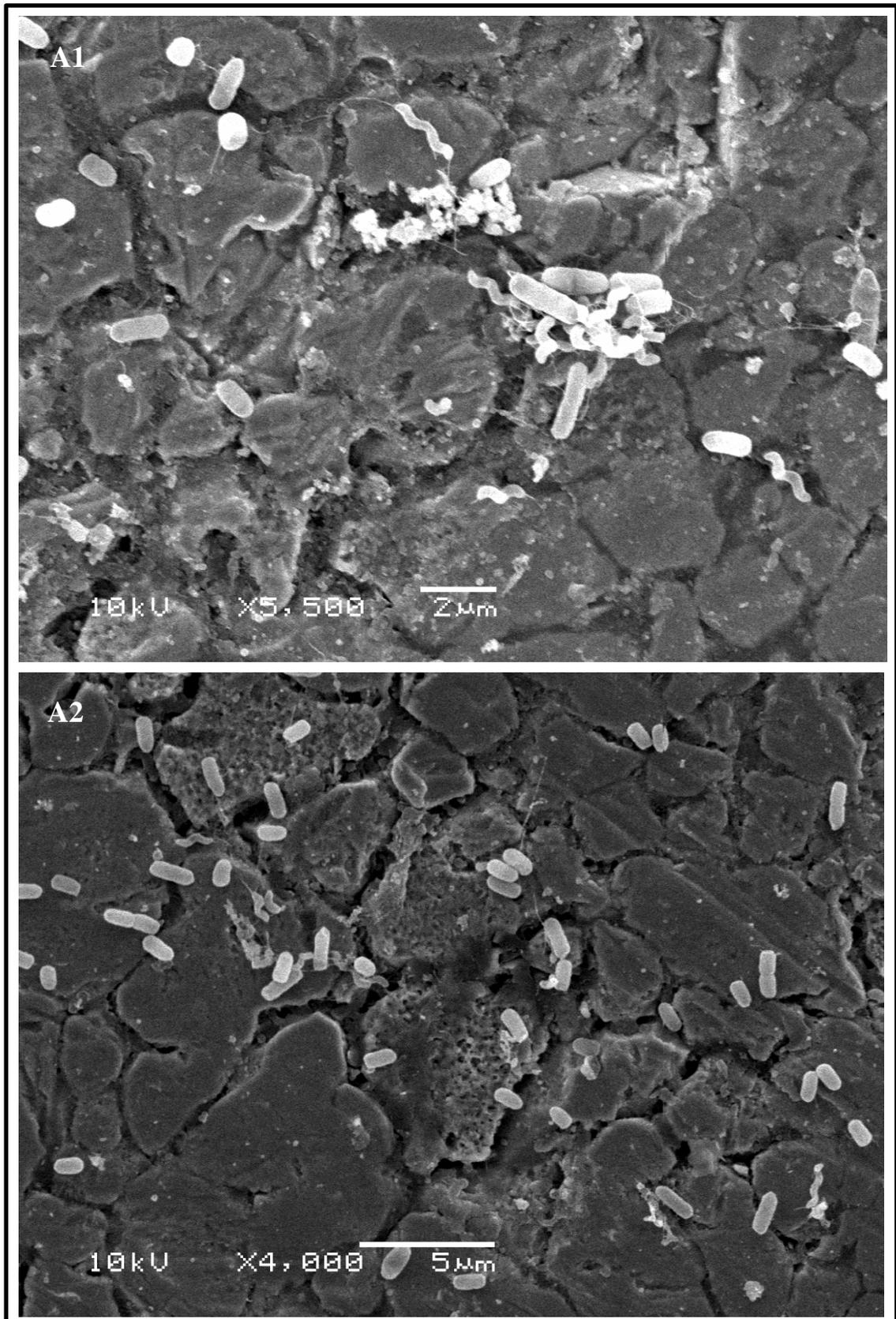
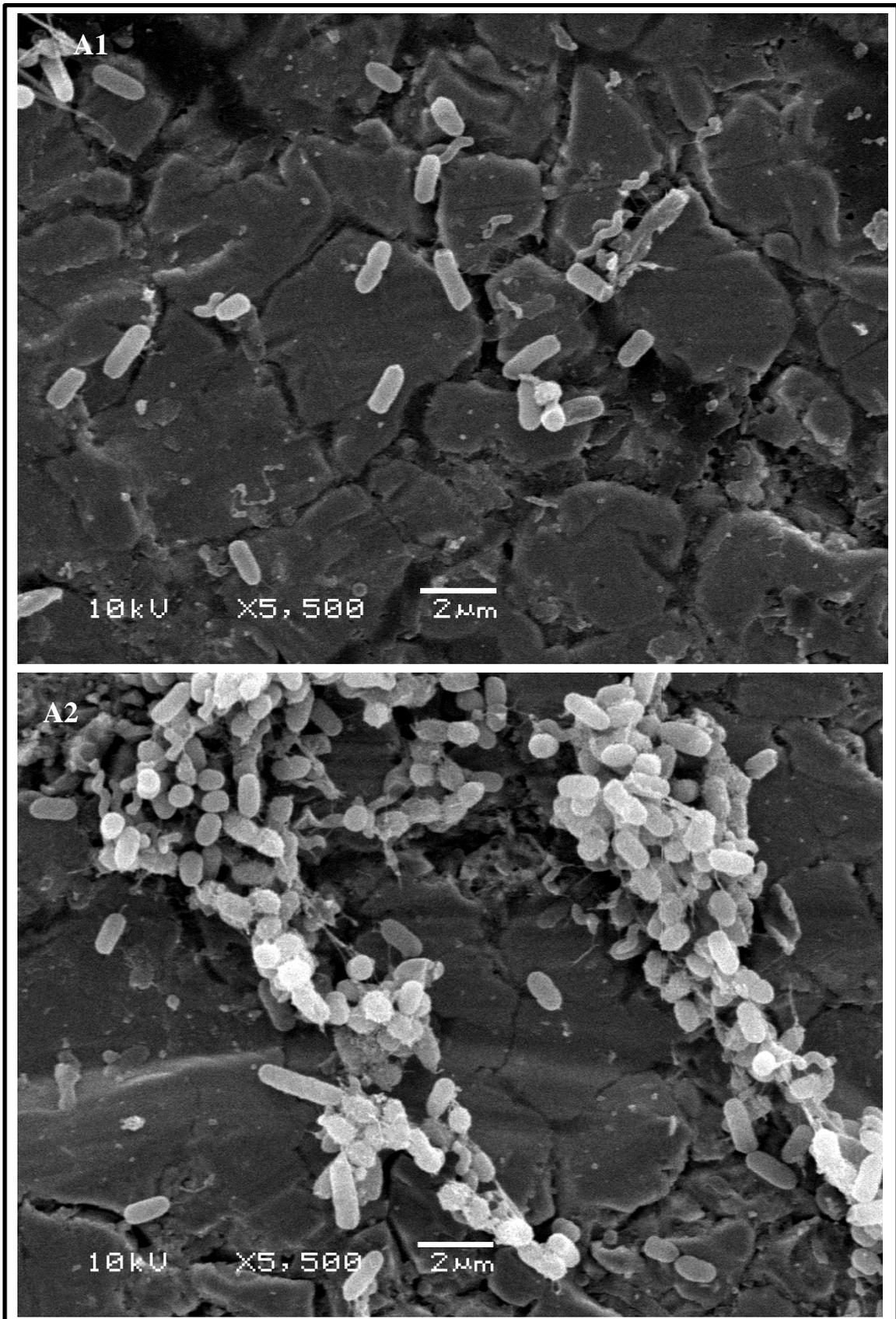


Figura 21 - Biofilme multiespécie de *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni* formado no aço inoxidável a 25°C com 24 horas de incubação. A1 Aumento 5.500x; A2 Aumento 5.500x.



5.4.1 Biofilme multiespécies *S. Enteritidis* + *E. coli*

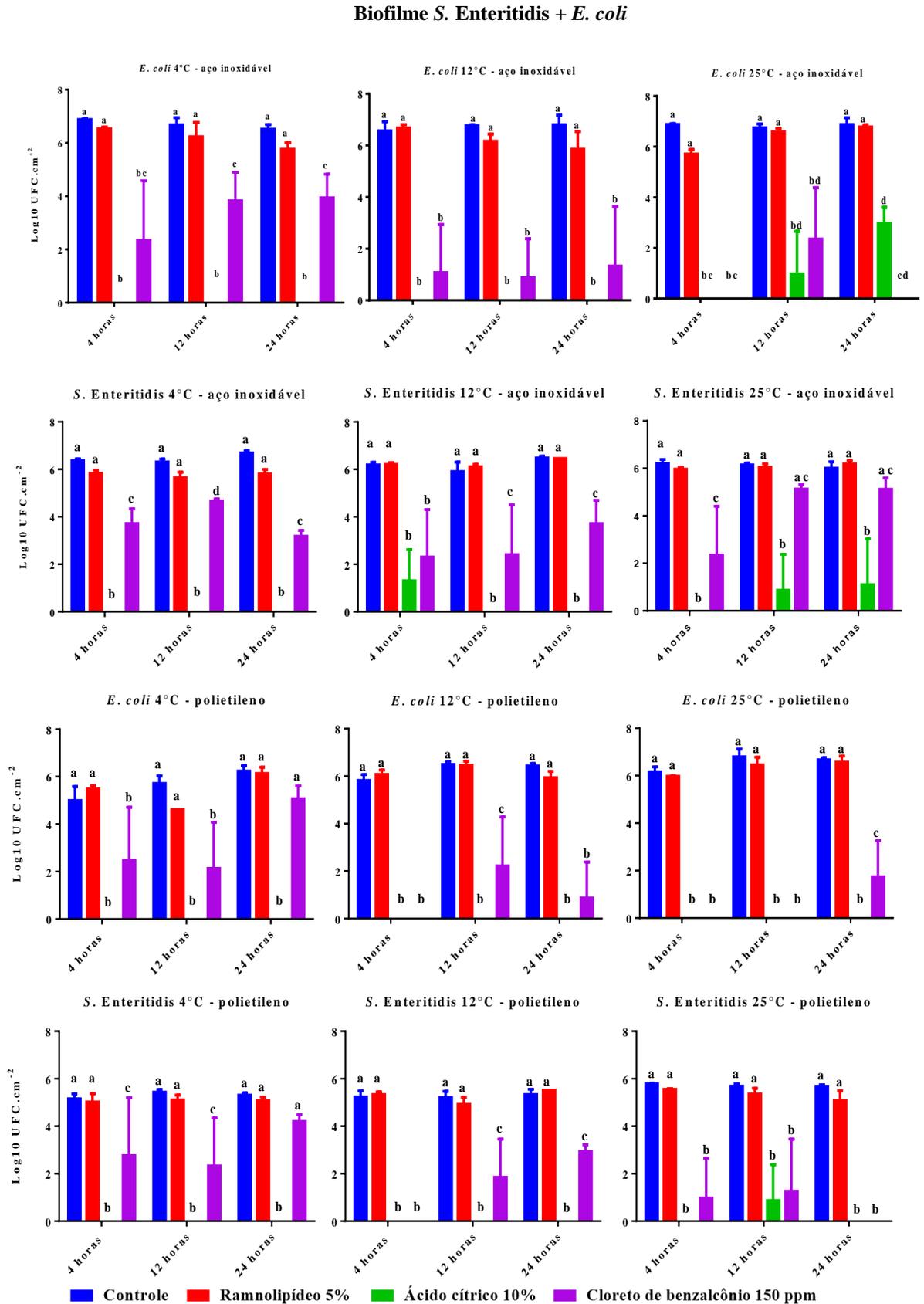
Todos os resultados obtidos mediante tratamento com o ácido orgânico, biosurfactante e o desinfetante sobre o biofilme de *S. Enteritidis* e *E. coli* no aço inoxidável e polietileno encontram-se na Figura 22. O tratamento com ramnolipídeo realizado sobre o biofilme constituído por estes dois microrganismos não diferiu significativamente do grupo controle em todas as condições testadas ($p > 0,05$). O tratamento com AC demonstrou máxima eficácia para *E. coli* no aço inoxidável, a 4°C e 12°C e, no polietileno, a 4°C, 12°C e 25°C. No aço inoxidável a 25°C o AC reduziu em 100% a contagem do biofilme de *E. coli* formado com quatro horas de incubação, e foi capaz de reduzir significativamente a contagem no biofilme formado com 12 e 24 horas ($p < 0,05$). Para *S. Enteritidis*, o AC foi responsável por zerar a contagem a 4°C no aço inoxidável e polietileno, e a 12°C apenas no polietileno. Quando utilizado a 12°C sobre o aço inoxidável, reduziu significativamente a quantidade de células do biofilme formado com quatro horas e zerou com 12 e 24 horas. Já a 25°C nesta mesma superfície, o AC reduziu significativamente o biofilme formado com 12 e 24 horas e zerou com quatro horas ($p < 0,05$).

O tratamento com o CB apresentou, em quase todas as situações, melhor desempenho nas mais altas temperaturas, inclusive zerando as contagens de *S. Enteritidis* e *E. coli* em algumas situações a 12°C e 25°C, tanto no aço inoxidável quanto no polietileno. A atuação do CB e do AC não diferiu estatisticamente para *E. coli* no aço inoxidável a 4°C, para o biofilme formado com quatro horas, e 12°C e 25°C, em todas as condições analisadas ($p < 0,05$). No polietileno, o CB teve efeito similar ao AC sobre o biofilme de *E. coli* em praticamente todas as condições testadas, com exceção de 4°C com 12 e 24 horas, 12°C com 12 horas e 25°C com 24 horas ($p < 0,05$). Ao analisar a ação antimicrobiana sobre a *S. Enteritidis* no biofilme formado no aço inoxidável, o CB não zerou, mas reduziu significativamente a contagem em relação ao controle a 4°C e 12°C. A 25°C houve redução da contagem para *S. Enteritidis* no biofilme apenas com quatro horas de formação ($p < 0,05$). No polietileno, o CB teve efeito antimicrobiano sobre *S. Enteritidis* igual ao AC na maioria das condições testadas ($p < 0,05$).

Conforme demonstrado na Tabela 5, a capacidade de adesão ao aço inoxidável para *E. coli* não variou entre as temperaturas, mas para *S. Enteritidis* foi significativamente maior a 25°C, independente do tempo de formação ($p < 0,05$). No

polietileno, os dois microrganismos tiveram maior adesão a 25°C ($p < 0,05$). Ao comparar a adesão às duas superfícies considerando o mesmo microrganismo e mesma temperatura, observou-se que tanto *E. coli* quanto *S. Enteritidis* aderiram mais sobre o aço inoxidável do que sobre o polietileno a 4°C e 12°C ($p < 0,05$) (Tabela 5). A 25°C apenas *S. Enteritidis* teve capacidade de adesão ao polietileno inferior em relação ao aço inoxidável ($p < 0,05$). O tratamento com ramnolipídeo não teve diferença entre as temperaturas para *E. coli* no aço inoxidável e para *S. Enteritidis* no polietileno. Já para *E. coli*, no polietileno, e *S. Enteritidis*, no aço inoxidável, o ramnolipídeo teve melhor atuação a 4°C ($p < 0,05$). A atuação do AC sobre o biofilme multiespécie de *S. Enteritidis* + *E. coli* não variou significativamente entre as temperaturas, considerando a mesma superfície, para *S. Enteritidis*. Já para *E. coli* foi observada variação no desempenho do AC apenas no aço inoxidável a 25°C ($p < 0,05$). No geral, o CB teve melhor atuação a 12°C e 25°C em ambas superfícies para *E. coli*, sendo observada uma diferença de mais de 2 log₁₀ na contagem em relação a 4°C ($p < 0,05$). Para *S. Enteritidis*, não se observou diferença significativa no efeito antimicrobiano do CB sobre o biofilme formado no aço inoxidável ($p > 0,05$). No polietileno, este desinfetante apresentou melhor eficácia a 25°C, reduzindo a contagem em quase 2 log₁₀.

Figura 22 - Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* no aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.



*Letras iguais entre os tratamentos para o mesmo microrganismo, superfície e temperatura não diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Tabela 5 – Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C, independente do tempo de incubação.

		Controle			Ramnolipídeo 5%			Ácido cítrico 10%			Cloreto de benzalcônio 150 ppm			
		4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	
<i>E. coli</i>	Aço	6,695±	6,710±	6,573±	6,180±	6,229±	6,361±			1,318±	3,375±	1,091±	0,7829±	
	inoxidável	0,225 ^{a/A}	0,282 ^{a/A}	0,392 ^{a/A}	1,52 ^{a/A}	1,67 ^{a/A}	1,55 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,593 ^{b/A}	1,520 ^{a/A}	1,672 ^{b/A}	1,553 ^{b/A}	
	Polietileno		5,651±	6,249±	6,542±	5,412±	6,158±	6,335±				3,228±	1,032±	0,5822±
			0,644 ^{a/B}	0,349 ^{a/B}	0,353 ^{b/A}	0,674 ^{a/B}	0,296 ^{b/A}	0,341 ^{b/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/B}	2,046 ^{a/A}	1,602 ^{b/A}	1,155 ^{b/A}
<i>S. Enteritidis</i>	Aço	6,122±	6,194±	6,457±	5,765±	6,075±	6,263±	0,436±		0,6598±	3,855±	2,813±	4,202±	
	inoxidável	0,197 ^{a/A}	0,321 ^{a/A}	0,186 ^{b/A}	0,185 ^{a/A}	0,168 ^{b/A}	0,141 ^{b/A}	0,926 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,321 ^{a/A}	0,734 ^{a/A}	1,672 ^{a/A}	1,747 ^{a/A}	
	Polietileno		5,301±	5,264±	5,721±	5,071±	5,261±	5,331±			0,291±	3,099±	1,595±	0,746±
			0,174 ^{a/B}	0,216 ^{a/B}	0,074 ^{b/B}	0,217 ^{a/B}	0,310 ^{a/B}	0,315 ^{a/B}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,87 ^{a/A}	1,79 ^{a/A}	1,52 ^{a/B}	1,493 ^{b/B}

*Letras minúsculas iguais na mesma linha entre diferentes temperaturas do mesmo tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Letras maiúsculas iguais na mesma coluna entre diferentes superfícies considerando o mesmo microrganismo, temperatura e tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

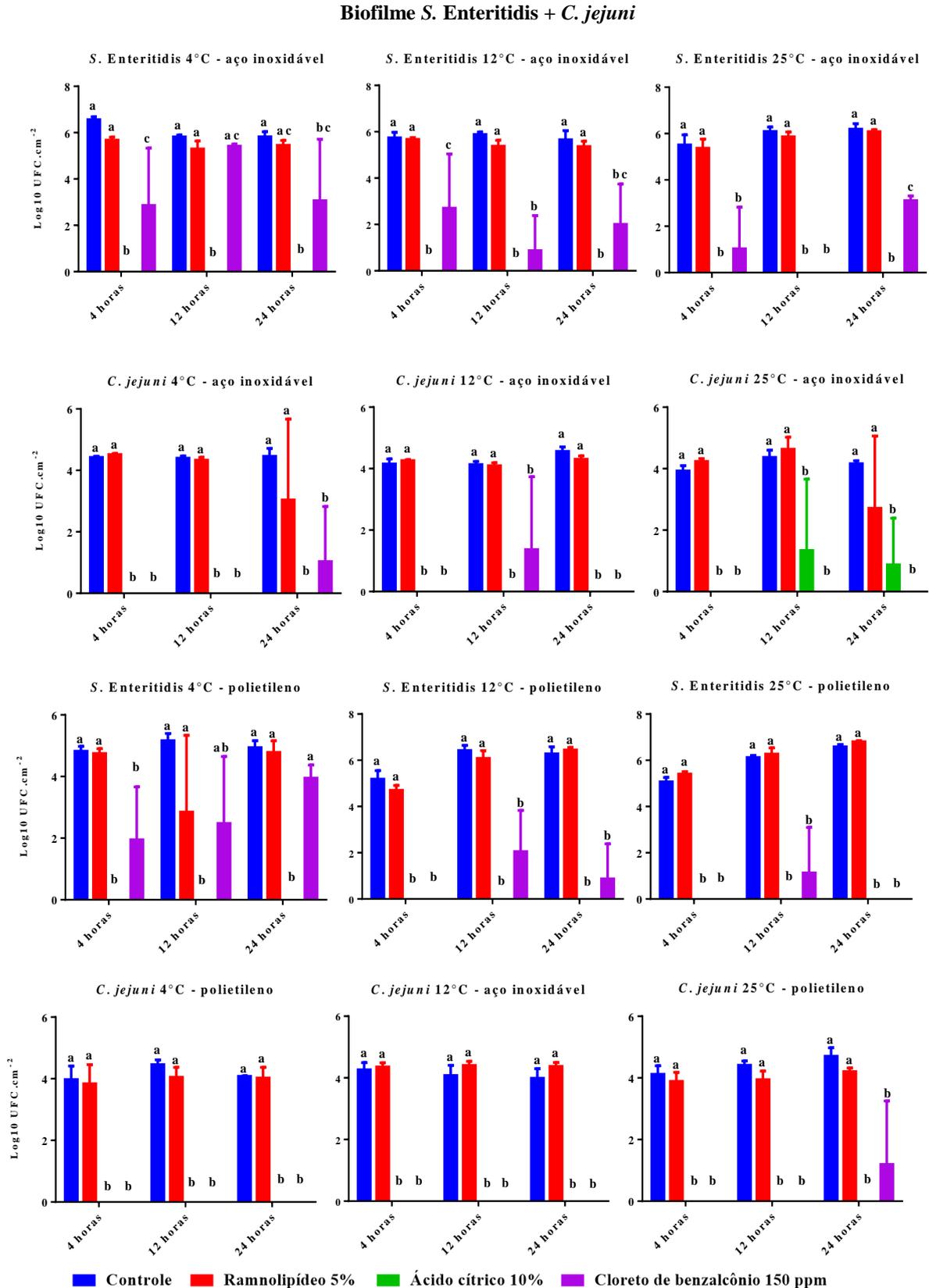
*** Resultados expressos em log₁₀ UFC.cm⁻²

5.4.2 Biofilme multiespécies *S. Enteritidis* + *C. jejuni*

Os resultados dos diferentes tratamentos realizados sobre o biofilme misto de *S. Enteritidis* e *C. jejuni* encontram-se na Figura 23. Em nenhuma das condições avaliadas o ramnolipídeo apresentou diferença significativa de atuação em relação ao grupo controle no biofilme multiespécies de *S. Enteritidis* e *C. jejuni* ($p > 0,05$). Nos tratamentos com CB e AC, não houve diferença significativa na atuação destes dois antimicrobianos sobre *C. jejuni*, independente da superfície, temperatura e tempo de formação do biofilme ($p > 0,05$). Para *S. Enteritidis*, o AC zerou as contagens em todas as condições avaliadas. O CB, apesar de ter tido sua ação prejudicada a 4°C tanto no aço inoxidável quanto no polietileno, teve um bom desempenho sobre estas superfícies a 12°C e 25°C, reduzindo significativamente a contagem de *S. Enteritidis*, praticamente igualando seu desempenho ao AC ($p < 0,05$).

Uma comparação mais geral entre os tratamentos (Tabela 6) demonstrou que não houve variação significativa na formação do biofilme entre as temperaturas para *C. jejuni* no aço inoxidável e polietileno e, para *S. Enteritidis*, no aço inoxidável ($p > 0,05$). Para *S. Enteritidis* no polietileno, observou-se uma maior adesão a 12°C e 25°C comparado a 4°C ($p < 0,05$). Ao analisar a adesão de cada microrganismo isoladamente entre as superfícies, mas dentro da mesma temperatura, ficou evidente uma maior capacidade, tanto da *S. Enteritidis* quanto do *C. jejuni*, em formar biofilme no aço inoxidável a 4°C. De modo geral, não foi verificada qualquer diferença na atuação do ramnolipídeo e AC entre as temperaturas para a mesma e microrganismo ($p < 0,05$), a exceção foi para o ramnolipídeo a 4°C, que teve melhor ação antimicrobiana frente *S. Enteritidis* aderida no polietileno comparado a 12°C e 25°C ($p < 0,05$). O desempenho do CB entre as temperaturas não diferiu significativamente para *C. jejuni*, independente da superfície ($p < 0,05$). Para *S. Enteritidis*, este desinfetante teve melhor atuação a 25°C no aço inoxidável, e a 12°C e 25°C no polietileno ($p < 0,05$).

Figura 23 - Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolípídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni* no aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.



*Letras iguais entre os tratamentos para o mesmo microrganismo, superfície e temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni* em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C, independente do tempo de incubação.

		Controle			Ramnolipídeo 5%			Ácido cítrico 10%			Cloreto de benzalcônio 150 ppm			
		4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	
S. Enteritidis	Aço	6,068±	5,760±	5,930±	5,476±	5,470±	5,771±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^a	3,779±	1,861±	1,382±	
	inoxidável	0,393 ^{a/A}	0,253 ^{a/A}	0,415 ^{a/A}	0,265 ^{a/A}	0,230 ^{a/A}	0,387 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^a	2,193 ^{a/A}	1,82 ^{a/A}	1,641 ^{b/A}	
	Polietileno		4,975±	5,960±	5,926±	4,126±	5,745±	6,161±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	2,790±	0,9737±	0,3776±
			0,233 ^{a/B}	0,641 ^{b/A}	0,680 ^{b/A}	1,584 ^{a/B}	0,821 ^{b/A}	0,627 ^{b/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,661 ^{a/A}	1,468 ^{b/A}	1,132 ^{b/A}
	<i>C. jejuni</i>	Aço	4,426±	4,282±	4,153±	3,963±	4,222±	3,860±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,737±	0,3441±	0,4552±	0 ^{a/A}
		inoxidável	0,137 ^{a/A}	0,241 ^{a/A}	0,244 ^{a/A}	0,149 ^{a/A}	0,120 ^{a/A}	1,481 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,304 ^{a/A}	1,504 ^{a/A}	1,032 ^{a/A}	0 ^{a/A}
Polietileno			4,169±	4,109±	4,410±	3,969±	4,376±	4,013±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,3971±
			0,322 ^{a/B}	0,280 ^{a/A}	0,328 ^{a/A}	0,116 ^{a/A}	0,403 ^{a/A}	0,257 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,191 ^{a/A}

*Letras minúsculas iguais na mesma linha entre diferentes temperaturas do mesmo tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Letras maiúsculas iguais na mesma coluna entre diferentes superfícies considerando o mesmo microrganismo, temperatura e tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

*** Resultados expressos em log₁₀ UFC.cm⁻²

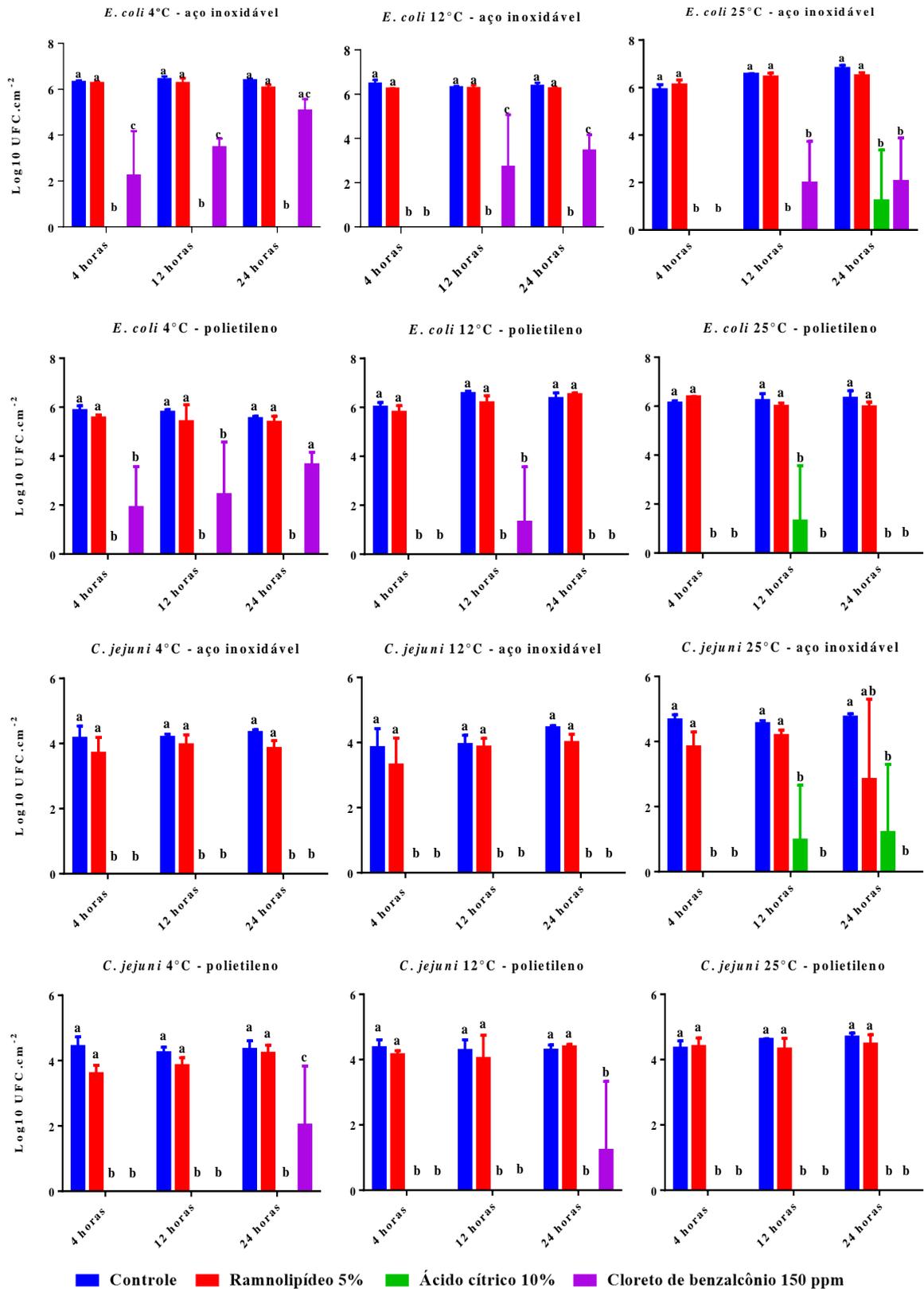
5.4.3 Biofilme multiespécies *E. coli* + *C. jejuni*

Na Figura 24 constam os resultados referentes aos tratamentos de remoção realizados sobre o biofilme formado por *E. coli* + *C. jejuni*. Assim como para as combinações microbianas anteriores, o tratamento com ramnolípídeo não demonstrou efeito antimicrobiano sobre o biofilme tanto para *E. coli* quanto para *C. jejuni* ($p > 0,05$). O AC atuou zerando praticamente todas as contagens, independente das condições testadas, confirmando-se como o tratamento mais eficiente, independente da temperatura e superfície. O CB teve desempenho comprometido para *E. coli* a 4°C no biofilme formado com 24 horas sobre o polietileno, não diferindo estatisticamente das contagens obtidas no grupo controle ($p > 0,05$). Nas demais condições analisadas, o CB teve ação igual ao AC frente ao *C. jejuni* em aço inoxidável nas três temperaturas, e para *E. coli* no polietileno a 4°C e 12°C, e no aço inoxidável a 25°C ($p < 0,05$). Ainda, para *E. coli*, no aço inoxidável a 4°C e 12°C, o CB reduziu significativamente a quantidade de células aderidas com 4 e 12 horas de formação e 12 e 24 horas de formação, respectivamente ($p < 0,05$). Da mesma forma, para *C. jejuni*, no polietileno a 4°C o CB diminuiu em mais de 2 \log_{10} a contagem em relação ao controle ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 7, foi observada diferença na adesão para a mesma superfície entre as temperaturas apenas para *E. coli* no polietileno, sendo a 12°C e 25°C evidenciada uma maior quantidade de células aderidas quando comparado a 4°C ($p < 0,05$). Entre as superfícies, foi constatada uma maior adesão ao aço inoxidável apenas para *E. coli* a 4°C ($p < 0,05$). O ramnolípídeo teve melhor atuação a 4°C para *E. coli* no polietileno em relação as demais temperaturas ($p < 0,05$). O AC não teve variação significativa no seu efeito antimicrobiano entre as temperaturas considerando a mesma superfície e microrganismo ($p > 0,05$). Para o CB, foi observada que a 25°C este desinfetante teve melhor desempenho para *E. coli* no polietileno, zerando todas as contagens após dez minutos de contato ($p < 0,05$).

Figura 24 - Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolípido 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* no aço inoxidável e polietileno no 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.

Biofilme *E. coli* + *C. jejuni*



*Letras iguais entre os tratamentos para o mesmo microrganismo, superfície e temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C, independente do tempo de incubação.

		Controle			Ramnolipídeo 5%			Ácido cítrico 10%			Cloreto de benzalcônio 150 ppm		
		4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C
<i>E. coli</i>	Aço	6,386±	6,386±	6,430±	6,205±	6,260±	6,354±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,411±	3,595±	2,054±	1,342±
	inoxidável	0,089 ^{a/A}	0,134 ^{a/A}	0,423 ^{a/A}	0,157 ^{a/A}	0,070 ^{a/A}	0,231 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,232 ^{a/A}	1,598 ^{a/A}	1,997 ^{a/A}	1,617 ^{b/A}
	Polietileno	5,731±	6,314±	6,233±	5,451±	6,171±	6,122±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,4356±	2,661±	0,4356±	0 ^{b/B}
		0,192 ^{a/B}	0,288 ^{b/A}	0,225 ^{b/A}	0,379 ^{a/B}	0,371 ^{b/A}	0,229 ^{b/A}			1,306 ^{a/A}	1,584 ^{a/A}	1,306 ^{b/B}	
<i>C. jejuni</i>	Aço	4,233±	4,082±	4,657±	3,840±	3,727±	3,620±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,7267±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}
	inoxidável	0,215 ^{a/A}	0,428 ^{a/A}	0,134 ^{a/A}	0,328 ^{a/A}	0,549 ^{a/A}	1,396 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	1,452 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}
	Polietileno	4,342±	4,314±	4,555±	3,891±	4,194±	4,402±	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,6761±	0,4068±	0 ^{a/A}
		0,227 ^{a/A}	0,219 ^{a/A}	0,200 ^{a/A}	0,346 ^{a/A}	0,393 ^{a/A}	0,261 ^{a/A}				1,358 ^{a/A}	1,220 ^{a/A}	

*Letras minúsculas iguais na mesma linha entre diferentes temperaturas do mesmo tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Letras maiúsculas iguais na mesma coluna entre diferentes superfícies considerando o mesmo microrganismo, temperatura e tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

*** Resultados expressos em log₁₀ UFC.cm⁻²

5.4.4 Biofilme multiespécies *S. Enteritidis* + *E. coli* + *C. jejuni*

De acordo com os resultados observados após os diferentes tratamentos sobre o biofilme multiespécies de *S. Enteritidis* + *E. coli* + *C. jejuni*, tanto no aço inoxidável quanto no polietileno (Figuras 25 e 26), pôde-se verificar que não houve diferença significativa entre o tratamento com ramnolipídeo e o grupo controle para todos os microrganismos, independente da temperatura avaliada ($p < 0,05$). A ação do AC sobre *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* praticamente zerou a contagem destes patógenos em todas as temperaturas, superfícies e tempos de incubação.

O CB teve atuação variável apenas para *S. Enteritidis* e *E. coli*. No caso da *S. Enteritidis*, a 4°C este desinfetante mostrou-se eficiente apenas frente ao biofilme no aço inoxidável com quatro horas formação ($p < 0,05$). Já a 12°C, o produto teve melhor desempenho sobre biofilme formado nesta superfície com quatro e 24 horas. A 25°C, o CB apresentou boa atuação em todos os tempos avaliados no aço inoxidável, sendo seu efeito antimicrobiano semelhante ao observado para o AC. Já para o polietileno, o CB não zerou as contagens de *S. Enteritidis* quando utilizado a 4°C, mas atuou da mesma forma que o AC para o biofilme formado com quatro e 12 horas ($p < 0,05$).

Ao avaliar a atuação do CB sobre a *E. coli* no biofilme multiespécies, pôde-se verificar que a 4°C no aço inoxidável houve uma redução significativa da contagem em relação ao controle em todos os tempos de formação analisados, sendo observada uma redução de até 4 log₁₀ para o biofilme formado com quatro horas ($p < 0,05$). O resultado do CB nestas condições não foi tão eficiente quanto o AC, o qual reduziu em 100% a contagem de *E. coli* nesta mesma superfície, no entanto sua atuação, ainda assim, foi bastante expressiva. Ainda, a 12°C este desinfetante zerou as contagens de *E. coli* em todos os tempos avaliados, e a 25°C apresentou bons resultados diante do biofilme formado com quatro e 24 horas ($p < 0,05$). No polietileno este desinfetante também teve seu desempenho um pouco comprometido a 4°C frente a *E. coli* para o biofilme formado com 24 horas ($p < 0,05$). Contudo, nas demais temperaturas, o CB demonstrou ser tão eficiente quanto o AC, reduzindo significativamente as contagens de *E. coli* ($p < 0,05$).

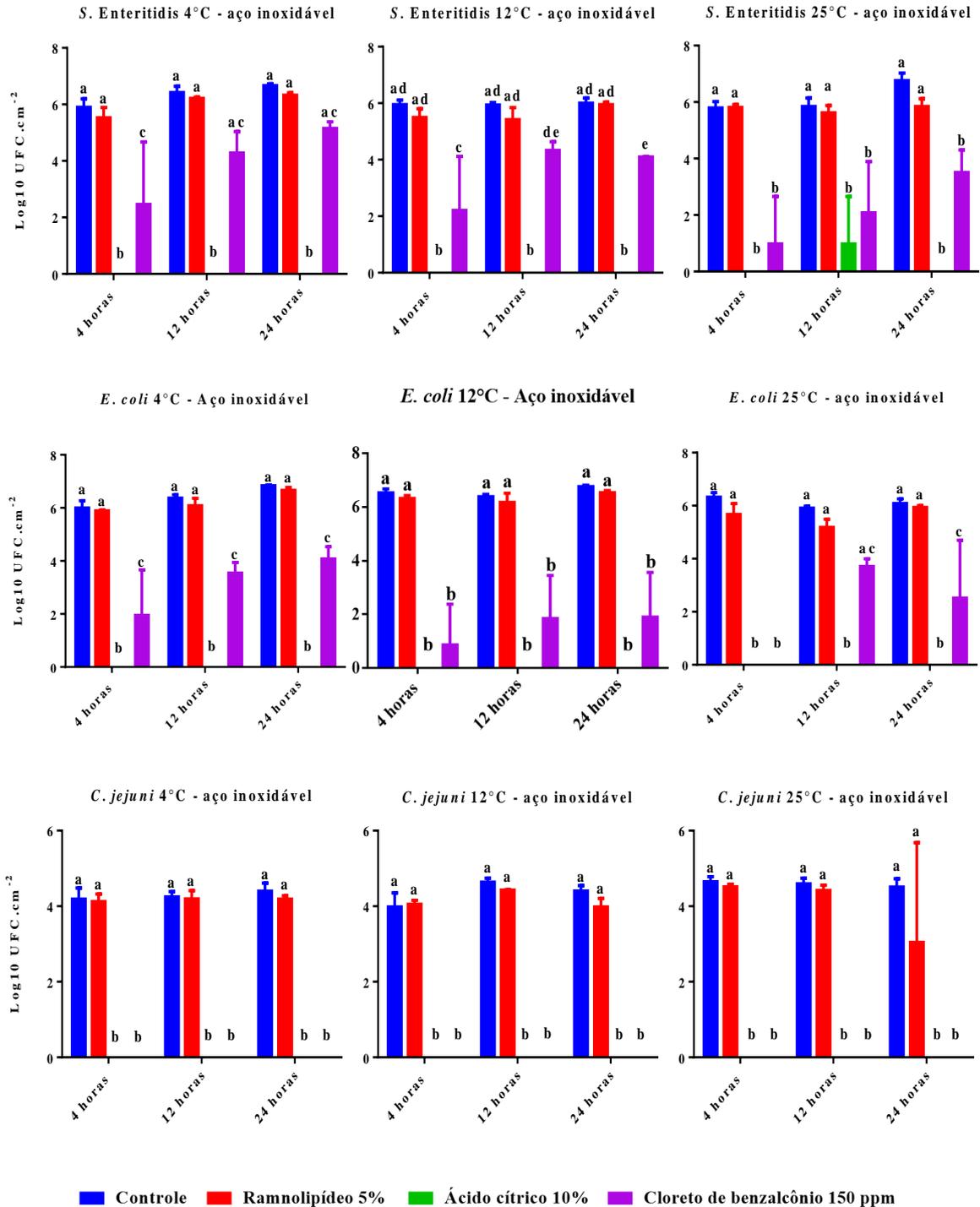
De acordo com os dados apresentados na Tabela 8, não foi evidenciada diferença significativa na adesão de *S. Enteritidis* no aço inoxidável entre as três temperaturas avaliadas ($p < 0,05$). Contudo, no polietileno, a adesão desse microrganismo foi menor a 4°C, comparado a 12°C e 25°C ($p < 0,05$). Ainda, ao comparar a adesão de *S. Enteritidis*

entre as duas superfícies para a mesma temperatura, pôde-se constatar que a 4°C houve uma maior adesão ao aço inoxidável, comparado ao polietileno ($p < 0,05$). No tratamento com ramnolípídeo, a contagem de *S. Enteritidis* no aço inoxidável não variou significativamente entre as temperaturas, mas no polietileno houve um melhor desempenho a 4°C ($p < 0,05$). Da mesma forma, o tratamento com este biosurfactante reduziu significativamente a contagem de *S. Enteritidis* no polietileno em relação ao aço inoxidável a 4°C ($p < 0,05$). Quanto ao AC, não houve diferença significativa na sua atuação frente a *S. Enteritidis* entre as temperaturas, considerando a mesma superfície, bem como entre as superfícies para a mesma temperatura ($p > 0,05$). Para o CB foi verificado um melhor desempenho para *S. Enteritidis* apenas no polietileno nas duas mais altas temperaturas ($p < 0,05$). Já entre as duas superfícies, este desinfetante obteve uma redução de quase 3 \log_{10} na contagem a 12°C no polietileno em relação ao aço inoxidável ($p < 0,05$).

Para *E. coli* (Tabela 8), não foi observada diferença significativa na formação do biofilme no aço inoxidável entre as temperaturas, já no polietileno houve uma maior adesão deste patógeno a 12°C e 25°C ($p < 0,05$). Ainda, uma maior capacidade de adesão deste patógeno foi observada no aço inoxidável a 4°C em comparação ao polietileno ($p < 0,05$). Diferença entre as temperaturas para o mesmo tratamento e superfície só foi verificada para o ramnolípídeo no aço inoxidável a 25°C, e para o CB no polietileno a 4°C ($p < 0,05$). Ademais, o tratamento com AC não diferiu significativamente entre as temperaturas e entre as superfícies. Para *C. jejuni* (Tabela 7), diferenças entre os tratamentos só foram observadas na adesão a 4°C, onde o polietileno demonstrou uma maior capacidade formação de biofilme em relação ao aço inoxidável ($p < 0,05$).

Figura 25 - Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* no aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.

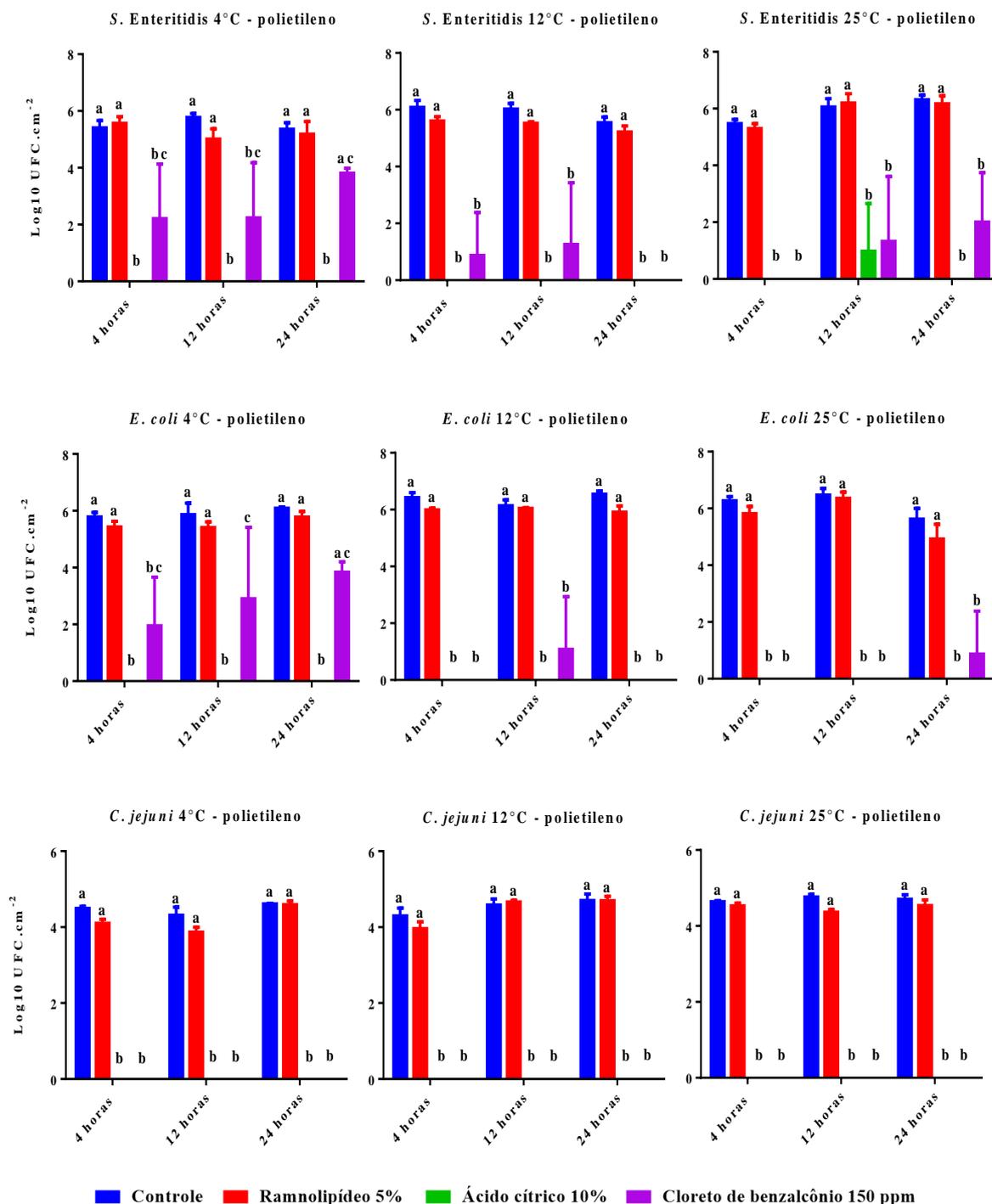
Biofilme *S. Enteritidis* + *E. coli* + *C. jejuni*



*Letras iguais entre os tratamentos para o mesmo microrganismo, superfície e temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Figura 26 - Efeito dos tratamentos de remoção (ramnolípídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* no polietileno a 4°C, 12°C e 25°C com 4, 12 e 24 horas de incubação.

Biofilme *S. Enteritidis* + *E. coli* + *C. jejuni*



*Letras iguais entre os tratamentos para o mesmo microrganismo, superfície e temperatura não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Comparação da adesão e dos tratamentos de remoção (ramnolipídeo 5%, ácido cítrico 10% e cloreto de benzalcônio 150 ppm) sobre o biofilme multiespécies de *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni* em aço inoxidável e polietileno a 4°C, 12°C e 25°C, independente do tempo de incubação.

		Controle			Ramnolipídeo 5%			Ácido cítrico 10%			Cloreto de benzalcônio 150 ppm		
		4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C	4°C	12°C	25°C
<i>S. Enteritidis</i>	Aço inoxidável	6,326± 0,387 ^{a/A}	5,964± 0,130 ^{a/A}	6,129± 0,523 ^{a/A}	6,020± 0,421 ^{a/A}	5,620± 0,365 ^{a/A}	5,755± 0,222 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,389± 0,973 ^{a/A}	3,962± 1,671 ^{a/A}	3,545± 1,398 ^{a/A}	2,186± 1,702 ^{a/A}
	Polietileno	5,511± 0,270 ^{a/B}	5,884± 0,316 ^{a/B/A}	5,945± 0,417 ^{b/A}	5,252± 0,395 ^{a/B}	5,447± 0,219 ^{ab/A}	5,887± 0,500 ^{b/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,3245± 0,973 ^{a/A}	2,754± 1,579 ^{a/A}	0,7095± 1,436 ^{b/B}	1,109± 0,1,686 ^{b/A}
<i>E. coli</i>	Aço inoxidável	6,401± 0,395 ^{a/A}	6,561± 0,187 ^{a/A}	6,104± 0,219 ^{b/A}	6,211± 0,379 ^{a/A}	6,346± 0,240 ^{a/A}	5,596± 0,420 ^{b/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	3,190± 1,322 ^{a/A}	1,542± 1,471 ^{a/A}	2,075± 1,975 ^{a/A}
	Polietileno	5,913± 0,174 ^{a/B}	6,369± 0,216 ^{b/A}	6,121± 0,074 ^{b/A}	5,540± 0,217 ^{a/B}	5,983± 0,310 ^{a/B}	5,699± 0,315 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0,291± 0,873 ^{a/A}	2,894± 1,798 ^{a/A}	0,3580± 1,522 ^{b/A}	0,2911± 1,496 ^{b/B}
<i>C. jejuni</i>	Aço inoxidável	4,278± 0,644 ^{a/A}	4,339± 0,349 ^{a/A}	4,582± 0,353 ^{a/A}	4,168± 2,046 ^{a/A}	4,154± 1,602 ^{a/A}	3,991± 1,155 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}
	Polietileno	4,473± 0,170 ^{a/B}	4,527± 0,237 ^{a/A}	4,701± 0,088 ^{a/A}	4,188± 0,332 ^{a/A}	4,440± 0,374 ^{a/A}	4,477± 0,125 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}	0 ^{a/A}

*Letras minúsculas iguais na mesma linha entre diferentes temperaturas do mesmo tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Letras maiúsculas iguais na mesma coluna entre diferentes superfícies considerando o mesmo microrganismo, temperatura e tratamento não diferem significativamente entre si (p>0,05).

*** Resultados expressos em log₁₀ UFC.cm⁻²

De modo geral, observou-se que, independente da combinação microbiana e da temperatura, o microrganismo que apresentou maior capacidade de adesão nas duas superfícies foi *E. coli* seguido de *S. Enteritidis* e, por último, *C. jejuni* (Tabela 9) ($p < 0,05$). Ainda, sem considerar a combinação microbiana, a taxa de recuperação de *S. Enteritidis* variou, em média, de 5,919 a 6,257 no aço e 5,428 a 5,780 no polietileno. Para *E. coli*, esta taxa foi de 6,092 a 6,147 no polietileno e de 6,134 a 6,658 no aço. Já para *C. jejuni* foi de 4,229 a 4,567 no polietileno e de 4,287 a 4,399 no aço.

Cabe ressaltar que, apesar dos dados obtidos nas contagens em placa dos biofilmes multiespécie, independente da combinação microbiana, não apresentarem distribuição normal, toda a análise estatística foi realizada com ANOVA e como teste *post hoc* Bonferroni. Esta medida foi necessária, uma vez que os testes não – paramétricos disponíveis não representaram de modo apropriado os resultados desta etapa do estudo.

Tabela 9 – Comparação da adesão de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* sobre o aço inoxidável e polietileno considerando as diferentes combinações microbianas, independente da temperatura e concentração do antimicrobiano.

	<i>S. Enteritidis</i> + <i>E. coli</i>		<i>S. Enteritidis</i> + <i>C. jejuni</i>		<i>E. coli</i> + <i>C. jejuni</i>		<i>S. Enteritidis</i> + <i>E. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	
	Aço	Polietileno	Aço	Polietileno	Aço	Polietileno	Aço	Polietileno
<i>S. Enteritidis</i>	6,257 ^a	5,428 ^a	5,919 ^a	5,620 ^a	-	-	6,139 ^a	5,780 ^a
<i>E. coli</i>	6,658 ^b	6,147 ^b	-	-	6,400 ^a	6,092 ^a	6,355 ^a	6,134 ^b
<i>C. jejuni</i>	-	-	4,287 ^b	4,229 ^b	4,324 ^b	4,403 ^b	4,399 ^b	4,567 ^c

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna entre diferentes microrganismos não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

**Resultados expressos em \log_{10} UFC.cm⁻²

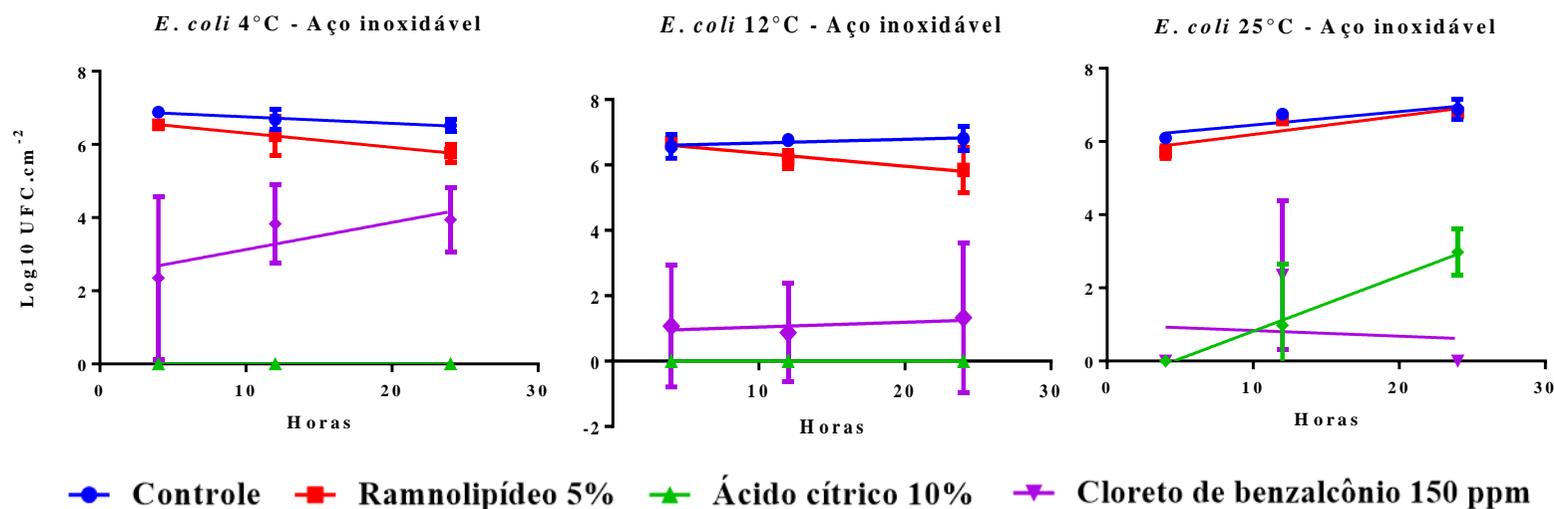
5.4.5 Modelos de predição para os biofilmes multiespécies

Com base nos dados de contagem em placa obtidos com as combinações microbianas multiespécies, foram gerados modelos de regressão linear simples (Figuras 27 a 44). Para cada combinação, superfície, temperatura e tratamento buscou-se gerar um modelo para cada microrganismo. Todos os modelos são válidos para um intervalo entre quatro e 24 horas, permitindo predizer o número de células bacterianas aderidas no

aço inoxidável e polietileno, bem como a quantidade de células viáveis remanescentes após o tratamento com os antimicrobianos. A variável resposta foi dada em \log_{10} UFC.cm⁻². A construção dos modelos foi realizada a partir dos dados de formação de biofilme obtidos com 4, 12 e 24 horas, sendo que para cada tempo havia três observações. Para os tratamentos os quais tiveram as contagens zeradas nas três observações, não foi possível a geração do modelo, como ocorreu para o AC, na maioria dos casos, e para o CB, principalmente para *C. jejuni*.

Ao total, dos 160 modelos construídos, 46 deles tiveram o coeficiente de determinação (R^2) estatisticamente significativo, permitindo explicar, em maior ou menor grau, a adesão ou efeito dos tratamentos sobre os biofilmes multiespécie nas condições avaliadas. A combinação microbiana que mais forneceu modelos matemáticos válidos foi *S. Enteritidis* + *E. coli* + *C. jejuni*, com 15 modelos, e *S. Enteritidis* + *E. coli*, com 13 modelos. As combinações de *S. Enteritidis* + *C. jejuni* e *E. coli* + *C. jejuni* tiveram nove modelos válidos cada. De todos os modelos válidos, 19 são referentes a adesão dos microrganismos às superfícies (controle), 18 ao tratamento com ramnolipídeo, oito com CB e apenas um com AC. O maior R^2 obtido foi 0,88 para *S. Enteritidis* em combinação com *C. jejuni* no tratamento com ramnolipídeo a 25°C e o menor foi 0,41 para *S. Enteritidis* em combinação com os outros dois microrganismos no tratamento com CB no aço inoxidável a 25°C.

Figura 27 – Modelos de predição de *Escherichia coli* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Salmonella* Enteritidis.

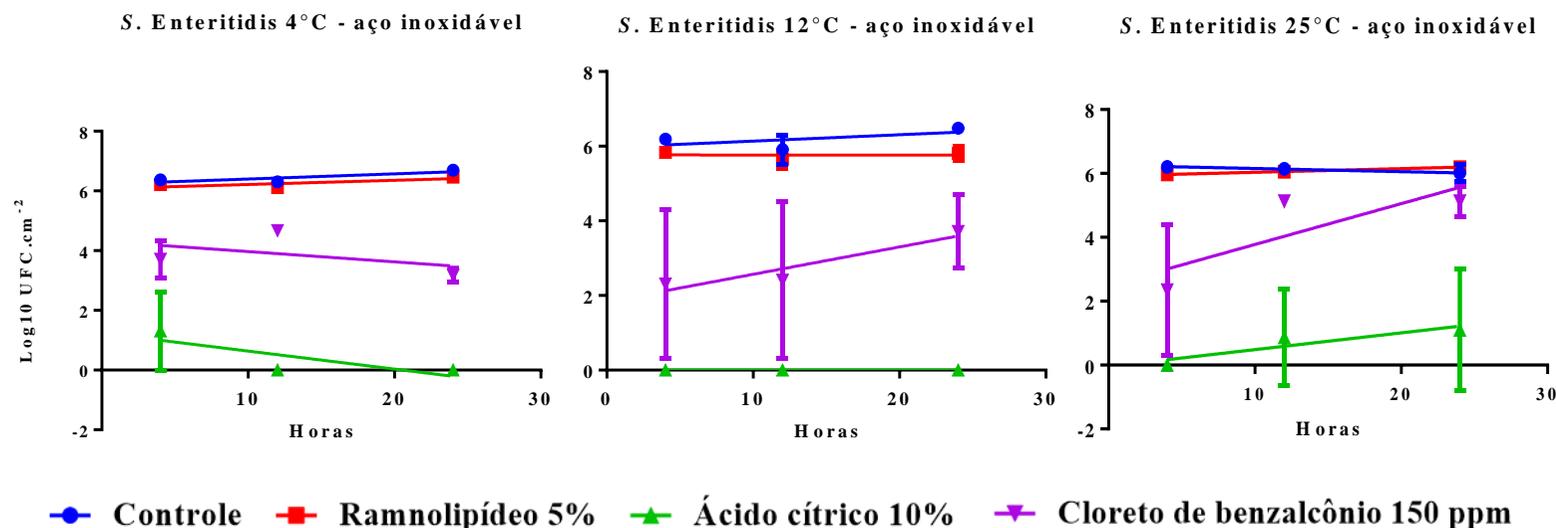


	Controle	Ramnolípídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = -0,01788*X + 6,933 (0,47)**	Y = -0,03878*X + 6,697 (0,56)**	NP	Y = 0,07398*X + 2,389 (0,17)
12°C	Y = 0,01128*X + 6,559 (0,12)	Y = -0,03993*X + 6,761 (0,44)	NP	Y = 0,01465*X + 0,8962 (0,005)
25°C	Y = 0,03661*X + 6,085 (0,66)**	Y = 0,05054*X + 5,687 (0,75)**	Y = 0,1504*X - 0,6878 (0,67)**	Y = -0,01545*X + 0,9889 (0,007)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 28 – Modelos de predição de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Salmonella* Enteritidis.

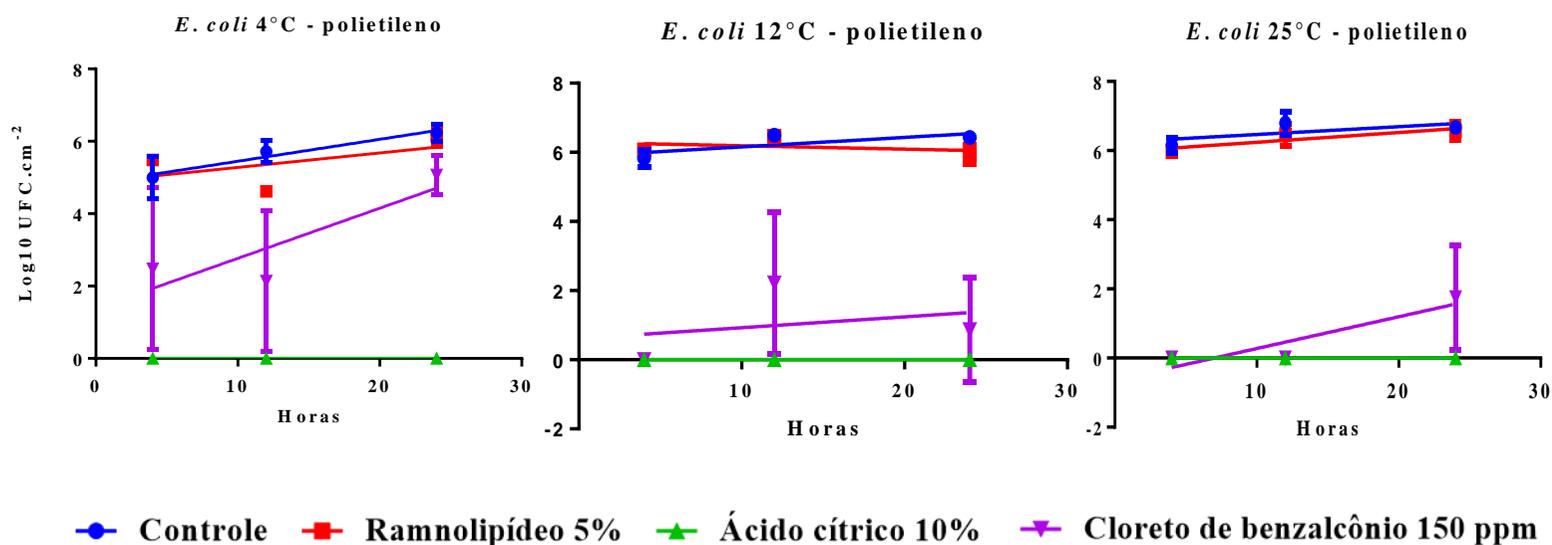


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,01737*X + 6,225 (0,58)**	Y = 0,01403*X + 6,076 (0,52)**	Y = -0,06032*X + 1,241 (0,32)	Y = -0,03448*X + 4,315 (0,16)
12°C	Y = 0,01711*X + 5,966 (0,21)	Y = -0,0001920*X + 5,768 (0,19)	NP	Y = 0,07335*X + 1,835 (0,14)
25°C	Y = -0,009832*X + 6,253 (0,21)	Y = 0,01144*X + 5,922 (0,50)**	Y = 0,05248*X - 0,03988 (0,12)	Y = 0,1279*X + 2,497 (0,40)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 29 – Modelos de predição de *Escherichia coli* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Salmonella* Enteritidis.

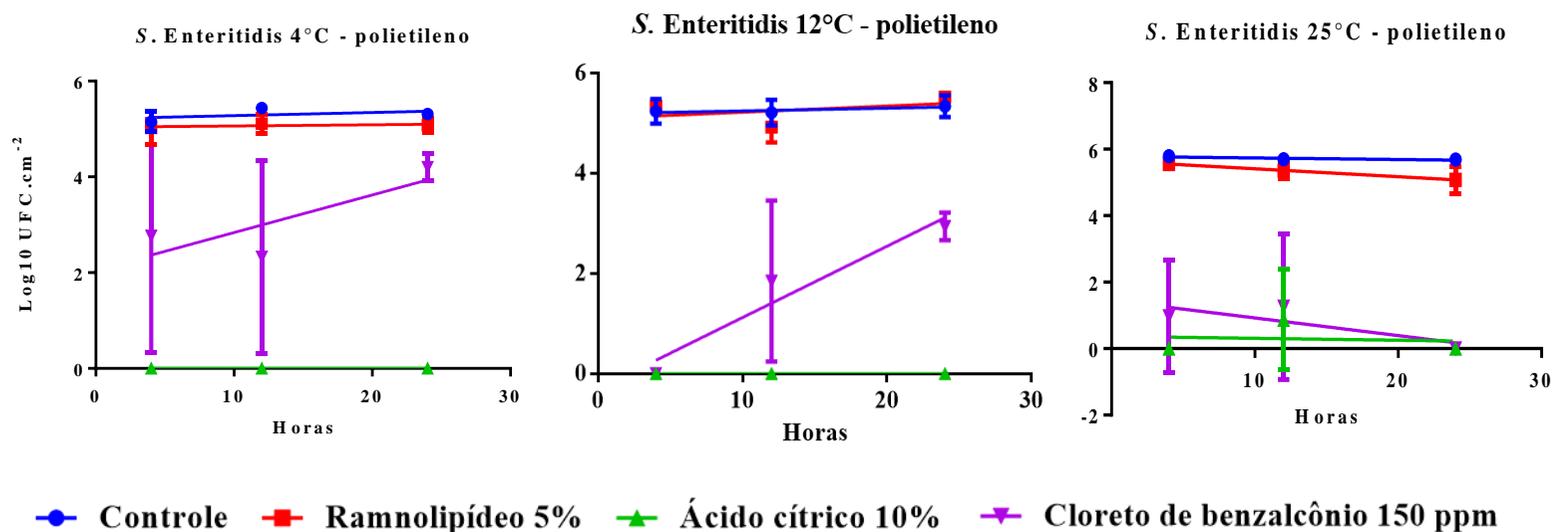


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,06064*X + 4,842 (0,67)**	Y = 0,04003*X + 4,878 (0,26)	NP	Y = 0,1385*X + 1,381 (0,34)
12°C	Y = 0,02735*X + 5,885 (0,46)**	Y = -0,009794*X + 6,289 (0,082)	NP	Y = 0,03133*X + 0,6145 (0,029)
25°C	Y = 0,02257*X + 6,241 (0,30)	Y = 0,02826*X + 5,959 (0,52)**	NP	Y = 0,09192*X - 0,6435 (0,48)**

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 30 – Modelos de predição de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Salmonella* Enteritidis.

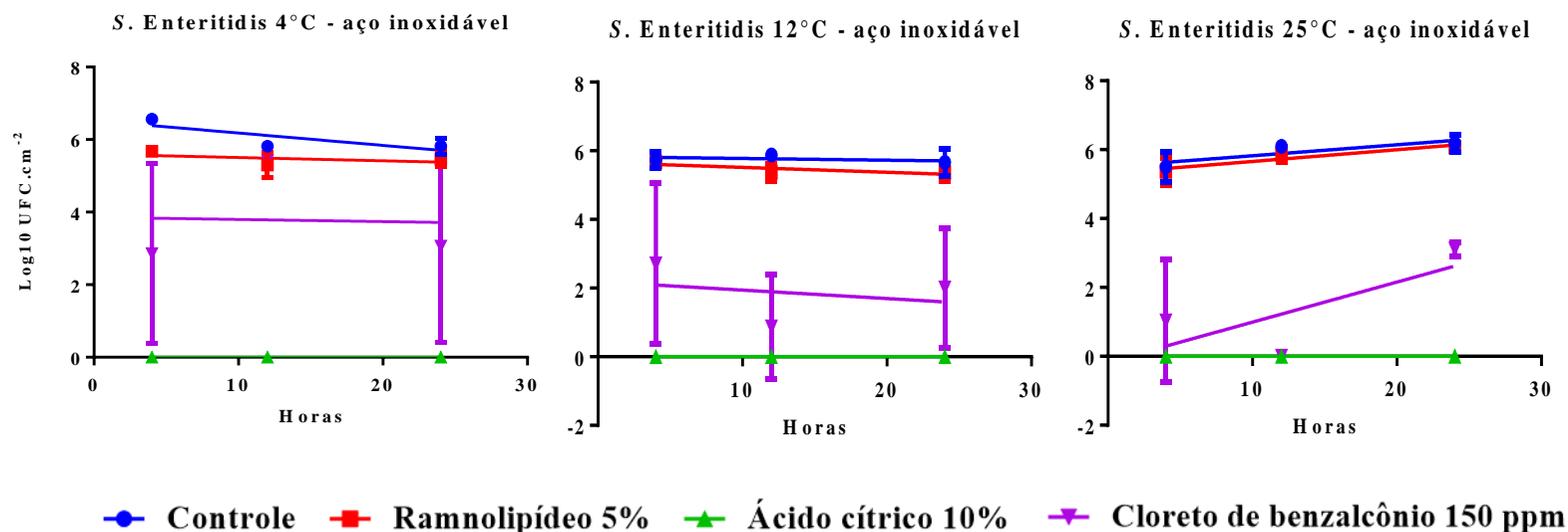


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,006517*X + 5,214 (0,10)	Y = 0,002491*X + 5,038 (0,009)	NP	Y = 0,07848*X + 2,053 (0,14)
12°C	Y = 0,005455*X + 5,191 (0,048)	Y = 0,01242*X + 5,095 (0,12)	NP	Y = 0,1425*X - 0,3047 (0,66)**
25°C	Y = -0,004709*X + 5,783 (0,29)	Y = -0,02379*X + 5,648 (0,43)	Y = -0,005745*X + 0,3677 (0,003)	Y = -0,05316*X + 1,455 (0,09)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 31 – Modelos de predição de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Campylobacter jejuni* + *Salmonella* Enteritidis.

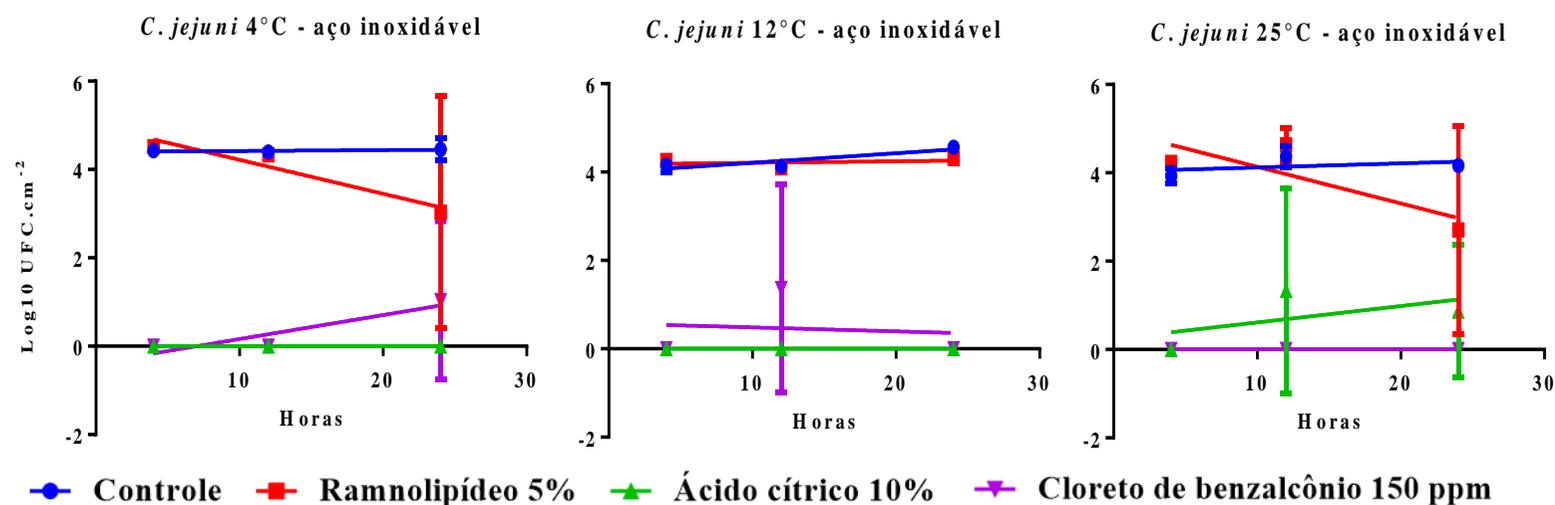


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = -0,03415*X + 6,523 (0,57)**	Y = -0,009066*X + 5,597 (0,088)	NP	Y = -0,005862*X + 3,857 (0,000)
12°C	Y = -0,005070*X + 5,828 (0,03)	Y = -0,01427*X + 5,660 (0,29)	NP	Y = -0,02462*X + 2,189 (0,01)
25°C	Y = 0,03192*X + 5,504 (0,44)**	Y = 0,03411*X + 5,317 (0,58)**	NP	Y = 0,1163*X - 0,1686 (0,38)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 32 – Modelos de predição de *Campylobacter jejuni* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Campylobacter jejuni* + *Salmonella* Enteritidis.

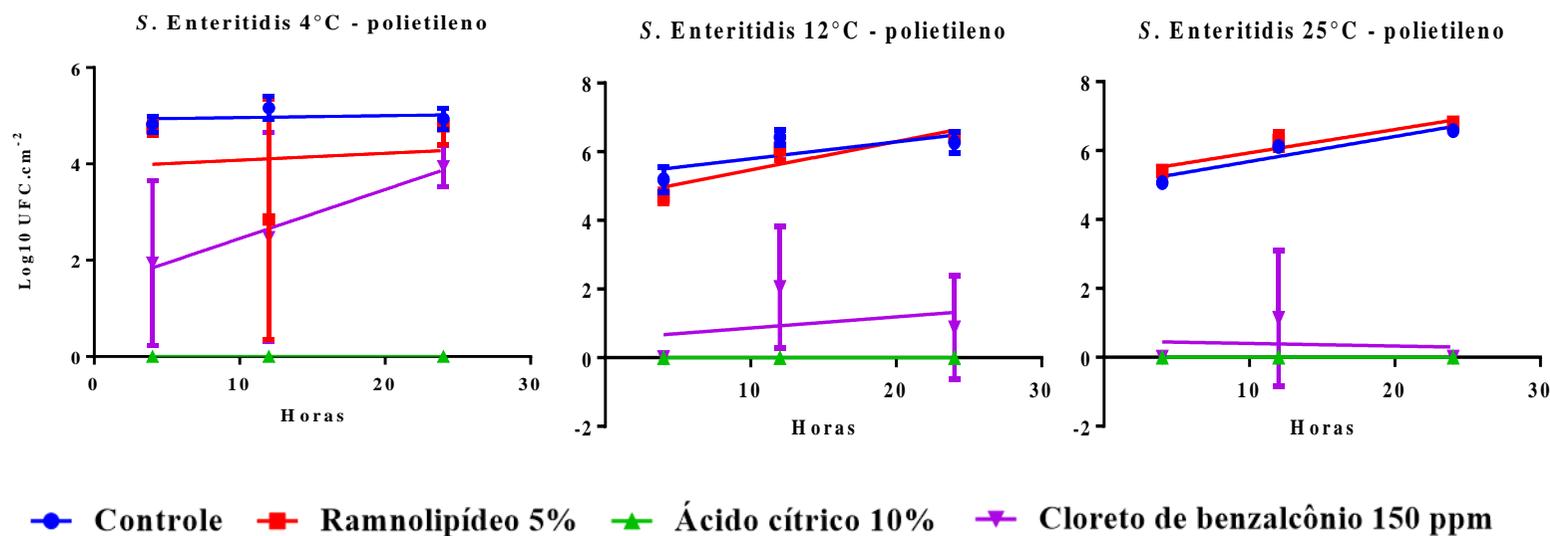


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,002058*X + 4,398 (0,01)	Y = -0,07680*X + 4,987 (0,20)	NP	Y = 0,05433*X - 0,3803 (0,21)
12°C	Y = 0,02162*X + 3,994 (0,61)**	Y = 0,003483*X + 4,175 (0,06)	NP	Y = -0,008984*X + 0,5750 (0,00)
25°C	Y = 0,009302*X + 4,029 (0,00)	Y = -0,08293*X + 4,965 (0,23)	NP	Y = 0,03715*X + 0,2422 (0,04)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 33 – Modelos de predição de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Campylobacter jejuni* + *Salmonella* Enteritidis.

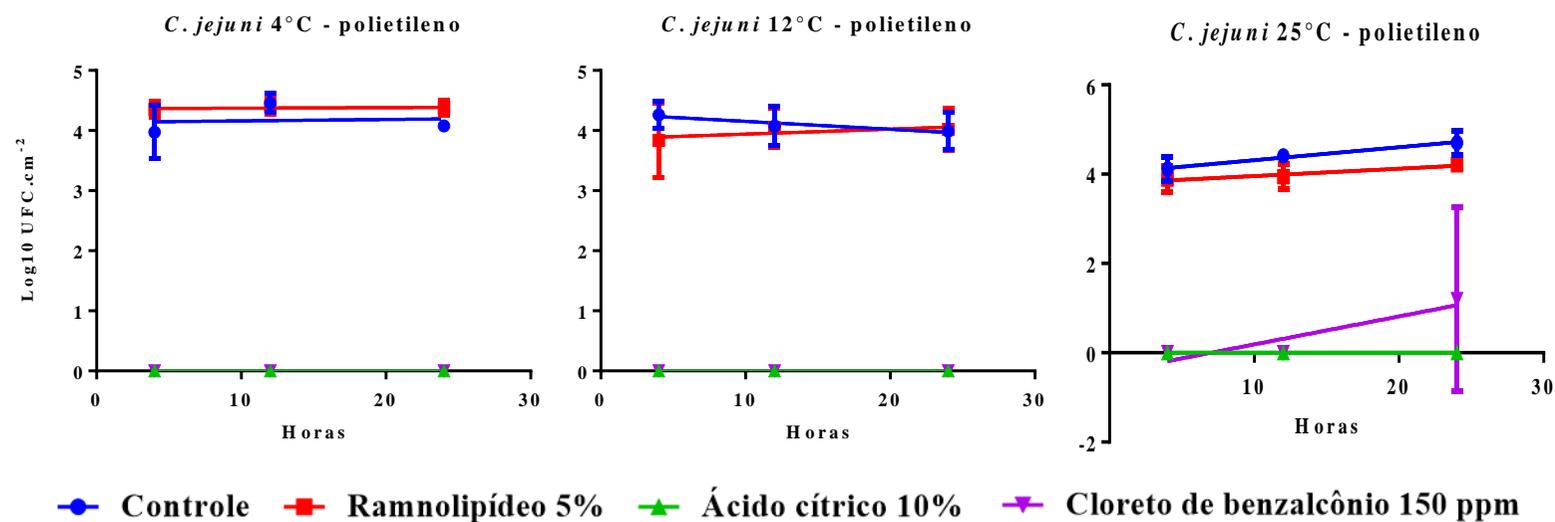


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,003958*X + 4,922 (0,021)	Y = 0,01426*X + 3,935 (0,00)	NP	Y = 0,1017*X + 1,434 (0,28)
12°C	Y = 0,04926*X + 5,303 (0,44)**	Y = 0,08257*X + 4,644 (0,76)**	NP	Y = 0,03249*X + 0,5404 (0,03)
25°C	Y = 0,07260*X + 4,958 (0,86)**	Y = 0,06784*X + 5,257 (0,88)**	NP	Y = -0,007452*X + 0,4769 (0,00)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 34 – Modelos de predição de *Campylobacter jejuni* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Campylobacter jejuni* + *Salmonella* Enteritidis.

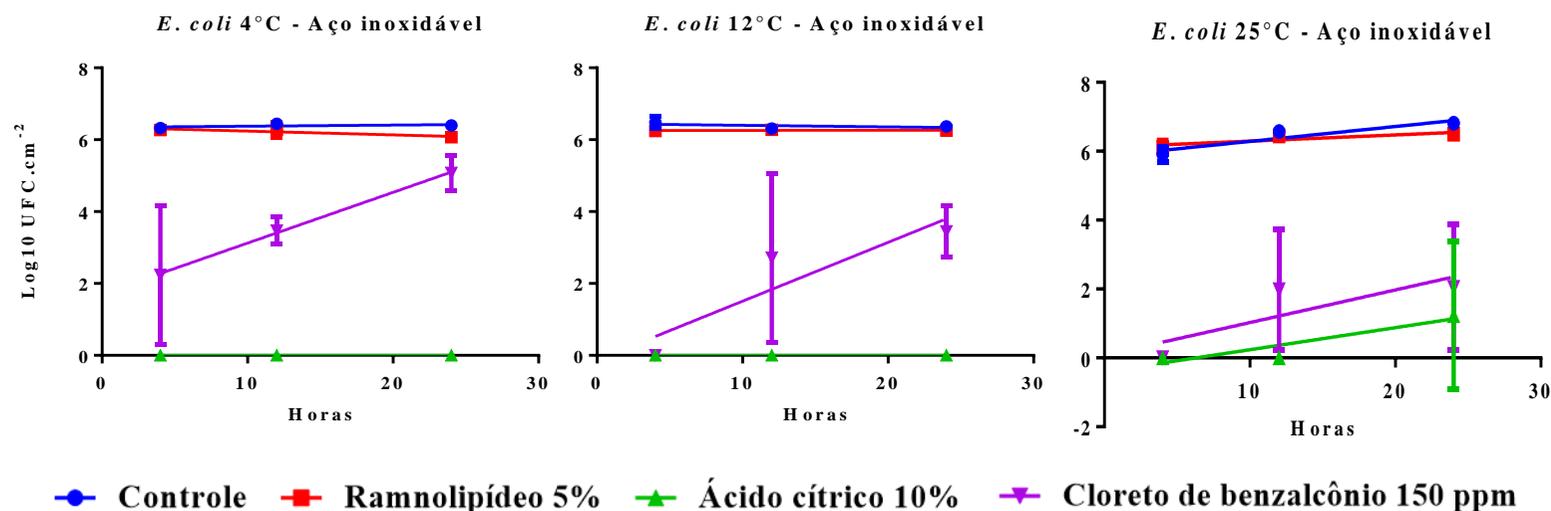


	Controle	Ramnolípídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,002360*X + 4,137 (0,00)	Y = 0,0009015*X + 4,364 (0,00)	NP	NP
12°C	Y = -0,01318*X + 4,285 (0,16)	Y = 0,008264*X + 3,858 (0,03)	NP	NP
25°C	Y = 0,02910*X + 4,022 (0,59)**	Y = 0,01648*X + 3,793 (0,31)	NP	Y = 0,06270*X - 0,4389 (0,21)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 35 – Modelos de predição de *Escherichia coli* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

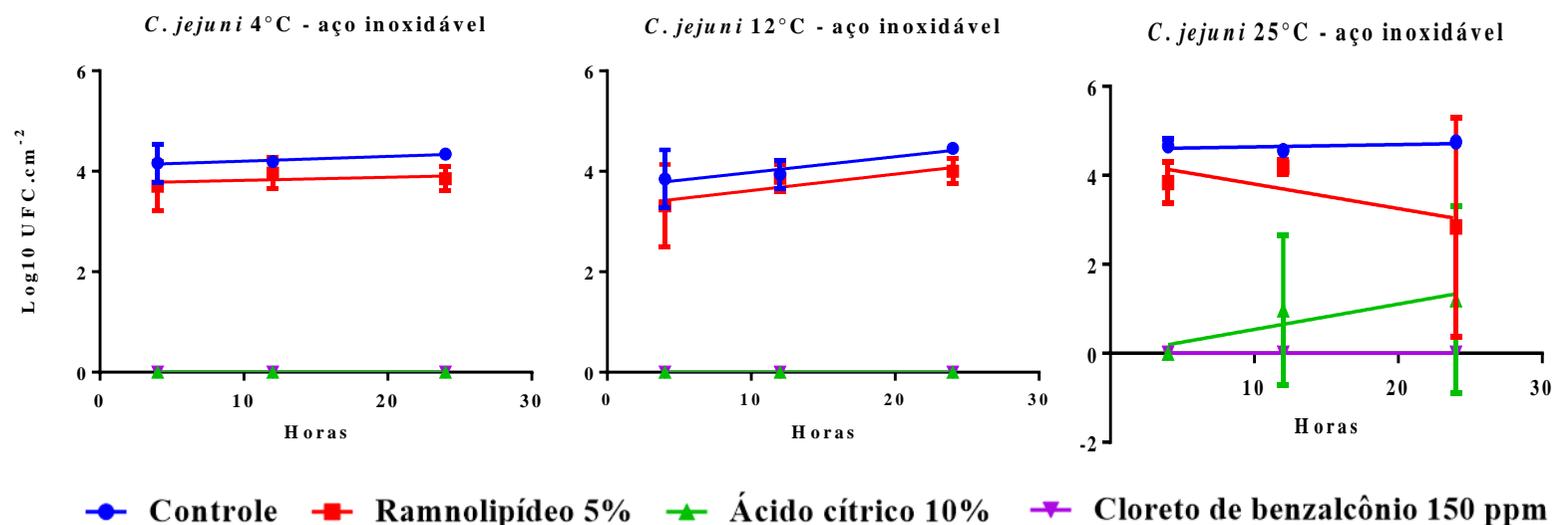


	Controle	Ramnolípídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,003125*X + 6,345 (0,09)	Y = -0,01055*X + 6,346 (0,33)	NP	Y = 0,1412*X + 1,713 (0,59)**
12°C	Y = -0,004386*X + 6,445 (0,08)	Y = 0,0004068*X + 6,255 (0,00)	NP	Y = 0,1636*X - 0,1276 (0,51)**
25°C	Y = 0,04319*X + 5,854 (0,79)**	Y = 0,01797*X + 6,114 (0,45)**	Y = 0,06409*X - 0,4029 (0,20)	Y = 0,09474*X + 0,07912 (0,26)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 36 – Modelos de predição de *Campylobacter jejuni* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

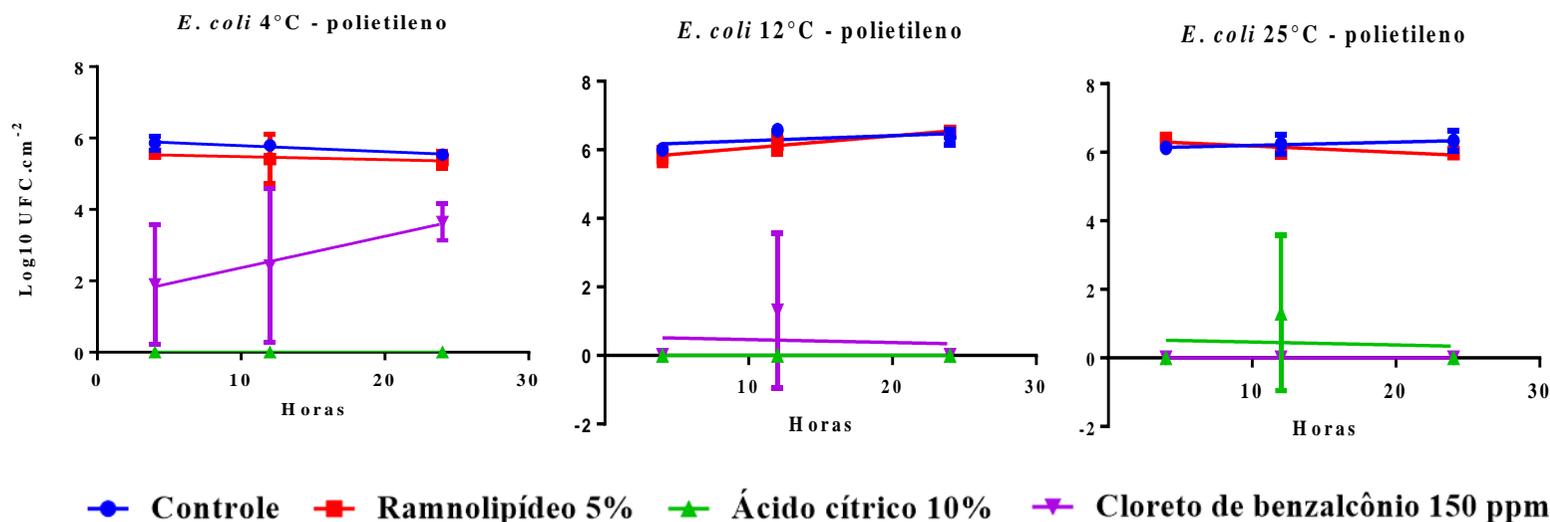


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,009460*X + 4,107 (0,14)	Y = 0,006155*X + 3,758 (0,02)	NP	NP
12°C	Y = 0,03128*X + 3,665 (0,40)	Y = 0,03273*X + 3,290	NP	NP
25°C	Y = 0,005225*X + 4,587 (0,11)	Y = -0,05510*X + 4,355 (0,11)	NP	Y = 0,05710*X - 0,03460 (0,11)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 37 – Modelos de predição de *Escherichia coli* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

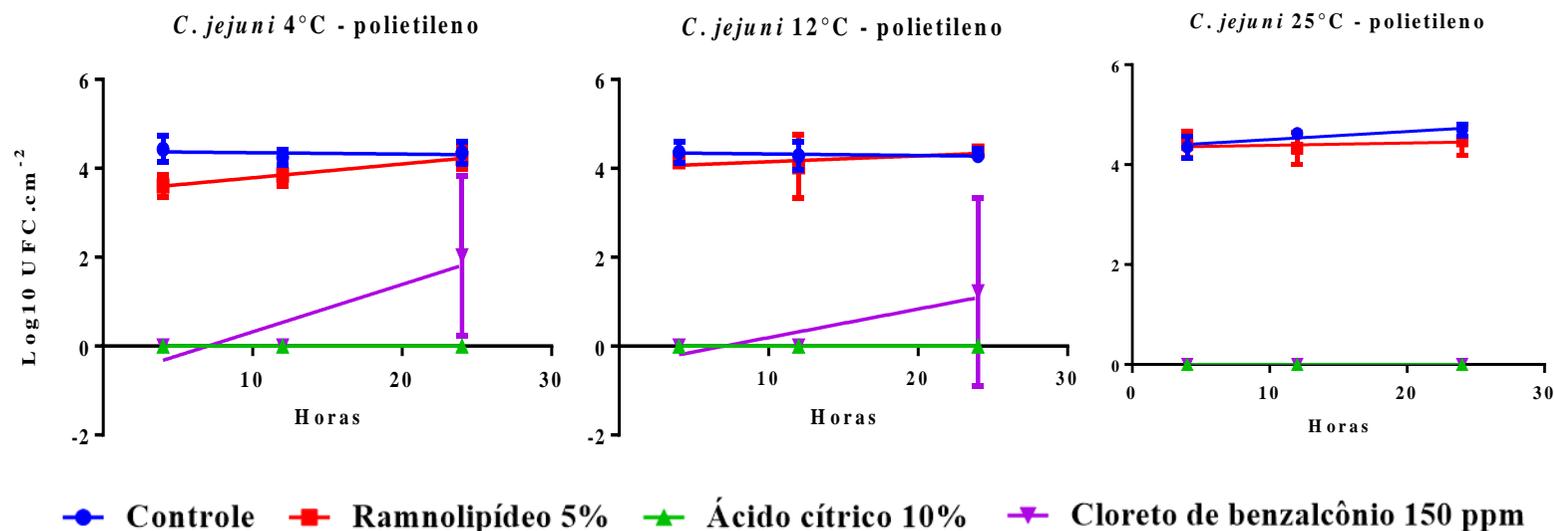


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = -0,01686*X + 5,956 (0,58)**	Y = -0,008447*X + 5,564 (0,03)	NP	Y = 0,08822*X + 1,485 (0,23)
12°C	Y = 0,01498*X + 6,114 (0,20)	Y = 0,03544*X + 5,698 (0,69)**	NP	Y = -0,008598*X + 0,5503 (0,00)
25°C	Y = 0,009660*X + 6,104 (0,14)	Y = -0,01883*X + 6,373 (0,50)**	NP	Y = -0,008598*X + 0,5503 (0,00)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 38 – Modelos de predição de *Campylobacter jejuni* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

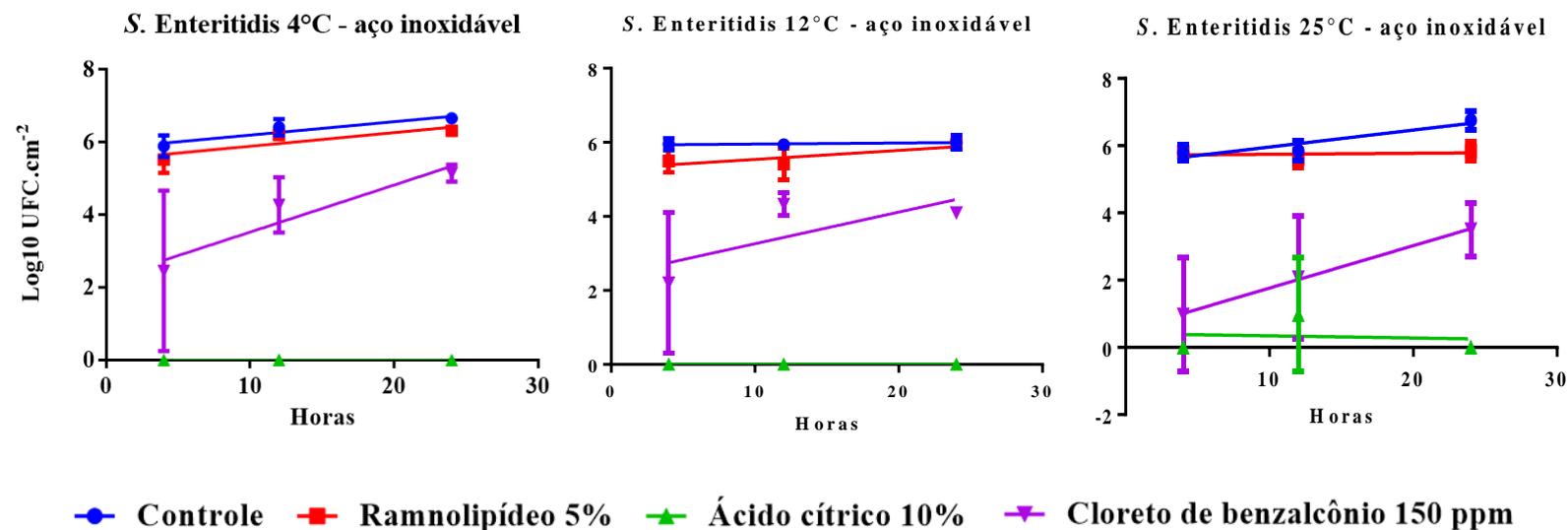


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = -0,003073*X + 4,383 (0,01)	Y = 0,03122*X + 3,475 (0,61)**	NP	Y = 0,1067*X - 0,7472 (0,46)**
12°C	Y = -0,003362*X + 4,359 (0,01)	Y = 0,01328*X + 4,017 (0,08)	NP	Y = 0,06423*X - 0,4496 (0,21)
25°C	Y = 0,01615*X + 4,340 (0,49)**	Y = 0,004600*X + 4,341 (0,02)	NP	NP

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 39 – Modelos de predição de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

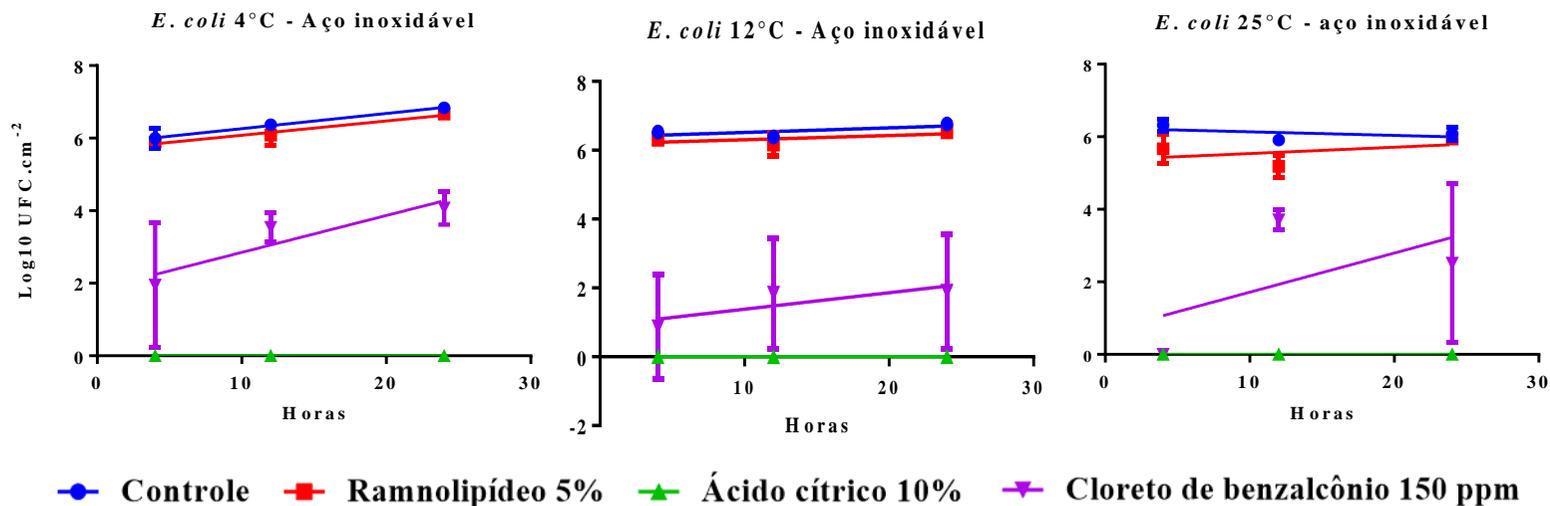


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,03682*X + 5,835 (0,68)**	Y = 0,03773*X + 5,517 (0,60)**	NP	Y = 0,1297*X + 2,233 (0,45)**
12°C	Y = 0,002902*X + 5,925 (0,03)	Y = 0,02444*X + 5,294 (0,03)	NP	Y = 0,08549*X + 2,405 (0,28)
25°C	Y = 0,05044*X + 5,456 (0,70)	Y = 0,003038*X + 5,714 (0,01)	Y = -0,006405*X + 0,4099 (0,00)	Y = 0,1260*X + 0,5065 (0,41)**

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 40 – Modelos de predição de *Escherichia coli* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

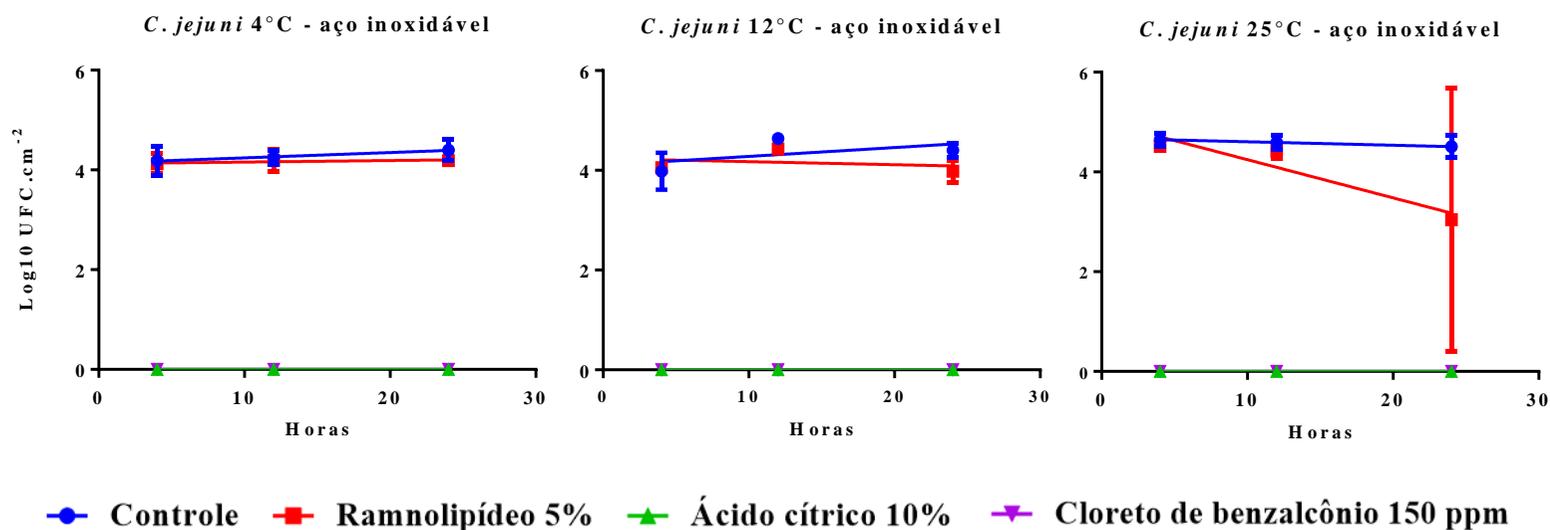


	Controle	Ramnolípídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,04188*X + 5,843 (0,85)**	Y = 0,03937*X + 5,686 (0,81)**	NP	Y = 0,1016*X + 1,835 (0,44)**
12°C	Y = 0,01334*X + 6,383 (0,38)	Y = 0,01223*X + 6,183 (0,19)	NP	Y = 0,04793*X + 0,9029 (0,08)
25°C	Y = -0,009918*X + 6,236 (0,15)	Y = 0,01745*X + 5,363 (0,13)	NP	Y = 0,1079*X + 0,6369 (0,22)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 41 – Modelos de predição de *Campylobacter jejuni* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em aço inoxidável a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

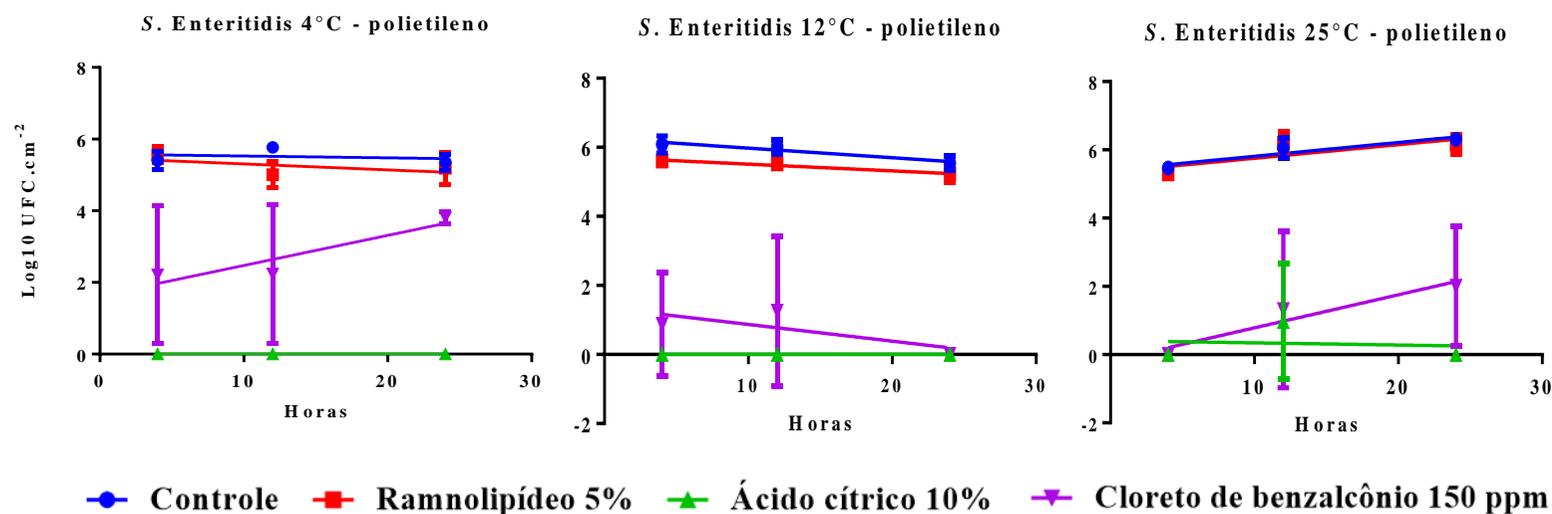


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,01068*X + 4,135 (0,18)	Y = 0,003107*X + 4,127 (0,02)	NP	NP
12°C	Y = 0,01777*X + 4,102 (0,19)	Y = -0,006111*X + 4,235 (0,04)	NP	NP
25°C	Y = -0,006982*X + 4,676 (0,14)	Y = -0,07659*X + 5,012 (0,19)	NP	NP

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 42 – Modelos de predição de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

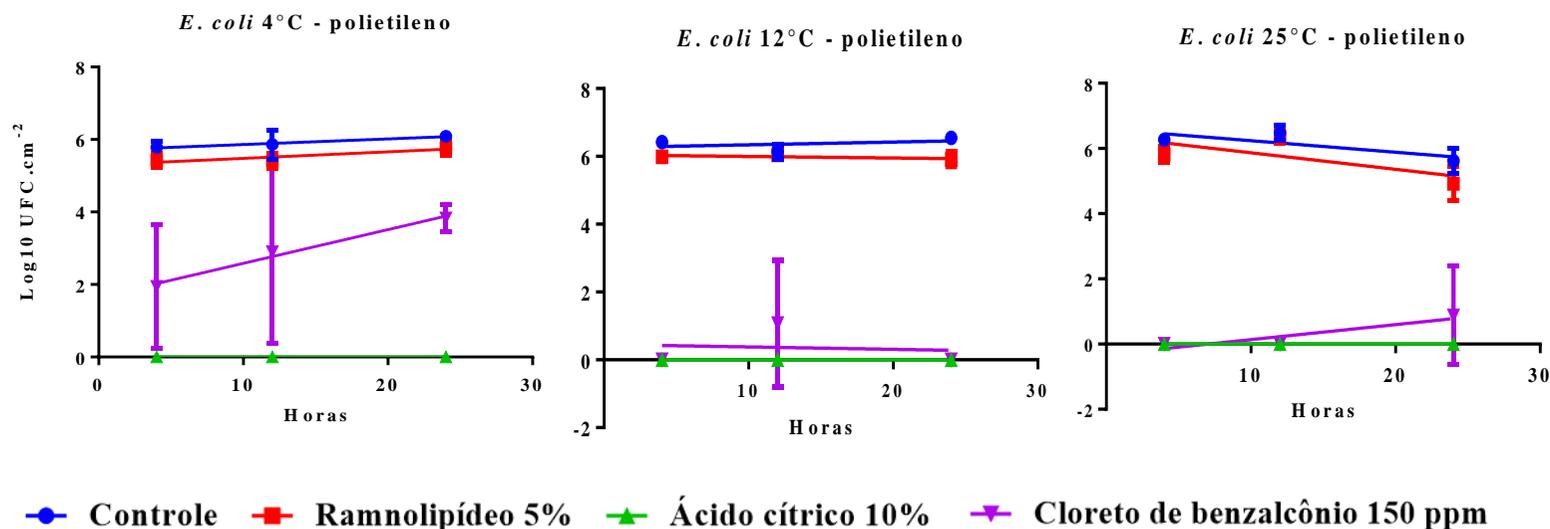


	Controle	Ramnolipídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = -0,005137*X + 5,580 (0,02)	Y = -0,01663*X + 5,474 (0,13)	NP	Y = 0,08394*X + 1,635 (0,21)
12°C	Y = -0,02791*X + 6,257 (0,58)**	Y = -0,01957*X + 5,708 (0,60)**	NP	Y = -0,04847*X + 1,356 (0,08)
25°C	Y = 0,04055*X + 5,405 (0,71)**	Y = 0,03997*X + 5,354 (0,48)**	Y = -0,006405*X + 0,4099 (0,00)	Y = 0,09689*X - 0,1829 (0,25)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 43– Modelos de predição de *Escherichia coli* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.

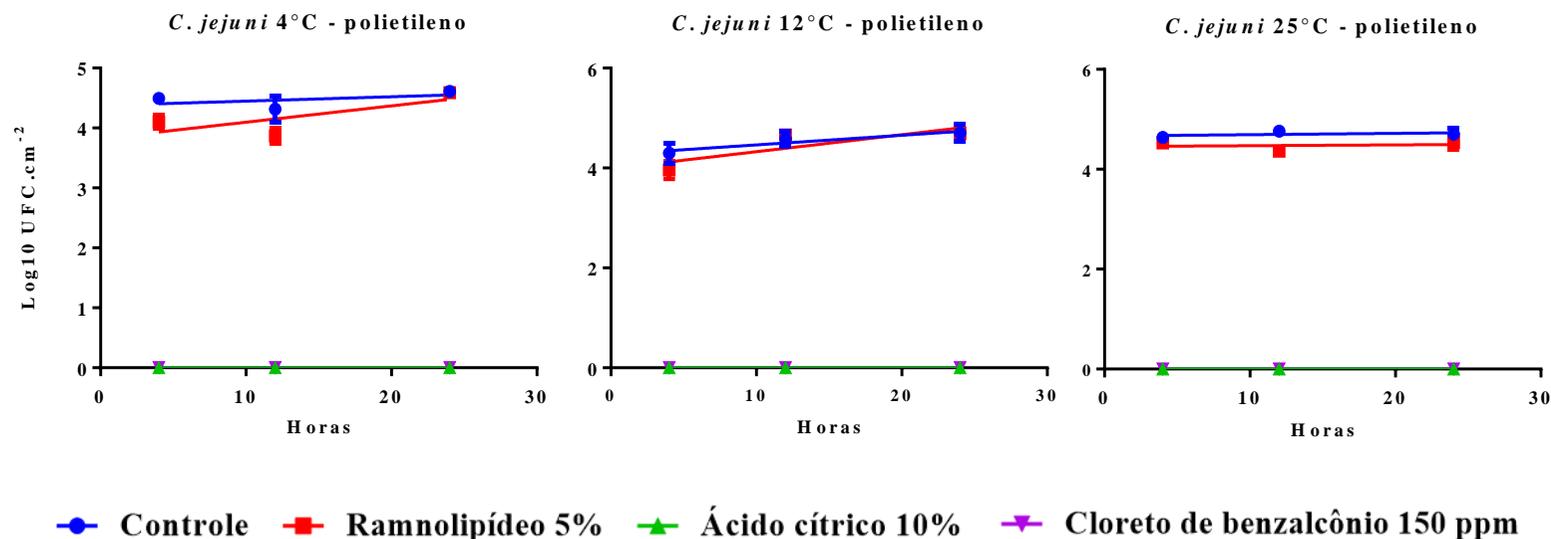


	Controle	Ramnolípido 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,01553*X + 5,706 (0,27)	Y = 0,01807*X + 5,299 (0,40)	NP	Y = 0,09304*X + 1,654 (0,21)
12°C	Y = 0,008136*X + 6,260 (0,09)	Y = -0,004544*X + 6,044 (0,09)	NP	Y = -0,007065*X + 0,4522 (0,00)
25°C	Y = -0,03540*X + 6,593 (0,46)**	Y = -0,05075*X + 6,376 (0,39)	NP	Y = 0,04596*X - 0,3217 (0,21)

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

Figura 44 – Modelos de predição de *Campylobacter jejuni* (\log_{10} UFC.cm⁻²) em polietileno a 4°C, 12°C e 25°C para biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis + *Escherichia coli* + *Campylobacter jejuni*.



	Controle	Ramnolípídeo 5%	Ácido cítrico 10%	Cloreto de benzalcônio 150 ppm
	Equação regressão (R ²)			
4°C	Y = 0,007309*X + 4,375 (0,14)	Y = 0,02725*X + 3,824 (0,50)**	NP	NP
12°C	Y = 0,01931*X + 4,270 (0,50)**	Y = 0,03402*X + 3,987 (0,62)**	NP	NP
25°C	Y = 0,002631*X + 4,666 (0,06)	Y = 0,001651*X + 4,455 (0,01)	NP	NP

**R² estatisticamente significativo (p<0,05)

NP: Não foi possível gerar o modelo

6 DISCUSSÃO

6.1 Influência da temperatura e superfície na formação de biofilmes mono e multiespécies de *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*

Nos últimos anos, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* vem sendo relacionados a surtos de DTA no mundo todo. Neste sentido, é de grande importância o estudo dos mecanismos adotados por estes patógenos que permitam a sua sobrevivência ao longo da cadeia de processamento de alimentos. Entre as estratégias de resistência, o biofilme é conhecido por conferir proteção frente ao estresse ambiental e antimicrobianos (BRONNEC *et al.*, 2016). Contudo, este processo de formação de biofilme caracteriza-se por ser complexo e influenciado pela espécie, superfície, disponibilidade de nutrientes e condições ambientais, como temperatura (NAIR *et al.*, 2015). Sendo assim, no presente estudo buscou-se simular as condições mais próximas daquelas encontradas em matadouros-frigoríficos de aves. Além disso, a utilização de cepas provenientes de fontes avícolas torna os resultados obtidos mais próximos da realidade. Segundo Røder *et al.* (2016), ensaios de biofilme utilizando apenas cepas padrão podem comprometer a extrapolação dos dados para o ambiente natural, já que, na maioria dos casos, as cepas padrão não foram isoladas nas mesmas condições que serão realizados os experimentos. Ainda, a co-cultura de cepas padrão entre si ou com cepas de campo tem relevância reduzida, caso não sejam encontradas juntas no microambiente natural.

A utilização de meios de cultura pobres em nutrientes é uma ferramenta amplamente utilizada em microbiologia para verificar a capacidade de adesão de um microrganismo, seja fungo ou bactéria. Este tipo de meio simula uma condição de estresse nutricional, favorecendo o desenvolvimento de adesinas, as quais estão relacionadas aos estágios iniciais da formação de biofilme (SINGH *et al.*, 2017). Neste contexto, o TSB sem glicose é um dos meios mais citados na literatura para formação de biofilme, inclusive demonstrando bons resultados para *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* (SANDERS; FRANK; ARNOLD, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; NAIR *et al.*, 2015; ILIADISA *et al.*, 2018). No presente estudo, o uso deste meio de cultura possibilitou verificar a formação de biofilme pelas três espécies avaliadas.

A técnica de formação de biofilme em microplacas de poliestireno é considerada um bom método de *screening* para avaliar a capacidade de formação de biofilme, permitindo também a realização de testes com compostos antimicrobianos. Soma-se a

isso o fato de possuir baixo custo, uma vez que não necessita de equipamentos caros, a não ser o leitor de microplacas. Como desvantagens, destaca-se a baixa reprodutibilidade e repetibilidade (AZEREDO *et al.*, 2017). No entanto, com o objetivo de reduzir este problema, no presente estudo foram utilizadas, além das triplicatas biológicas, triplicatas técnicas, sendo consideradas formadoras de biofilme somente as cepas que demonstraram capacidade de adesão nos três ensaios realizados.

A habilidade de adesão ao poliestireno por *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli* demonstrada neste estudo, também já foi relatada por outros autores (SCHONEWILLE *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2013; NAIR *et al.*, 2015; LAMAS *et al.*, 2016; NIELSEN *et al.*, 2018; PENG *et al.*, 2018). Além disso, a produção de biofilme destes microrganismos não diferiu significativamente entre as fontes de isolamento. Cabe ressaltar que, estudos comparativos da formação de biofilme entre isolados da mesma espécie, mas de diferentes origens são pouco frequentes (BORGES *et al.* 2017). Nair *et al.* (2015) avaliando sorovares de *Salmonella* de diferentes fontes (excrementos de aves, fezes de humanos, vegetais, carcaças, solo e manguezais) verificaram que praticamente a totalidade deles formou biofilme a 37°C, independente da origem. Zhang *et al.* (2017) realizaram estudo analisando a produção de biofilme de cepas de *C. jejuni* isoladas de solo, aerossóis e suabe de cloaca. Os autores constataram que todos os isolados de solo e aerossóis foram produtores de biofilme a 42°C em microerofilia. Rodrigues *et al.* (2019) verificaram que a formação de biofilme de APEC a 25°C foi de aproximadamente 56% para as amostras de cama de aviário, 59% para as amostras de celulite e 48% para amostras de lesão do trato respiratório, não sendo evidenciada diferença significativa entre as origens.

A realização dos ensaios de formação de biofilme em temperaturas comuns às das plantas de processamento de aves assumem grande importância, uma vez que representam de forma mais aproximada o ambiente onde as cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* estariam em condições normais. Contudo, a maioria dos estudos ainda avaliam a capacidade de adesão destas espécies em condições ideais de cultivo em laboratório, como por exemplo, a 37°C para *S. Enteritidis* e *E. coli*, e 42°C ou 37°C em microaerofilia para *C. jejuni*. Experimentos realizados nestas condições possuem os mesmos problemas do uso de cepas padrão, fornecendo dados pouco representativos da realidade e limitando a extrapolação dos resultados.

Nos biofilmes monoespécie de *E. coli*, as cepas que formaram biofilme a 4°C nas microplacas de poliestireno, praticamente também o fizeram a 12°C, com poucas

exceções. O mesmo foi observado para *C. jejuni* a 4°C, 12°C e 25°C. De modo geral, nossos achados demonstraram a produção de biofilme mono e multiespécies pelas três espécies em todas as temperaturas testadas. Ademais, as cepas que demonstraram capacidade de adesão no poliestireno também foram capazes de aderir isoladamente e em combinação sobre o polietileno e o aço inoxidável. Este resultado confirma que o modelo de formação de biofilme em poliestireno para *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* a 4°C, 12°C e 25°C é válido para aço inoxidável e polietileno nestas mesmas condições.

A adesão a 4°C pode revelar que microrganismos patogênicos podem aderir em temperaturas de resfriamento de carcaças, como a água do *chiller* nos tanques de aço inoxidável, ou de refrigeradores domésticos. Da mesma forma, a capacidade de formação de biofilme a 12°C no aço inoxidável e polietileno serve como alerta em plantas de processamento de aves, uma vez que esta temperatura é requerida em estabelecimentos que realizem corte e desossa para exportação à União Européia (GEHLEN, 2016; BORGES *et al.*, 2018).

A capacidade de adesão a 25°C assume importância em determinados locais nos matadouros-frigoríficos, como salas de evisceração e onde fica a linha de inspeção. A temperatura nestes locais pode chegar próximo aos 25°C, de acordo com a época do ano e localização da planta de processamento. Além disso, esta temperatura está dentro do intervalo que a WHO considera como temperatura ambiente, sendo, portanto, comum em residências, padarias e restaurantes. No entanto, cabe ressaltar que, apesar de serem comuns aos ambientes doméstico e industrial, estas temperaturas ainda não haviam sido descritas como propícias para o desenvolvimento de biofilmes multiespécie por *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*. Os biofilmes formados nestas superfícies e temperaturas são de grande importância, uma vez que podem atuar como uma fonte persistente de contaminação por estes patógenos, o que pode levar à deterioração dos alimentos e / ou à transmissão de doenças.

As imagens de MEV demonstraram que apesar das três espécies apresentarem capacidade de adesão isoladamente, em todas as superfícies testadas, ou em combinações, no aço inoxidável, não foi evidenciada a estrutura tridimensional do biofilme. Este achado pode ter ocorrido em função do tempo de incubação utilizado. Segundo estudo desenvolvido por Milanov, Prúnic, Ljubojevic (2017), a estrutura tridimensional do biofilme para microrganismos menos fastidiosos, como *Salmonella* e *E. coli*, e utilizando TSB como meio de cultura ocorreu com 48 horas de incubação a 20°C.

Cabe ressaltar que, as superfícies de polietileno e aço inoxidável utilizadas para os ensaios com biofilme mono e multiespécie, bem como para a MEV, foram adquiridas de indústrias que produzem este tipo de material para plantas de processamento de carnes, sendo que nenhuma delas foi submetida a uso prévio. No entanto, chama a atenção a irregularidade do aço inoxidável em comparação ao polietileno e ao poliestireno. Como observado nas imagens, a presença destas irregularidades pode formar pequenos espaços que são ideais para adesão microbiana. Este achado tem um reflexo prático bastante importante para indústria de alimentos, pois estas pequenas depressões no aço inoxidável, além de favorecer o acúmulo de matéria orgânica, protegem os microrganismos durante os procedimentos de limpeza e desinfecção, garantindo a sua permanência no ambiente de processamento.

Outro fato interessante é que ao avaliar os resultados de contagem em placa de *E. coli* e *S. Enteritidis* em biofilme monoespécie no aço inoxidável e nos polímeros, observou-se que não houve diferença significativa de adesão nestas superfícies. Porém, as imagens de MEV mostraram que a adesão ao poliestireno e ao polietileno foi menor comparado ao aço. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que quando colocados no cultivo com os microrganismos, os cupons de aço inoxidável afundam e as demais superfícies mantem-se em suspensão. Este fato faz com que a área de contato do aço com as bactérias seja reduzida em relação aos polímeros, contudo, as irregularidades presentes neste metal contribuem para uma maior adesão das bactérias, fazendo com que as contagens passem a se equivaler.

A capacidade de adesão dos microrganismos às superfícies hidrofóbicas, como o poliestireno e polietileno, está relacionada à característica de hidrofobicidade das células bacterianas (ABDALLAH *et al.*, 2014; KRASOWSKA; SIGLER, 2014). Da mesma forma, a adesão a superfícies hidrofílicas, como o aço inoxidável, é comum em células hidrofílicas. Segundo Renner e Weibel (2011) a adesão e maturação do biofilme sobre substratos hidrofílicos é um processo mais rápido comparado aos substratos hidrofóbicos. Além disso, a presença de irregularidades no aço eleva ainda mais a energia desta superfície, atraindo os microrganismos no intuito de promover o equilíbrio energético. Com relação aos polímeros, as forças de van der Waals são as principais atuantes no favorecimento a adesão dos microrganismos, independente da existência de irregularidades e de outros defeitos. Neste caso, as pontes de hidrogênio formadas entre a bactéria e a superfície mantem a bactéria fortemente aderida.

Sanders, Frank e Arnold (2008) ao avaliarem a taxa de recuperação de *C. jejuni* em biofilme multiespécies com *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae* e *Corinebacterium divergens* a 13°C e 20°C no aço inoxidável, obtiveram 10² UFC/mL após 24 horas de incubação. Do contrário, Gehlen (2016) não obteve sucesso na recuperação do *C. jejuni* no aço inoxidável, polietileno e poliuretano em biofilme multiespécies juntamente com *S. Enteritidis*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, mesmo utilizando condições semelhantes às avaliadas no presente estudo. Um fato que possivelmente possa ter influenciado neste resultado foi a quantidade de células no inóculo. Gehlen (2016) fez uso de um inóculo com 2,5x10² UFC/mL, ao passo que neste estudo o inóculo foi de 10⁸ UFC/mL. Ainda, os resultados do presente estudo demonstraram que a taxa de adesão ao aço inoxidável foi maior comparado ao polietileno para *E. coli* e *S. Enteritidis*, independente da combinação de bactérias e temperatura. Indo de encontro a este achado, Gehlen verificou que para *E. coli* a adesão foi maior no polietileno e, para *S. Enteritidis*, as contagens equivaleram-se nas duas superfícies.

Em grande parte das situações analisadas nos biofilmes multiespécies, a temperatura não teve influência sobre a adesão de *E. coli* e *S. Enteritidis* às superfícies. Somente em alguns casos observou-se uma maior adesão a 12°C e 25°C em relação a 4°C. Para *C. jejuni*, a formação de biofilme no aço e no polietileno foi similar nas três temperaturas independente da combinação microbiana. Estes resultados vão de encontro ao que descrevem alguns pesquisadores, onde a temperatura geralmente é uma das variáveis que mais afetam a formação de biofilme (GIAOURIS *et al.*, 2005; SANDERS; FRANK; ARNOLD, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2014; PIRAS *et al.*, 2015; TEH *et al.*, 2016).

6.2 Uso de ácidos orgânicos, ramnolipídeo e cloreto de benzalcônio para controle do biofilme mono e multiespécie de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*

Todos os compostos utilizados foram capazes de atuar em maior ou menor grau na prevenção ou remoção do biofilme monoespécie de *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli*. Contudo, além da temperatura, o tipo de microrganismo teve influência na eficácia das substâncias testadas. Cabe ressaltar que para os três microrganismos avaliados, todas as

concentrações ofereceram algum efeito de antiadesão ou remoção do biofilme, independente da temperatura.

A boa atuação dos AO em baixas temperaturas já foi descrita por outros pesquisadores. Borges, Saavedra e Simões (2012) avaliaram a atuação do ácido gálico e do ácido ferúlico na prevenção de biofilme por isolados de patogênicos de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*. Os autores observaram uma redução de mais de 70% na formação de biofilme com o uso destes AO, afirmando que estes fitoquímicos apresentam grande potencial como estratégia para controle de biofilmes.

Tendo em vista a grande importância que o aço inoxidável possui para a indústria de alimentos, trabalhos com este material visando avaliar o controle de biofilme com AO vem sendo desenvolvidos. Park e Chen (2015) obtiveram uma eliminação parcial de biofilme de *E. coli* nesta superfície utilizando ácido acético e ácido láctico a 2%. Akbas e Cag (2016), ao testarem diferentes tipos de AO na antiformação e remoção de biofilme por *Bacillus cereus* em aço inoxidável, demonstraram que o ácido cítrico teve atuação na eliminação do biofilme, inclusive melhor do que um desinfetante a base de cloro. Na prevenção do biofilme, reduziu-se em mais de 60% a adesão microbiana.

A temperatura teve grande influência sobre a atuação dos AO no estudo desenvolvido por AKAR *et al.*, (2013), onde verificou-se que o ácido fórmico teve ação prejudicada a 5°C quando comparado a 15°C frente a isolados de *S. Infantis* e *S. Typhimurium* de origem avícola. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo, onde em baixas temperaturas estas substâncias tiveram, em alguns casos, a ação um pouco comprometida, principalmente nos ensaios de remoção a 4°C.

Gomes e Nitschke (2012) observaram o efeito do biosurfactante na antiformação e destruição de biofilmes de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. Como conclusão, os autores afirmaram que a ação do produto depende do tipo de microrganismo envolvido, da concentração e do tempo de contato. Zeraik e Nitschke (2010) constataram que a temperatura também é um fator determinante para sua atuação, sendo que a 4°C o biosurfactante teve um melhor desempenho na prevenção do biofilme comparado a 25°C e 35°C. Esta boa atuação do biosurfactante a 4°C também foi observada neste trabalho, principalmente para *S. Enteritidis*.

Nos biofilmes multiespécie, diferentemente do que foi verificado nos monoespécie, o ramnolipídeo não apresentou bons resultados, sendo que a contagem no

grupo tratado com este biosurfactante não diferiu do grupo controle em nenhuma das condições avaliadas. Gomes e Nitschke (2012) afirmaram que de fato o efeito antimicrobiano dos biosurfactantes em culturas mistas é reduzido. Cabe ressaltar que a maioria das pesquisas realizadas com biosurfactantes utilizam tempos de contato com o biofilme de duas horas a seis horas de contato. No entanto, estudos com elevados tempos de exposição aos antimicrobianos não simulam as condições ideais de uso em plantas de processamento de alimentos. Nestes locais, o tempo destinado aos procedimentos de limpeza e desinfecção está cada vez mais reduzido. Sendo assim, os tempos de contato de cinco e dez minutos, os quais foram testados no presente estudo, estão mais próximos da rotina na indústria.

Akbas e Kokumer (2015) realizaram estudo avaliando a prevenção e remoção do biofilme de *S. aureus* em condições semelhantes às aquelas descritas neste estudo. Os autores puderam constatar que a ação do AC a 2% e 10% na prevenção e remoção do biofilme foi significativamente melhor nos cupons de aço inoxidável em relação as microplacas de poliestireno. Este resultado está em consonância aos obtidos nesta pesquisa, onde para o aço inoxidável o tratamento de remoção com este AO praticamente zerou as contagens de todos os microrganismos em todas as combinações e condições ambientais avaliadas. Uma provável explicação para este achado é que os testes com antimicrobianos em microplacas permitem analisar apenas os níveis de remoção do biofilme. Contudo, além do efeito de remoção, os antimicrobianos podem ter efeito na inativação de células bacterianas no próprio biofilme. Sendo assim, esta técnica pode subestimar a ação bactericida dos compostos a serem testados. Já o método de contagem em placa realizado para o aço inoxidável permite avaliar tanto o que foi removido quanto o que foi inativado após o tratamento.

Após o ramnolípídeo, o CB foi o produto que mais apresentou comprometimento de desempenho em baixas temperaturas, principalmente a 4°C. De fato, outros trabalhos já relataram o efeito temperatura – dependente deste desinfetante (CAMILOTTI *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016). Nos biofilmes multiespécies, o CB a 25°C teve boa eficácia para todos os microrganismos. Para *C. jejuni* e em algumas situações para *E. coli*, O CB apresentou praticamente 100% de eficácia na remoção do biofilme.

Um ponto importante deste estudo foi conduzir a investigação do efeito de culturas mistas na suscetibilidade antimicrobiana de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*. De modo geral, este último microrganismo, ao contrário do que foi observado nos biofilmes

monoespécie e excluindo o ramnolipídeo, teve sensibilidade máxima aos compostos testados em todas as temperaturas e combinações testadas, com raras exceções. Já *S. Enteritidis* e *E. coli* mostraram-se como os patógenos mais resistentes, principalmente para o CB.

Considerando a atuação do ramnolipídeo, AC e do CB entre as superfícies, observou-se, em alguns casos, uma melhor atuação dos produtos no polietileno comparado ao aço inoxidável. Contudo esta diferença pode ser, em maior parte, resultante do efeito de adesão nesta superfície, que foi menor em relação ao aço na maioria das situações.

6.3 Modelagem preditiva para biofilmes multiespécies de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*

De maneira geral, a maioria dos modelos gerados foram referentes a adesão às superfícies ou ao tratamento com ramnolipídeo. O fato de que nestas duas condições, nenhuma das contagens zerou, pode ter colaborado com a geração dos modelos, mesmo sem apresentar R^2 significativo. Os tratamentos com AC e CB zeraram as contagens em muitas das situações avaliadas, impossibilitando a construção de modelos ou fornecendo modelos pouco explicativos. Outro fator limitante foi o pequeno número de repetições em cada ponto de observação. Em um primeiro momento o objetivo desta etapa do estudo era a geração de modelos de análise multivariada, onde todas as variáveis estudadas pudessem ser avaliadas em uma única equação. Contudo, a presença de variáveis categóricas (superfície, temperatura e combinação microbiana) em conjunto com variáveis numéricas (tempo de formação do biofilme) inviabilizaram este tipo de modelo.

Dentre os modelos construídos, 20 deles apresentaram R^2 maior que 0,60, permitindo uma explicação de pelo menos 60% da contagem bacteriana obtida em função das variáveis estudadas. Considerando que estes modelos tratam de biofilmes multiespécies, onde um grande número de variáveis influencia a adesão e inativação dos microrganismos, um R^2 superior a 50% pode ser considerado satisfatório.

De acordo com Schneider, Hommel e Blettner (2010) os modelos de regressão linear devem ser constituídos por uma variável Y dependente que deve ser contínua, enquanto as variáveis independentes podem ser contínuas, binárias ou categóricas. Todos estes pressupostos foram atendidos neste estudo para elaboração dos modelos.

Ademais, estes mesmos autores afirmaram que em áreas biológicas e médicas para cada variável independente o ideal é trabalhar com no mínimo 20 observações ou repetições. Quando uma amostragem é muito pequena, apenas fortes relações podem ser demonstradas.

Valderrama, Ostiguy e Cutter (2014) desenvolveram modelos de regressão visando revelar diferenças na formação de biofilme entre diferentes linhagens de *L. monocytogenes*. Os autores constataram que os resultados obtidos demonstram a importância do entendimento de fatores ambientais sobre a produção de biofilme deste patógeno, permitindo diferenciar a adesão entre as linhagens, justificando a prevalência de algumas delas em *habitats* específicos. Bernardes (2008) elaborou modelos com o intuito de avaliar a adesão de *Bacillus cereus* em aço inoxidável em função do tempo e da temperatura, uma vez que a contaminação por esta bactéria costuma causar grandes problemas à inocuidade dos produtos lácteos. Como resultado, foi observado que o fator temperatura apresentou uma maior influência sobre a adesão desta bactéria em aço inoxidável, sendo obtido um bom ajuste dos modelos na faixa entre 25°C a 35°C. Considerando-se que as juntas dos equipamentos em plantas de laticínios são de borracha e que nesta superfície a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* é favorecida, Chmielewski e Frank (2006) propuseram e validaram modelos de inativação pelo calor (água quente) para este patógeno em biofilmes mono e multiespécies (*L. monocytogenes* + *Pseudomonas* spp. + *Pantoea agglomerans*). Como conclusão, os autores afirmaram que o modelo gerado pode ser uma importante ferramenta para adequação de processos de sanitização com água quente em superfícies de borracha.

Os modelos matemáticos em biofilmes multiespécies são pouco frequentes, inclusive não há relatos na literatura de modelos combinando *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* em condições que simulem a adesão e inativação microbiana no ambiente industrial. Além disso, este é o primeiro estudo de modelagem para biofilmes realizado pelo grupo de pesquisa do CDPA.

7 CONCLUSÕES

A maioria das cepas de *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli* apresentaram capacidade de formação de biofilme nas microplacas de poliestireno a 4°C, 12°C e 25°C.

O ramnolipídeo, bem como os dois AO, foram aptos a prevenir o biofilme dos três patógenos em todas as condições avaliadas. Contudo, sua eficácia teve influência do microrganismo, temperatura e concentração de cada substância.

O ramnolipídeo, AC, AM, e CB promoveram a remoção do biofilme de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni*, em todas as temperaturas e concentrações. De modo geral, as mais altas concentrações e tempos de contato apresentaram os melhores resultados. Dos AO, o AC foi ligeiramente mais eficiente em comparação ao AM.

Todas as cepas de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* que produziram biofilme no poliestireno, também o fizeram no aço inoxidável e no polietileno. *S. Enteritidis* e *E. coli* aderiram igualmente nas três superfícies, mas o *C. jejuni* teve adesão reduzida nos polímeros, comparado ao aço inoxidável.

Os isolados de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* foram capazes de aderir ao aço inoxidável e ao polietileno em todas as combinações microbianas realizadas a 4°C, 12°C e 25°C.

O ramnolipídeo não foi capaz de remover o biofilme misto de *S. Enteritidis*, *E. coli* e *C. jejuni* nas combinações, superfícies e temperaturas testadas. O AC mostrou-se como sendo o composto mais eficiente na remoção do biofilme em todas as condições. O CB apresentou os melhores resultados na remoção do biofilme a 12°C e, principalmente a 25°C, para *E. coli* e *S. Enteritidis*. Para *C. jejuni*, este desinfetante foi eficaz em todas as condições testadas.

Foi possível gerar 158 modelos de predição para os biofilmes multiespécies, sendo 47 deles com R² significativo. Desses, 20 representam modelos de adesão e 27 modelos de inativação microbiana.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que, nas condições avaliadas no presente estudo, cepas de *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli* foram capazes de formar biofilmes mono e multiespécies em temperaturas e superfícies comumente encontradas em matadouros-frigoríficos de aves. Desta forma, enfatiza-se a importância da adoção de métodos e produtos para controle ou erradicação dos biofilmes bacterianos a fim de mitigar o risco de contaminação da carne e produtos processados. Produtos a base de ácidos orgânicos e de quaternários de amônio demonstraram ser uma excelente alternativa na prevenção ou remoção dos biofilmes pré-formados por estes patógenos.

O estudo dos biofilmes multiespécies de *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli* através de modelos matemáticos constituiu-se em uma ferramenta bastante útil na indústria de alimentos, uma vez que permite a tomada de decisões com base em probabilidade. Mediante uso da modelagem, permite-se avaliar a formação do biofilme em um intervalo de tempo sobre determinada superfície, bem como avaliar o efeito de um tratamento de remoção considerando variáveis como tempo e temperatura. Os dados gerados permitem ao Controle de Qualidade das Agroindústrias tomar decisões mais assertivas acerca de controle e erradicação de contaminação por biofilmes nos mais diversos ambientes. No entanto, cabe ressaltar que, cada indústria deve gerar seus próprios modelos com base nos seus próprios dados de contaminação, desta forma, o uso da modelagem é otimizado e mais aplicável.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar outros compostos com atividade antimicrobiana frente a biofilmes mono e multiespécies de *S. Enteritidis*, *C. jejuni* e *E. coli* (Ex. bacteriófagos, nanopartículas de metais, água eletroquimicamente ativada).

Parcerias com outras áreas de pesquisa, como a Engenharia de Materiais, visando o estudo de moléculas que possam ser utilizadas para recobrimento das superfícies de uso comum em matadouros – frigoríficos, como aço inoxidável, polietileno e poliuretano.

Geração de mais dados que possam abastecer os modelos de predição ou gerar novos modelos, visando melhorar o grau de ajuste dos mesmos.

Utilização de redes neurais artificiais para construção de modelos matemáticos de predição para biofilmes multiespécies e comparação com os modelos gerados pela estatística convencional.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, F.B *et al.*, Detection of Cell Surface Hydrophobicity, Biofilm and Fimbriae Genes in *Salmonella* Isolated from Tunisian Clinical and Poultry Meat. **Iran Journal Public Health**. v. 43, p. 423-431, 2014.
- ABPA, **Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual ABPA 2018**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acesso em: Janeiro de 2019.
- AKAR, N *et al.*, Investigation of characterization and biofouling properties of PES membrane containing selenium and copper nanoparticles. **Journal of Membrane Science**. v. 437, p. 216-226, 2013.
- AKBAS, M.Y. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. *In: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.). Formatex 2015. p. 383-394, 2015.
- AKBAS, M.Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. **International Journal of Food Science and Technology**. v.50, n.7. p. 1666–1672, 2015.
- AKBAS, M.Y.; CAG, S. Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. **Food Science and Technology International**. v. 0, p. 1–11, 2016.
- AKELAH, A. Polymers in Food Processing Industries. *In: AKELAH, A Functionalized Polymeric Materials in Agriculture and the Food Industry*. USA: Sringer. 2013. Cap. 4, pp 195-248.
- ALLOS, B. M. *et al.*, *Campylobacter jejuni* strains from patients with guillain-barré syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 263-268, 1998.
- AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. **Microbial Pathogenesis**. v. 111, p. 156–162, 2017.
- ANDRADE N.J. 2008. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ANTUNES, P *et al.* Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**. v.22, p. 110-121, 2016.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 542, de 17 de Julho de 2018 D.O.U de 18/7/2018. Proposta de revisão da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 2001, que dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4660474/CONSULTA+P%C3%9ABLICA>

+N%C2%BA+542+GGALI.pdf/f5a0de8f-8a83-44ee-a95d-290fa426c851 Acesso em: Março de 2019.

ARGYRI, A *et al.*, Effect of high pressure processing on the survival of *Salmonella* Enteritidis and shelf-life of chicken fillets. *Food Microbiology*. v. 70, p.55-64, 2018.

ASAHI, Y *et al.*, Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. **AMB Express**. v. 5, pp. 9, 2015.

ASLAM, M *et al.*, Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. **International Journal of Microbiology**. v. 2, p. 49-76, 2014.

ATANASSOVA, V.; REICH, F.; BECKMANN, L.; KLEIN, G. Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, p. 141-145, 2007.

AYEBAH, B *et al.*, Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. **Journal of Food Protection**. v. 69, p. 2143–2150, 2006.

BACK, A. Campilobacteriose. *In*: BACK, A. **Manual de Doenças de Aves**. 2. ed. Cascavel/PR. 2010a. p. 119-122.

BACK, A. Salmonelose Aviária. *In*: BACK, A. **Manual de Doenças de Aves**. 2. ed. Cascavel/PR. 2010b. p. 174-192.

BAE, Y. M., & LEE, S. Y. Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces. **Journal of Food Science**. v. 77, M61–M64, 2012.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, p. 495-508, 2000.

BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. *In*: CALNEK, B. D. **Diseases of poultry**. 12 ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2008. cap. 18, p. 691-738.

BAUMANN, A. R.; MARTIN, S. E.; FENG, H. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. **Journal of Food Protection**. v. 72, p. 1306–1309, 2009.

BELOIN, C.; GHIGO, J.M. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends in Microbiology**. v.13, p. 16-19, 2005.

BERCHIERI, J.A *et al.*, **Doenças das aves**. São Paulo: Facta, 2009. 1104 p.

BERNARDES, P.C. Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão. **Dissertação de mestrado**. 2008. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.p.56.

BERRANG, M. N. *et al.*, Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1556-1560, 2007.

BHUNIA, A. K. Salmonella enterica. In: _____. (Org.). Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. New York: Springer, 2008. p. 201-216.

BORGES, A.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling**.v. 28, p. 755-67, 2012.

BORGES, K *et al.*, Phenotypic and Molecular Characterization of Salmonella Enteritidis SE86 Isolated from Poultry and Salmonellosis Outbreaks. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 14, p. 742-754, 2017.

BORGES, K *et al.*, Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.38, p. 71-76, 2018.

BRONNEC, V *et al.*, Adhesion, Biofilm Formation, and Genomic Features of *Campylobacter jejuni* Bf, an Atypical Strain Able to Grow under Aerobic Conditions. **Frontiers in Microbiology**. v.7. p. 01-14, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 78, de 3 de novembro de 2003, aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de novembro de 2003a, seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº41 de 04/12/2017, modifica Instrução Normativa Nº 78, de 3 de novembro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 04 de abril de 2017.

BRASIL. Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA. – Ano 1, n. 1 (2015) – Brasília, DF: Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de **93**
Inspeção de Produtos de Origem Animal, Coordenação Geral de Programas Especiais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2015. Disponível em: www.saude.gov.br/sinanweb. Acesso em: Fevereiro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Vigilância epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimento - VE- DTA – período de 2000 a 2014. 2014. Disponível em: www.saude.gov.br Acesso em: Maio de 2017.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa n° 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 5 de março de 1999, seção 1, p. 17.

BRASIL. Serviço de Vigilância em Saúde. Surtos Alimentares no Brasil - dados atualizados em maio de 2017. Disponível em: < <https://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017/> >. Acesso em: Fevereiro de 2019.

BURMØLLE, M *et al.*, Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. **Applied Environmental Microbiology**. v. 72, p. 3916-3923, 2006.

BURMØLLE, M *et al.*, Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?. **Trends in Microbiology**. v. 72, p. 84-91, 2014.

CAMILOTTI, E *et al.*, Simulação de condições de uso de quaternário de amônio frente amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. **Revista brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.16, 2015.

CARVALHO, D *et al.*, Atividade dos desinfetantes cloreto de benzalcônio e iodóforo sobre cepas de *Escherichia coli* patogênica aviária isoladas em frangos de corte. **Revista brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.18, p.10-15, 2017.

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

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>>. Acesso em: Fevereiro de 2019.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). 2014. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>>. Acesso em: Fevereiro de 2019.

CDC - Center for Diseases Control and Prevention. *Campylobacter*. 2017. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html> >. Acesso em Fevereiro de 2019.

CHEN, X.; STEWART, P.S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. **Environmental Science Technology**. v.30, p. 2078–2083, 1996.

CHIA, T.W.R *et al.*, Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**. v. 26, p. 853-859, 2009.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. **LWT – Food Science and Technology**. v. 39, p. 11-19, 2006.

COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1495 of 23 August 2017 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Campylobacter* in broiler carcasses. Official Journal of the European Union. Disponível em: <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg2017_1495.pdf>. Acesso em: Março de 2019.

COS, P *et al.*, Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. **Current Pharmaceutical Design**. v.16, p. 2279-2295, 2010.

COSTERTON, J.W. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**. v. 49, p. 711-745, 1995.

CULOTTI, A.; PACKMAN, A.I. *Pseudomonas aeruginosa* facilitates *Campylobacter jejuni* growth in biofilms under oxic flow conditions. **FEMS Microbiology Ecology**. v.91, n.12, p. 1-8, 2015.

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

DE OLIVEIRA, D.C *et al.*, Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 11, p. 478-483, 2014.

DHOWLAGHAR, N *et al.*, Scanning electron microscopy of *Salmonella* biofilms on various food-contact surfaces in catfish mucus. **Food Microbiology**. v.74, p. 143-150, 2018.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**. v.15, p. 167-193, 2002.

DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, p.2394 – 2406, 1987.

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

ELIAS, S *et al.*, Modeling Growth Kinetic Parameters of *Salmonella* Enteritidis SE86 on Homemade Mayonnaise Under Isothermal and Nonisothermal Conditions. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.0, n.0, p. 1-6, 2016.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. v. 4, 141 p, 2011.

EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. v. 14, n. 2, 207 p, 2016.

EFSA - European Food Safety Authority. Zoonoses diseases: progress has stalled. 2018. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/181212>>. Acesso em: Fevereiro de 2019.

EPPS, S *et al.*, Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 10, p. 6292–6304, 2013.

ESWARANANDAM, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. **Food Microbiology and Safety**. v. 69, FMS79-FMS84, 2004.

EUROSURVEILLANCE. Lenglet and National Epidemiological Surveillance Network of Spain. E-alert 9 August: over 2000 cases so far in *Salmonella* Hadar outbreak in Spain associated with consumption of pre-cooked chicken, July-August, 2005. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esw.10.32.02770-en>>. Acesso em Marco de 2019.

FDA - Food and Drugs Administration. Department of Health and Human Services, Part 178 Indirect Food Additives: Adjuvants, Producers AIDS and Sanitizers. **Code of Federal Regulation**. Title 21, v. 3. 2012.

FERREIRA, A. J.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JR, *et al.*, **Doença das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 197-205, 2009.

FERREIRA, T. Z. SESTERHENN, R.; KINDLEIN, L. Perdas econômicas das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte em Matadouros-Frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, pub 1021, 2012.

FLASZ, A *et al.*, A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**. v.26, p. 181-185, 1998.

- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 623-633, 2010.
- FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.
- FREILICH, S *et al.*, The large-scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions. **Nucleic Acids Research**. v. 38, p. 3857–3868, 2010.
- FUHRMAN, J.A. Microbial community structure and its functional implications. **Nature**. v. 459, p. 193–199, 2009.
- FURUKAWA, S *et al.*, Mixed-Species Biofilm Formation by Direct Cell-Cell Contact between Brewing Yeasts and Lactic Acid Bacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. V. 74, p. 2316–2319, 2010.
- GAST, R.K. Salmonella Infectious: Paratyphoid Infectious. *In*: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2008. cap.16, p. 636-665.
- GEHLEN, S.S. Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2016, 105 pp.
- GIAOURIS, E *et al.*, Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. **Journal of Food Protection**. v. 68, p. 2149–2154, 2005.
- GIAOURIS, E *et al.*, Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 105–113, 2013.
- GIAOURIS, E *et al.*, Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, 26 pp., 2015.
- GOLIN, M.A *et al.*, Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.29, p.361-368, 2007.
- GOMES, A. M. O.; SOUZA JR, I. P. Microscopia Confocal e Multifotônica – Princípios e Aplicações. *In*: SOUZA, W. **Microscopia Óptica: fundamentos e aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010, pp. 113-128.
- GOMEZ-CARRETERO, S *et al.*, Redox-active conducting polymers modulate *Salmonella* biofilm formation by controlling availability of electron acceptors. **Npj Biofilms and Microbiomes**. p. 1-10, 2017.

GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE.M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**. v.25, p. 441- 447, 2012.

GOMES, L.C *et al.*, *Pseudomonas grimontii* biofilm protects food contact surfaces from *Escherichia coli* colonization. **LWT – Food Science and Technology**. In press, Corrected Proof – Note to users. 2017.

GÓMEZ, N. C *et al.*, A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. v. 30, p. 51–58, 2012.

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

GURAN, H.S *et al.*, Prevalence and some virulence genes of *Escherichia coli* O157 isolated from chicken meats and giblets. **Annals of Animal Science**. v. 17, p.555-563, 2017.

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

HALAN, B.; BUEHLER, K.; SCHMID. A. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. **Trends Biotechnology**. v. 30, p. 453–465, 2012.

HANNING, I.; JARQUIN, R.; SLAVIK, M. *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. **Journal Applied Microbiology**. v. 105, p. 1199–1208, 2008.

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

HEYDORN, A *et al.*, Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**.v.146, p. 2395–23407, 2000.

HARREMOËS, P. Biofilm kinetics. In **Water Pollution Microbiology**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1978, p. 71-109.

HARRIS, N.P.; HANSFORD, G. A. study of substrate removal in a microbial film reactor. **Water Research**. v. 10, p. 935-943, 1976.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**. v. 24, p. 380-92, 2007.

HESSAIN, A.M *et al.*,Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 recovered from meat and meat products relevant to human health in Riyadh, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Science**. v. 22, p. 725-729, 2015.

HILBERT, F *et al.*, Survival of *Campylobacter jejuni* under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76, p. 5911–5917, 2010.

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

HORN, H.; LACKNER, S. Modeling of Biofilm Systems: A Review. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v. 146, p. 53-76, 2014.

HSIAO, C.; SIEBERT, K.J. Modelling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. **International Journal of Food Microbiology**.v. 47, 189-201, 1999.

HULANKOVA, R *et al.*, Microbiological quality of organic chicken meat during refrigerated storage in air and modified atmospheres. *British Poultry Science*. p. 1-8, 2018.

ICA, T *et al.*, 2012. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, p. 1033–1038, 2012.

ILIADISA, I *et al.*, Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica* ser. Enteritidis and Typhimurium under low nutrient food-related conditions. **Food Research International**. v.107, p. 10-18, 2018.

JAMAL, M. *et al.*, Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 4, pp.14, 2015.

JAMES, G.; BEAUDETTE, L.; COSTERTON, J. Interspecies bacterial interactions in biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 15, p 257–262, 1995.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. Trad. Por Tondo, E.C.; Rech, R.; Geimba, M.P.; Flôres, S.H.; Frazzon, J.; Carvalho, A.L.O.; Frazzon, A.P.G.; Oliveira, F.A.; Oliveira, F.C.; Bianchini, A.; Silva, A.C.A. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 471-490, 2005.

JOHNSON, T.J *et al.*, The Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Genomes. **Journal of Bacteriology**. v. 189, p. 3228-3236, 2007.

JOSHUA, G.W.P *et al.*, Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**. v. 152, p. 387–396, 2006.

KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. **Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology**. v. 4, 2014.

MELLATA, M *et al.*, Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborn Pathogens and Diseases**. v. 10, p. 916-932, 2013.

MELO, R.T *et al.*, Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms **Frontiers in Microbiology**. v. 8, article 1332, 2017.

MERINO, L *et al.*, Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**. v. 119:530-540, 2019.

MILANOV, D.; PRUNIĆ, B.; LJUBOJEVIĆ, D. Biofilm forming ability of *Salmonella enterica* serovar Tennessee isolates originating from feed. **Veterinarski arhiv**. v. 87, p. 691-702, 2017.

KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-40, 2004.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 73, p. 310–347, 2009.

KEERTHIRATHNE, T.P *et al.*, A Review of Temperature, pH, and Other Factors that Influence the Survival of *Salmonella* in Mayonnaise and Other Raw Egg Products. **Pathogens**. v. 5, pp. 11, 2016.

KLAPPER, A.E. Description of Mechanical Response Including Detachment Using a novel Particle Model of Biofilm/Flow Interaction. **Water Science Technology**. v.55, p.265–273, 2007.

KOYUNCU, S *et al.*, Organic acids for control of *Salmonella* in different feed materials. **BMC Veterinary Research**. v.9, n.81. p. 1-9, 2013.

KREFT, J.U.; BOOTH, G.; WIMPENNY, J.W.T. BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth. **Microbiology**. v. 144, p. 3275–3287, 1998.

KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. *In*: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas/SP: FACTA, 2. ed. 2009. p. 21-38.

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

LAMAS, A.; REGAL, P.; VÁSQUEZ, B.; MIRANDA, J.M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. **Journal of the Science of Food Agriculture**. v. 98, p. 4014-4032, 2018.

LAMPPA, J.W.; GRISWOLD, K.E. Alginate lyase exhibits catalysis-independent biofilm dispersion and antibiotic synergy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 57, p. 137-145, 2013.

LANDINI, P *et al.*, Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 86, p. 813-823, 2010.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G.; BORGMANN. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, P. 874-882, 2003.

LAWRENCE, J.R.; NEU, T.R. SWERHONE, G.D.W. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v.32, p. 253-261, 1998.

LEE, J. H *et al.*, Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. **Biofouling**. v. 27, p. 1095–1104, 2011.

LEE, Y.J *et al.*, Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. **Food Control**. v.44, p. 16-21, 2014a.

LEE, K *et al.*, Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. **ISME Journal**. v. 8, p. 894–907, 2014b.

LI, Y.H.; TIAN, X. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. **Sensors**. v. 12. P. 2519-2538, 2012.

LOWRY, O.H *et al.*, Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v.193, p. 265-275, 1951.

MALORNY B., HAUSER E., DIECKMANN R. New approaches in subspecies-level *Salmonella* classification. In: Porwollik S., editor. **Salmonella From Genome to Function**. Norfolk, UK: Academic Press; p. 1–23, 2011.

MARIN, C.; LAINEZ, M. Salmonella detection in feces during broiler rearing and after live transport to the slaughterhouse. **Poultry Science**. v. 88, p. 1999-2005, 2009.

MAUKONEN, J *et al.*, Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 327-356, 2003.

MCDONALD, K.; SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 52, p. 1-27,1999.

MEDEIROS, V.M. Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies de termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado. **Dissertação de mestrado**. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2011. 78pp.

- MITCHELL, N.M *et al.*, Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 81, p. 1177–1187, 2015.
- MIZAN, M.F.R.; JAHID, I.K.J.; HA, S.D. Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. **Food Microbiology**. v. 49, p. 41-55, 2015.
- MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**. v. 40, p. 533-540, 2006.
- MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 3rd ed. New York: Wiley, 1991.
- MOREIRA, D.S.; LINS, U.G.C. Técnicas de microscopia para quantificação e identificação de microrganismo. **Revista Acadêmica Saúde e Ambiente**. v.5, p. 01-11, 2010.
- MORTARA, R.A *et al.*, Microscopia Confocal por Varredura a Laser: Fundamentos e Métodos. **Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações**. 1.ed, São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 2015. Cap. 8, p. 225-252.
- NAHAR, K.; ULLAH, S.M.; ISLAM, N. Osmotic adjustment and quality response of five tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum* Mill) following water deficit stress under subtropical climate. **Asian Journal of Plant Sciences**. v. 10, p. 153-7, 2011.
- NAIR, A *et al.*, Biofilm formation and genetic diversity of *Salmonella* isolates recovered from clinical, food, poultry and environmental sources. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 36, p. 424-433, 2015.
- NDAHETUYE, J. B *et al.*, G. Role of lactic acid bacteria as a biosanitizer to prevent attachment of *Listeria monocytogenes* F6900 on deli slicer contact surfaces. **Journal of Food Protection**. v. 75, p. 1429–1436, 2012.
- NIELSEN, D.W *et al.*, The Impact of Media, Phylogenetic Classification, and *E. coli* Pathotypes on Biofilm Formation in Extraintestinal and Commensal *E. coli* From Humans and Animals. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, article 902, 2018.
- LAWRENCE, T. N. Extracellular polymeric substances in microbial biofilms. *In*: Holst, O.; BRENNAN, P.J.; VON ITZSTEIN, M. **Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications**. Elsevier. Cap. 37, p. 733-758, 2010.
- NEUT, D *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and slime excretion on antibiotic-loaded boné cement. **Acta Orthopaedica**, v. 76, p. 109-114, 2005.
- NEWELL, D. G *et al.*, *Campylobacter* epidemiology—sources and routes of transmission for human infection. *In*: KLEIN, G. **Campylobacter Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease**. Elsevier, Cap. 5. p. 85-110, 2017.

NYATI, K.K.; NYATI, R. Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. **BioMed Research International**. v. 2013, pp.13, 2013.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. **Trends Food Science Technology**. v. 18, p.252–259, 2007.

NITSCHKE, M *et al.*, Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. **Letters in Applied Microbiology**. v.49, p. 241-247, 2009.

OGLESBY-SHERROUSE, A.G *et al.*, The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathogens Disease**. v. 70, p. 307-320, 2014.

OLIVEIRA, D.C.V *et al.*, Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 11, p. 478-483, 2014.

OLIVEIRA, A. L *et al.*, Prevalence of *ColV* Plasmid-Linked Genes and In Vivo Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*. **Foodborne pathogens and disease**. v. 12, p. 679-685, 2015.

OULAHAL-LAGSIR, N *et al.*, The development of an ultrasonic apparatus for the noninvasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment. **Letters in Applied Microbiology**. v. 30, p. 47–52, 2000.

PABST, B *et al.*, Gel-Entrapped *Staphylococcus aureus* Bacteria as Models of Biofilm Infection Exhibit Growth in Dense Aggregates, Oxygen Limitation, Antibiotic tolerance, and Heterogeneous Gene Expression. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 60, p. 6294–6301, 2016.

PADDOCK, S. W. An introduction to confocal imaging. *In*: PADDOCK, S. W. (Editor). **Confocal Microscopy: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1999. Série: Methods in Molecular Biology. v. 122, pp. 1-34.

PANDE, V.; MCWHORTER, A.R.; CHOUSALKAR, K.K. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of commercial organic acid products against *Salmonella enterica* isolates recovered from egg farm environment. **Avian Pathology**. v. 47, 2018.

PANTANELLA, F *et al.*, Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità**. v.25, p. 31-42, 2013.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B.L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**. v. 14, p. 576-588, 2016.

PARK, Y.J.; CHEN, J. Control of the Biofilms Formed by Curli- and Cellulose-Expressing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Treatments with Organic Acids and Commercial Sanitizers. **Journal of Food Protection**. v.78, p. 990-995, 2015.

- PATEL, J *et al.*, Differences in biofilm formation of produce and poultry Salmonella enterica isolates and their persistence on spinach plants. **Food Microbiology**. V. 36, p. 388-394, 2013.
- PAULA, C.M.D. Avaliação da Resistência térmica, ácida e a desinfetantes de cepas de Escherichia coli O157:H7 isoladas no sul do Brasil. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- PAULINO, C. A. Antissépticos e desinfetantes. *In*: SPINOSA, H.; GORNIK, S.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4ª ed.: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2006, p. 441-447.
- PEÑA, S.T. Biofilms and their impact on food industry. **Visanet Outreach Journal**. Publicação online: 12 de maio de 2010. Disponível em: <https://www.visavet.es/en/articles/biofilms-impact-food-industry.php>. Acesso em: 27 de maio de 2017.
- PENG, L.Y *et al.*, Rutin inhibits quorum sensing, biofilm formation and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**. v.119, p. 54-59, 2018.
- PEETERS, E.; NELIS, H.J; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**. v.72, p. 157-165, 2007.
- PIRAS, F *et al.*, Influence of Temperature, Source, and Serotype on Biofilm Formation of Salmonella enterica Isolates from Pig Slaughterhouses. **Journal of Food Protection**. v. 78, p. 1875–1878, 2015.
- PITTS, B *et al.*, A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**. v. 54, p.269–276, 2003.
- RAMAMURTHY, T *et al.*, Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. **Frontiers in Public Health**. v.2, pp. 9, 2014.
- RANASALVA,N.; SUNIL,R.; POOVARASAN, G. Importance of Biosurfactant in Food Industry. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**. v. 7, p. 06-09, 2014.
- RENNER, L.D; WEIBEL, D.B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bull**. v. 36, p. 347–355, 2011.
- REESER, R.J *et al.*, Characterization of *Campylobacter jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 1908-1913, 2007.
- RICKE, S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Sciences**. v. 82, p. 632–39, 2003.

RIENZO, M.A *et al.*. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 363, p. 01-08, 2016.

RITTMANN, B.E.; MCCARTY, P.L. Evaluation of steady-state biofilm kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 22, p. 2359-2373, 1980.

RIVARDO, F *et al.*, Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.83, p. 541-553, 2009.

RØDER, H. L.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? **Trends in Microbiology**. v. 24, p. 503–513, 2016.

RODRIGUES, L.B *et al.*, Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 41, p. 1082-1085, 2010.

RODRIGUES, S.V *et al.*, Biofilm Formation by Avian Pathogenic *Escherichia coli* is Not Related to In Vivo Pathogenicity. **Current Microbiology**. v. 76, p. 194–199, 2019.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. A predictive microbiology: Review paper. **International Journal Food Microbiology**, v.62, p. 231-245, 1994.

ROSS, T.; DALGAARD, P., TIENUNGOON, S. Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal Food Microbiology**, v. 62, p. 231-245, 2000.

ROSSI, D.A *et al.*, Biofilms of Salmonella and Campylobacter in the Poultry Industry. **Poultry Science Intech Open**. In: MANAFI, M. Editor. Cap. 5, p. 94-113. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/poultry-science/biofilms-of-salmonella-and-campylobacter-in-the-poultry-industry>>. Acesso em: Março de 2019.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FELIPE, L. M. Agentes de enfermidades de interesse em saúde pública associados a produtos de origem avícola. In: BERCHIERI JR, *et al.*, **Doença das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International journal of food microbiology**. v. 61, p. 81-85, 2000.

RUI, B. R *et al.*, Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Garça – SP, Ano IX, n. 16. 2011.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SADEKUZZAMAN, M *et al.*, Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.14, p. 491-509, 2015.

SCALAN, E *et al.*, Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerging Infectious Disease**. v. 17, p. 7-15, 2011.

SAMAPPITO, S.; BUTKHUP, L. An analysis on organic acids contents in ripe fruits of fifteen mao luang (*Antidesma bunius*) cultivars, harvested from dipterocarp forest of Phupan Valley in Northeast Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences**.v.11, p.974-81, 2008.

SANDERS, S.Q.; FRANK, J.F.; ARNOLD, J.W. Temperature and Nutrient Effects on *Campylobacter jejuni* Attachment on Multispecies Biofilms on Stainless Steel. **Journal of Food Protection**. v. 71, p. 271-278, 2008.

SAUER, M *et al.*, Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends Biotechnology**. v. 26, p. 100 – 108, 2008.

SCHMIDT, R.H.; ERICKSON, D.J. Sanitary Design and Construction of Food Processing and Handling Facilities. **University of Florida Extension**. 10 pp., 2005

SCHMIDT, R.H *et al.*, Characteristics of Food Contact Surface Materials: Stainless Steel. **Food Protection Trends**. v. 32,p.574–584, 2012.

SCHNEIDER, A *et al.*, Linear Regression Analysis. **Deutsches Arzteblatt Internatinal**. v. 107, p. 776–782, 2010.

SCHONEWILLE, M *et al.*, Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions.**Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, p. 2122-2128, 2010.

SCHONEWILLE, E *et al.* Vestby2 Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 65, p. 360 – 365, 2012.

SERENO, M *et al.*, Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by *Salmonella* sp. Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. V. 19, p. 103-108, 2017.

SHERROUSE, A.G.O *et al.*, The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathogens and Disease**. v. 70, p. 307-320, 2014.

SIDU, M.S.; SORUN, H.; HOLCK, A. Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Food-Related Bacteria. **Microbial Drug Resistance**. v. 8, p. 393-399, 2002.

SKANDAMIS, P.N *et al.*, *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. **Food Microbiology**. v. 26, p. 112-119, 2009.

SKYBERG, J *et al.*, Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. **Applied Microbiology International**. V. 102, p. 548-554, 2007.

SILAGYI, K *et al.*, Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. **Food Microbiology**. v. 26, p. 514-519, 2009.

SIMÕES, L *et al.*, Persister cells in a biofilm treated with a biocide. **Biofouling**. V.27, p. 403-411, 2011.

SILVA, J. *et al.*, *Campylobacter* spp. as a food born pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

SILVA, W.C *et al.*, Campylobacter: an overview of cases, occurrence in food, contamination sources and antimicrobial resistance in Brazil. **Food Reviews International**, v. 4, p. 364-389, 2018.

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

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

SINGH, A.K.S *et al.*, Standardization and Classification of *In vitro* Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Infectious Diseases**. v.9, p. 93 – 101, 2017.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**. v. 22, p.142-146, 2004.

SINGLA R, GANGULI A. Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 118, p.34-40, 2014.

SONI, K. A.; NANNAPANENI, R. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. **Journal of Food Protection**. v. 73, p. 1519–1524, 2010.

SOFOS, J.N.; GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. **Meet Science**. v. 86, p. 2-14, 2010.

SPERANDIO, V *et al.*, Quorum Sensing Is a Global Regulatory Mechanism in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v.17. p. 5187–5197, 2001.

SPERANDIO, V *et al.*, Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, p. 8951–8956, 2003.

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

STEENACKERS, H *et al.*, *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**. v.45, p.502–531, 2012.

STEPANOVIK, S *et al.*, Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. **APMIS**, v.115, p. 891–899, 2007.

STIEFEL, P *et al.*, Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 100, p.4135- 4145, 2016.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H.C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**. v.50, p.237-248, 2002.

SUNDHEIM, G *et al.*, Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.41, p. 235-239, 1998.

TANG, R *et al.*, Disinfectant-induced irritating cough in a child. **Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics**. v. 49, p. 800-800, 2011.

TARABEES, R *et al.*, Isolation and characterization of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from chicken meat in Egypt. **Journal of Infection in Developing Countries**. V. 11, p. 314-319, 2017.

TATCHOU-NYAMSI-KÖNIG, J *et al.*, Adhesion of *Campylobacter jejuni* and *Mycobacterium avium* onto polyethylene terephthalate (PET) used for bottled Waters. **Water Research**. V. 42, p. 4751-4760, 2008.

TEH, K. H.; FLINT, S.; FRENCH, N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. **International Journal of Food Microbiology**. v. 15, p. 118-124, 2010.

TEH, A. H. T.; LEE, S.M.; DYKES, G.A. Does *Campylobacter jejuni* Form Biofilms in Food-Related Environments?. **Applied and Environmental Microbiology**. v.80, p. 5154 –5160, 2014.

TEH, A.H.; LEE, S.M.; DYKES, G.A. The Influence of Prior Modes of Growth, Temperature, Medium, and Substrate Surface on Biofilm Formation by Antibiotic-Resistant *Campylobacter jejuni*. **Current Microbiology**. v. 73, p. 859 – 866, 2016.

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

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

USDA-FSIS. Safe and suitable ingredients used in the production of meat and poultry products. 2010. Directive 7120.1.rev.2. Disponível em: <http://www.isis.usda.gov/OPPD/E/dad/FISIS_directives/7120.1.Rev2.pdf>. Acesso em: Maio de 2017.

VALDERRAMAA, W.B OSTIGUYB, N.; CUTTERC, C.N. Multivariate analysis reveals differences in biofilm formation capacity among *Listeria monocytogenes* lineages. **Biofouling**. V.30, p. 1199 – 1209, 2014.

WANG, H *et al.*, In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **International Journal of Food Microbiology**. v. 167, p. 293-302, 2013.

WANNER, O.; GUJER, W. A multispecies biofilm model. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 28, p. 314-328, 1986.

WANNER, O *et al.*, **Mathematical Modeling of Biofilms**. IWA Publishing: London, UK, v. 18, pp. 199, 2006 .

WEBBER, B *et al.*, The Use of Vortex and Ultrasound Techniques for the in vitro Removal of *Salmonella* spp. Biofilms. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 43, 1332, 2015.

WHO - World Health Organization. 2003. Guidelines for the Storage of Essential Medicines and Other Health Commodities. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4885e/6.5.html#Js4885e.6.5>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2019.

WHO - World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. **Global Salm Surv**. 2016. Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms.> Acesso em: Fevereiro de 2019.

WHO - World Health Organization. Health Topics: *Escherichia coli*. 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/en/>. Acesso em: Fevereiro de 2019.

WHO - World Health Organization. Food Safety. 2017b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: Fevereiro de 2019.

WHO. World Health Organization. Health Topics: Salmonella (non-typhoidal). 2018. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: Fevereiro de 2019.

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Assessment of three-dimensional biofilm models through direct comparison with confocal microscopy imaging. **Water Science and Technology**. v. 49, p 177–185, 2004.

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

ZERAIK, A.E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as Agents to Reduce Adhesion of Pathogenic Bacteria to Polystyrene Surfaces: Effect of Temperature and Hydrophobicity. **Current Microbiology**. v. 61, p. 554-559, 2010.

ZELLE, R.M *et al.*, Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction, and Malate Export. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, p. 2766–2777, 2008.

ZHANG, T *et al.*, Genotypic diversity, antimicrobial resistance and biofilm-forming abilities of *Campylobacter* isolated from chicken in Central China. **Gut Pathogens**. v.9, pp. 10, 2017.

ZHANG, T. Modeling Biofilms: From Genes to Communities. **Processes**. v.5, p. 1-17, 2017.

APÊNDICE A – Identificação, fonte e ano de isolamento das cepas de *Salmonella* Enteritidis avaliadas neste trabalho.

Nº	Identificação (bacterioteca CDPA)	Fonte	Ano
1	192	Órgão de ave	1999
2	194	Órgão de ave	1999
3	207	Suabe de arrasto	2000
4	210	Suabe de arrasto	2000
5	213	Suabe de arrasto	2000
6	217	Suabe de arrasto	2000
7	219	Órgão de ave	2000
8	224	Órgão de ave	2000
9	225	Órgão de ave	2000
10	228	Suabe de arrasto	2000
11	230	Suabe de arrasto	2001
12	232	Suabe de arrasto	2001
13	233	Órgão de ave	2001
14	236	Suabe de arrasto	2001
15	241	Sem informação	Sem informação
16	242	Suabe de arrasto	2001
17	170	Carcaça de frango	2001
18	174	Carcaça de frango	1996
19	179	Carcaça de frango	1996
20	35	Carcaça de frango	2006
21	36	Carcaça de frango	2006
22	277	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2005
23	275	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2004
24	282	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2007
25	289	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2007

26	294	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2008
27	311	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2011
28	315	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2012
29	329	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2008
30	330	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2008
31	338	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2008
32	344	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2007
33	347	Produto avícola envolvido em surto de salmonelose em humanos	2007

APÊNDICE B - Identificação e fonte de isolamento das cepas de *Escherichia coli*, isoladas entre 2002 e 2008, avaliadas neste trabalho.

Nº	Identificação (bacterioteca CDPA)	Fonte
1	07	Lesão de celulite
2	09	Lesão de celulite
3	11	Lesão de celulite
4	14	Lesão de celulite
5	15	Lesão de celulite
6	18	Lesão de celulite
7	23	Lesão de celulite
8	28	Lesão de celulite
9	34	Lesão de celulite
10	35	Lesão de celulite
11	44	Lesão de celulite
12	57	Lesão de celulite
13	59	Lesão de celulite
14	67	Lesão de celulite
15	69	Lesão de celulite
16	70	Lesão de celulite
17	73	Lesão de celulite
18	75	Lesão de celulite
19	76	Lesão de celulite
20	82	Lesão de celulite
21	83	Lesão de celulite
22	87	Lesão de celulite
23	88	Lesão de celulite
24	91	Lesão de celulite
25	93	Lesão de celulite
26	97	Lesão de celulite
27	102	Lesão de celulite
28	103	Lesão de celulite
29	104	Lesão de celulite

30	110	Lesão de celulite
31	111	Lesão de celulite
32	116	Lesão de celulite
33	146	Lesão de celulite
34	166	Lesão de celulite
35	182	Lesão de celulite
36	185	Lesão de celulite
37	191	Lesão de celulite
38	281	Lesão de celulite
39	282	Lesão de celulite
40	283	Lesão de celulite
41	287	Lesão de celulite
42	288	Lesão de celulite
43	289	Lesão de celulite
44	293	Lesão de celulite
45	312	Lesão de celulite
46	3	Cama de aviário
47	4	Cama de aviário
48	31	Cama de aviário
49	36	Cama de aviário
50	46	Cama de aviário
51	55	Cama de aviário
52	71	Cama de aviário
53	72	Cama de aviário
54	77	Cama de aviário
55	84	Cama de aviário
56	85	Cama de aviário
57	90	Cama de aviário
58	95	Cama de aviário
59	105	Cama de aviário
60	106	Cama de aviário
61	193	Cama de aviário
62	290	Cama de aviário

63	302	Cama de aviário
64	314	Cama de aviário
65	318	Cama de aviário
66	8R	Lesão de colibacilose trato respiratório
67	14R	Lesão de colibacilose trato respiratório
68	33R	Lesão de colibacilose trato respiratório
69	36R	Lesão de colibacilose trato respiratório
70	38R	Lesão de colibacilose trato respiratório
71	63R	Lesão de colibacilose trato respiratório
72	C-07	Superfície de matadouro-frigorífico após higienização
73	C-10	Superfície de matadouro-frigorífico após higienização

APÊNDICE C – Identificação, fonte e ano de isolamento das cepas de *Campylobacter jejuni* avaliadas neste trabalho.

Nº	Identificação (bacterioteca CDPA)	Fonte	Ano
1	8	Carcaça resfriada	2012
2	11	Carcaça resfriada	2012
3	22	Carcaça resfriada	2012
4	40	Carcaça resfriada	2012
5	56	Carcaça resfriada	2012
6	61	Carcaça resfriada	2012
7	62	Carcaça resfriada	2012
8	63	Carcaça resfriada	2012
9	64	Carcaça resfriada	2012
10	65	Carcaça resfriada	2012
11	72	Carcaça resfriada	2012
12	73	Carcaça resfriada	2012
13	84	Carcaça resfriada	2012
14	170	Carcaça resfriada	2012
15	182	Carcaça resfriada	2012
16	185	Carcaça resfriada	2012
17	214	Carcaça resfriada	2012
18	1-L	Carcaça resfriada	2018
19	2-L	Carcaça resfriada	2018
20	3-L	Carcaça resfriada	2018
21	4-L	Carcaça resfriada	2018
22	5-L	Carcaça resfriada	2018
23	6-L	Carcaça resfriada	2018
24	7-L	Carcaça resfriada	2018
25	8-L	Carcaça resfriada	2018
26	11-L	Carcaça resfriada	2018
27	13-L	Carcaça resfriada	2018
28	16-L	Carcaça resfriada	2018
29	18-L	Carcaça resfriada	2018

30	20-L	Carcaça resfriada	2018
31	23-L	Carcaça resfriada	2018
32	25-L	Carcaça resfriada	2018
33	26-L	Carcaça resfriada	2018
34	27-L	Carcaça resfriada	2018
35	28-L	Carcaça resfriada	2018
36	29-L	Carcaça resfriada	2018
37	30-L	Carcaça resfriada	2018
38	36	Carcaça após primeira lavagem	2012
39	43	Carcaça antes da escaldagem	2012
40	122	Carcaça após depenagem	2012
41	164	Carcaça após depenagem	2012
42	194	Carcaça após a depenagem	2012
43	213	Carcaça após depenagem	2012
44	98	Cortes de frango	2012
45	99	Cortes de frango	2012
46	100	Cortes de frango	2012
47	103	Cortes de frango	2012
48	104	Cortes de frango	2012
49	109	Cortes de frango	2012
50	140	Cortes de frango	2012
51	141	Cortes de frango	2012
52	142	Cortes de frango	2012
53	143	Cortes de frango	2012
54	147	Cortes de frango	2012
55	172	Cortes de frango	2012
56	175	Cortes de frango	2012
57	177	Cortes de frango	2012
58	188	Cortes de frango	2012
59	189	Cortes de frango	2012
60	191	Cortes de frango	2012
61	206	Cortes de frango	2012
62	210	Cortes de frango	2012

63	230	Cortes de frango	2012
64	120	Suabe de cloaca	2012
65	78	Carcaça após evisceração	2012
66	150	Carcaça após evisceração	2012
67	168	Carcaça após evisceração	2012
68	198	Carcaça após evisceração	2012
69	118	Água pré-chiller	2012
70	121	Água chiller	2012
71	153	Água chiller	2012
72	154	Água chiller	2012
73	156	Água chiller	2012
74	196	Água chiller	2012
75	203	Água chiller	2012
76	162	Carcaça após lavagem final	2012
77	167	Carcaça após lavagem final	2012
78	169	Carcaça após lavagem final	2012
79	199	Suabe de caixa após lavagem	2012
80	217	Suabe de caixa após lavagem	2012
81	219	Suabe de caixa após lavagem	2012
82	220	Suabe de caixa após lavagem	2012
83	221	Suabe de caixa após lavagem	2012
84	222	Suabe de caixa após lavagem	2012
85	231	Suabe de caixa após lavagem	2012
86	232	Suabe de caixa após lavagem	2012
87	51	Carcaça congelada	2012
88	146	Carcaça congelada	2012
89	212	Carcaça congelada	2012

APÊNDICE D – Identificação (bacterioteca CDPA) das cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni* utilizadas nos experimentos 2, 3 e 4.

	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Escherichia coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
Experimento 2	35, 36, 170, 192, 217, 219, 224, 225, 230, 232, 233, 242, 275, 277, 282, 289, 294, 311, 329, 330, 338	14R, 36R, 38R, 04, 14, 28, 55, 67, 69, 90, 93, 102, 103, 106, 111, 146, 166, 185, 191, 281, 282, 287, 288, 289, 293, 302, 312, 314, 318, C-10	40, 43, 61, 62, 98, 118, 120, 146, 153, 154, 162, 169, 170, 172, 182, 212, 214, 219, 222, 02-L, 11-L, 20-L, 25-L, 30-L
Experimento 3	282, 289, 311, 217, 329, 275, 224, 277, 230, 338	14, 55, 69, 90, 103, C- 10, 146, 166, 191, 185	02-L, 11-L, 20-L, 25- L, 30-L
Experimento 4	217	C-10	25-L