



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**SARA MARTINS DE CARVALHO**

**Inibição de biofilme de *salmonella* Minnesota por agentes sanitizantes**

Uberlândia-MG

2018

**SARA MARTINS DE CARVALHO**

**Inibição de biofilme de *salmonella* Minnesota por agentes sanitizantes**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daise Aparecida Rossi

Uberlândia – MG

2018

**INIBIÇÃO DE BIOFILME DE *Salmonella* MINNESOTA POR AGENTES  
SANITIZANTES**

Monografia aprovada como requisito parcial a obtenção do título de Médico Veterinário no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

---

Daise Aparecida Rossi

---

João Batista Ferreira dos Santos

---

Guilherme Paz Monteiro

Uberlândia -MG  
2018

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha querida orientadora, Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi, por ter me aceitado como orientada, me ajudado, me ensinado e não desistir de mim em momentos de dificuldades, pois, após isso eu tive mais vontade de enfrentar meus desafios e finalizar o trabalho. Sou muito grata à você por todo o tempo dedicado à mim e por ter me reerguido quando eu estava no “chão”.

Em segundo lugar à Silvia, pois este trabalho é uma derivação de sua dissertação. Além disso, juntamente com a Renata, me proporcionaram ensinamentos técnicos, prática e companheirismo.

E não menos importante minha família e amigos, que estiveram ao meu lado me apoiando, me ensinando e me ajudando a me erguer diante de minhas próprias barreiras.

Aos membros do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia que colaboram na realização deste trabalho possível.

Ao professor João Batista e ao doutorando Guilherme que aceitaram compor esta banca de defesa. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

Muito obrigada a todos

## RESUMO

A salmonelose é uma importante gastroenterite de origem alimentar que atinge os humanos. O trato gastrointestinal dos frangos é um dos principais reservatórios desse agente etiológico, e assim, a carne destes animais pode ser contaminada durante as etapas de abate. A capacidade de formar biofilmes é uma importante forma de manutenção desse micro-organismo no ambiente, tanto na granja quanto na indústria, o que aumenta as oportunidades de infecção das aves e contaminação da carne. Assim, a prevenção e o controle da forma de vida sésil de *Salmonella* é extremamente importante para garantir a qualidade microbiológica da carne produzida e a segurança do consumidor. Objetivou-se avaliar a formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno por *S. Minnesota* e a efetividade do contato por 15 minutos dos sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8% na sua inibição. Foram utilizadas três cepas diferentes de *S. Minnesota* previamente isoladas para a formação de biofilmes nas superfícies dos três materiais (*slides*). Os biofilmes foram avaliados pelo método clássico de coloração com cristal violeta e leitura da densidade óptica ( $DO_{600}$ ) e utilizada fórmula para a classificação das cepas como forte, fraca ou sem capacidade de formar biofilme. Os biofilmes formados foram submetidos por 15 minutos aos sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%. A contagem de células viáveis de *S. Minnesota* foi realizada nos biofilmes antes e após o tratamento com os sanitizantes. A capacidade de *S. Minnesota* em formar biofilmes classificados quanto à biomassa em fortes, moderados ou fracos variou de acordo com a cepa e a superfície, com a formação de biofilmes fortes por todas as cepas quando a superfície foi o aço inoxidável. Porém não houve diferença nas contagens de micro-organismos nos biofilmes formados, indicando que no controle destas comunidades deve-se preferencialmente, utilizar agentes químico com ação também na matriz extracelular. O uso do hipoclorito de sódio 1% demonstrou ação superior ao da utilização do ácido peracético 0,8% na inibição das comunidades, independente da cepa e da superfície em que foi formado.

Palavras-chaves: Avicultura, forma sésil, salmonelose.

## ABSTRACT

Salmonellosis is an important food-borne gastroenteritis that strikes humans. The gastrointestinal tract of chickens is one of the main reservoirs of this etiological agent, and thus the meat of these animals can be contaminated during the stages of slaughter. The ability to form biofilms is an important way of maintaining this microorganism in the environment, both on the farm and in the industry, which increases the chances of bird infection and meat contamination. Thus, prevention and control of the *Salmonella* sessile form of life is extremely important to ensure the microbiological quality of the meat produced and the safety of the consumer. The objective of this study was to evaluate the formation of biofilms on the surfaces of stainless steel, polyurethane and polypropylene by *S. Minnesota* and the effectiveness of contact for 15 minutes of the sanitizers sodium hypochlorite 1% and peracetic acid 0.8% in its inhibition. Three different strains of *S. Minnesota* previously isolated for the formation of biofilms on the surfaces of the three materials (slides) were used. The biofilms were evaluated by the classical method of violet crystal staining and optical density reading (DO600) and used a formula for the classification of the strains as strong, weak or without biofilm formation capacity. The formed biofilms were submitted for 15 minutes to sanitizers 1% sodium hypochlorite and 0.8% peracetic acid. The viable cell count of *S. Minnesota* was performed on biofilms before and after treatment with the sanitizers. The ability of *S. Minnesota* to form biofilms classified as strong, moderate or weak biomass varied according to strain and surface, with the formation of strong biofilms by all strains when the surface was stainless steel. However, there was no difference in the counts of microorganisms in the formed biofilms, indicating that in the control of these communities it is preferable to use chemical agents with action also in the extracellular matrix. The use of sodium hypochlorite 1% showed an action superior to the use of peracetic acid 0.8% in the inhibition of the communities, regardless of the strain and the surface in which it was formed.

Key-words: Poultry, sessile form, salmonellosis.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 8  |
| 2. OBJETIVO.....  | 10 |
| 2.1 Objetivo geral.....   | 10 |
| 2.2 Objetivo específico.....  | 10 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO.....   | 11 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 14 |
| 4.1 Desenho de estudo.....  | 14 |
| 4.2 Amostras e reativação das cepas.....  | 14 |
| 4.3 Formação e classificação do biofilme.....                                   | 15 |
| 4.4 Avaliação da ação dos sanitizantes nos biofilmes.....                       | 16 |
| 4.5 Contagem de <i>S. Minnesota</i> nos biofilmes antes e após tratamentos..... | 16 |
| 4.6 Análise dos resultados.....   | 17 |
| 5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....   | 18 |
| 6. CONCLUSÃO.....   | 23 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 24 |

## 1. INTRODUÇÃO

Biofilme pode ser definido como a união de micro-organismos que produzem uma matriz extrapolimérica junto a superfícies bióticas ou abióticas, formando canais, pelos quais é possível o trânsito de células e substâncias que vão nutrir as bactérias (FLACH, KARNOPP E CORÇÃO, 2005). Um estudo realizado por Flemming & Wingerder (2010) estimou que na composição do biofilme, a matriz celular prevalecia em relação aos micro-organismos, compreendendo até 90% do total.

Chavant et al. (2007) afirmam que bactérias aderidas ao biofilme recebem proteção e apresenta maior resistência a ação de antimicrobianos quando comparadas às células livres, permanecendo nos equipamentos mesmo após a desinfecção. Isso pode gerar prejuízos econômicos e na qualidade microbiológica de alimentos com os quais tem contato, aumentando o potencial dessas bactérias em se tornarem problemas de saúde pública. Além disso, biofilmes de bactérias patogênicas em ambiente de produção de alimentos tornam-se pontos constantes de contaminação dos alimentos produzidos.

Dentre as bactérias formadoras de biofilme e de importância em saúde pública destacam-se os representantes do gênero *Salmonella*. O gênero comporta grande número de sorovares, entre eles, *S. Minnesota*, que teve seu primeiro isolamento relatado em um peru de três semanas de uma granja em Minnesota nos Estados Unidos em 1936 (EDWARDS E BRUNER, 1938).

Ainda não se conhece a verdadeira importância de *S. Minnesota* em saúde pública, mas estudos tem demonstrado que além de possuir um número relevante de hospedeiros, cepas deste sorovar podem apresentar alguns fatores de virulência, como resistência aos antimicrobianos (WANG et al., 2017).

As preocupações com este sorovar no Brasil tem se amplificado devido sua alta prevalência na cadeia de produção avícola, sendo considerada emergente no país por Voss-Rech et al. (2015). Estes pesquisadores verificaram que este sorovar foi o mais prevalente na cadeia de produção de aves, representando 40,24% dos isolamentos, seguido de *S. Infantis* (14,63%) e *S. Heidelberg* (7,31%). O alto número de isolamento indica que *S. Minnesota* deve possuir estratégias para se manter viável nas condições adversas ambientais como os

observados em granjas e abatedouros, sendo a formação de biofilmes, provavelmente, uma delas.

Um estudo realizado por Perin (2017) mostrou que mesmo com ações preventivas realizadas ao longo da cadeia de produção de aves foi encontrada elevada quantidade *Salmonella* sp. nos produtos avícolas do Paraná, sendo que em 4% das amostras, observou-se a presença de *S. Minnesota*.

Produtos de origem animal devem estar livres de contaminantes e durante a sua produção devem ser respeitadas as boas condições sanitárias dos equipamentos utilizados para a produção (PENG et al., 2002). Logo, um programa adequado de limpeza e desinfecção dos equipamentos da linha de produção se faz necessário para inviabilizar a presença e a proliferação de micro-organismos neste ambiente. Para isso, é preciso no mínimo duas etapas no processo de limpeza: a limpeza propriamente dita, que tem como função retirar sujidades, matéria orgânica e inorgânica, e uma segunda etapa, focada na desinfecção, uma vez que mesmo após a limpeza pode restar uma grande quantidade de micro-organismos viáveis (ANDRADE, PINTO, ROSADO, 2008).

Considerando a importância da salmonelose e da produção de biofilmes como forma de contaminação de alimentos, são necessários estudos que demonstrem a capacidade de formação de biofilmes por *S. Minnesota*. Neste contexto, é importante conhecer também, os fatores que influenciam na instalação destas comunidades, como o tipo de superfície e eficiência de agentes químicos na sua inibição. Estas informações são de interesse da indústria, da saúde pública e dos pesquisadores.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Objetivou-se avaliar a formação de biofilmes por cepas de *S. Minnesota*, classificar as cepas como formadoras de biofilmes fortes, fracos ou inexistentes, e ainda, verificar a ação do contato com os sanitizantes ácido peracético 0,8% e hipoclorito de sódio 1% na sua inibição.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar em três cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola:

- o índice de formação de biofilmes (IFB), classificando as cepas como fracas, fortes ou sem produção (inexistente);
- se há diferença entre os IFBs entre as cepas quando os biofilmes foram formados na superfície de aço inoxidável, polipropileno e poliuretano;
- a eficiência do contato por 15 minutos com os sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8% na inibição dos biofilmes nas diferentes superfícies;
- as contagens de células viáveis de *S. Minnesota* nos biofilmes antes e após tratamento com sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%;
- discutir comparativamente os resultados dos IFBs e contagens de células viáveis antes e após o tratamento com sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8% nas superfícies: aço inoxidável, polipropileno e poliuretano.

### 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

Os micro-organismos do gênero *Salmonella* são bacilos gram-negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. A temperatura ideal para seu crescimento é de 37°C, podem resistir à temperatura de congelamento e são destruídos em temperaturas acima de 60°C em um prazo de 15 minutos (D'aoust; Maurer, 2007). Além disso, algumas cepas possuem a habilidade de se aderir a vários tipos de superfícies formando biofilme, o que é facilitado no ambiente industrial, resultando em produtos contaminados, mesmo após processos de limpeza (STEPANOVIC et al. 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, *Salmonella* é uma bactéria que causa problemas tanto na saúde pública quanto na sanidade animal. O fato de normalmente habitar a microbiota intestinal de aves, aumenta a possibilidade de contaminação de produtos, principalmente de origem avícola, os quais estão entre os mais importantes na transmissão do patógeno (CORCORAN, 2013). Considerando os micro-organismos que infectam aves e que causam surtos de doenças em humanos, o contaminante mais frequente, dentre os casos onde é feita a identificação do patógeno é *Salmonella* spp. (STEPANOVIC et al. 2004).

Segundo Pickler et al. (2014), depois de ser inoculada por via oral, *Salmonella* Minnesota sai do trato gastrointestinal e passa para o fígado e ceco, local onde é encontrada depois de 12 horas de sua entrada. Este comportamento é similar ao observado em outros sorovares paratíficos e contribui para que práticas de manipulação durante o abate, como extravasamento do conteúdo intestinal seja uma forma de sua disseminação.

Biofilmes são definidos como agregados de micro-organismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, que forma uma estrutura hidratada e porosa, com exopolissacarídeos e canalículos entre microcolônias, por onde entram nutrientes e são eliminadas as excretas (FLACH, KARNOPP E CORÇÃO, 2005). Quando os micro-organismos se encontram livres são denominados como na forma planctônica e quando em biofilmes, classificados como em forma sésil.

A presença dos micro-organismos em biofilmes é considerada como uma estratégia para as bactérias se perpetuarem em ambiente hostil, onde permanece na forma sésil. Dentre os fatores que contribuem para a formação destas comunidades pode-se incluir a natureza da superfície em que irão aderir imperfeições, tempo de contato, período entre higienização e produtos químicos (ZIECH et al., 2016).

A presença de biofilmes na indústria alimentícia é causa de prejuízos, pois são pontos constantes de contaminação. Quando estes micro-organismos são deteriorantes, diminuem a vida de prateleira, causam alterações sensoriais e podem ser causa de descarte. O problema pode se ampliar quando são formados por patógenos, pois aí, tornam-se problemas de saúde pública (VIANA, 2006; ROSADO, 2009).

A formação de biofilme na indústria alimentícia é um desafio constante devido à dificuldade de remoção da matéria orgânica e à ineficiência dos processos de limpeza e sanitização (Viana, 2006). A dificuldade de remoção do biofilme aliada à sua resistência faz com que o mesmo possa ser viável por longos períodos (VESTBY et al., 2009).

O processo de desinfecção na indústria de alimentos possui como objetivo melhorar a sanidade do ambiente, e conseqüentemente, diminuir a contaminação dos alimentos. Tal procedimento é previsto na lei, onde são descritos os parâmetros de higiene a serem seguidos para garantir o menor grau de contaminação possível. O não cumprimento dessa legislação leva a proliferação de micro-organismos nos alimentos com prováveis conseqüências em saúde pública (WOLF, 2017). Ainda assim, esse processo se mostra insuficiente, o que foi mostrado por Borsoi et. al., (2010) que analisou três marcas de produtos alimentícios distintos e os resultados mostraram um percentual de isolamento de *Salmonella* em frango resfriado de 12,2%.

Vários agentes químicos podem ser utilizados na higienização da indústria de alimentos, e geralmente a sua escolha envolve custo e forma de ação. Dentre os mais utilizados encontram-se o hipoclorito de sódio e o ácido peracético. O ácido peracético destrói os micro-organismos pela destruição de pontes dissulfeto e enxofre da membrana celular, possui ação desnaturante sobre proteínas e enzimas celulares, além de interferir na permeabilidade celular (BARAH, 2013). Já o hipoclorito de sódio interfere na permeabilidade da membrana celular, altera proteínas, reage com ácidos nucleicos e tem forte atividade oxidante, sendo indicado para inibir ou destruir um grande número de micro-organismos, sendo ainda, considerado de baixo custo (ESTRELA et al., 2002). O ácido peracético possui custo mais elevado quando comparado ao hipoclorito (KITIS, 2004).

O Brasil é o maior produtor mundial e o segundo maior exportador de carne de frango, com mais de 30% de sua produção sendo destinada para a exportação (ABPA, 2017). Assim, além dos índices de produtividade, é necessário também, manter a segurança dos alimentos produzidos para que não representem risco ao consumidor ou embargos internacionais. Considerando a complexidade do sistema de produção de carne de aves e sua constante

modificação, faz-se necessário atender as medidas internacionais de qualidade, sanidade e bem-estar animal nesse sistema (PERETTI, 2017).

Uma das medidas importantes para a manutenção da qualidade microbiológica dos alimentos é a determinação de fatores que podem favorecer a presença de patógenos como *Salmonella* no ambiente de produção, assim como, de métodos para o seu controle.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Desenho do estudo

A formação de biofilmes, sua classificação e o uso de agentes químicos para a sua inibição foram avaliadas em três cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola de uma empresa com ciclo completo de produção. Estas cepas foram previamente classificadas como fortes moderadas e fracas produtoras de biofilmes.

Para a avaliação do biofilme, induziu-se *in vitro* a formação do mesmo na superfície de *slides* de 1 cm<sup>2</sup> de materiais comuns no ambiente de abate de frangos: aço inoxidável, poliuretano e polipropileno, e realizou-se sua posterior classificação qualitativa de acordo com o Índice de Formação de Biofilmes (IFB).

Após a formação dos biofilmes nos materiais já citados, os mesmos foram submetidos a dois tratamentos: uso do hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético a 0,8%, ambos com contato durante 15 minutos. A avaliação da inibição foi realizada pela contagem dos micro-organismos antes e após os tratamentos.

### 4.2. Amostras e reativação das cepas

Foram utilizadas 3 cepas puras de *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola de uma empresa com ciclo completo de produção durante os anos de 2009 e 2014, habilitada para exportação e comércio interno. As cepas foram previamente isoladas de peito de frango, coração de frango e carcaça *in natura* por Brasão (2017) e depositadas no Banco de cepas do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

As cepas congeladas a -70°C foram reativadas em 5 mL de caldo BHI (Difco®), incubadas à 37°C durante 24 horas, e após, estriadas em ágar XLD (Fluka®) e novamente incubadas a 37°C durante 24 horas.

Para o preparo do inóculo, colônias puras foram transferidas para caldo TSB (Merck®) e novamente incubadas a 37°C durante 24 horas.

Para padronizar a quantidade de células no estudo em 10<sup>7</sup> Log UFC foi feita a curva de crescimento bacteriano (DO<sub>600nm</sub> vs contagem Log UFC) de cada uma das cepas, que foi estabelecido em uma densidade óptica a 600nm (DO<sub>600nm</sub>) de 0,15 a 0,20.

### 4.3. Formação e classificação dos biofilmes

A formação de biofilmes foi realizada individualmente em cada uma das superfícies testadas: aço inoxidável, poliuretano e polipropileno. Foram realizadas três repetições independentes em dias diferentes.

Em cada uma das repetições, para cada uma das três cepas de *S. Minnesota* selecionadas para o estudo, foram preparados três *erlenmeyers* de 125 mL com 25 mL de caldo TSB estéril, os quais foram inoculados  $10^7$  Log UFC ( $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,20).

Em cada um dos três *erlemeyers* contendo o caldo de cultivo TSB e uma das cepas ( $10^7$  UFC/mL) foram adicionados 12 slides estéreis de  $1cm^2$  de poliuretano (HabasitCleandrive™), polipropileno (PP) (Leadmec®) e aço inoxidável (AISI 304®). Estes foram submetidos à formação de biofilmes nas seguintes condições: agitação de 100rpm em agitador orbital (Global trade®), temperatura de 37°C e um período de 24 horas.

Paralelamente, foram preparados controles negativos, compostos de três *erlenmeyers* contendo 25 mL de caldo TSB estéril sem nenhum inóculo. Em cada um deles foram adicionados seis *slides* de cada um dos materiais testados (aço inoxidável, poliuretano e polipropileno). Os controles negativos foram mantidos nas mesmas condições do grupo teste (agitação a 100rpm, 37°C por 24 horas).

Depois da produção dos biofilmes, dois *slides* de cada um dos materiais testados (poliuretano, polipropileno e aço inoxidável) de cada uma das cepas foram analisados quanto à formação de biomassa por meio de um ensaio qualitativo clássico utilizando a sua fixação pelo uso corante cristal violeta. Paralelamente, os controles negativos (sem inoculação) foram submetidos aos mesmos procedimentos.

A capacidade de produzir biofilme foi avaliada utilizando ponto de corte de 0,044, valor obtido por meio de três desvios padrões acima da média da  $DO_{600}$  dos controles negativos (Stepanovic et al., 2000). Dessa forma, foi considerada a seguinte classificação: forte ( $>0,176$ ), moderada ( $<0,176$  e  $> 0,089$ ), fraca ( $< 0,088$  e  $> 0,045$ ), inexistente ( $\leq 0,044$ ).

As análises qualitativas dos biofilmes foram realizadas conforme metodologia citada por Peeters et al. (2008), Silagyi et al. (2009) e Pui et al. (2011), com alterações. Para isso, os dois *slides* com biofilmes formados por cada uma das cepas foram transferidos para placas de 24 poços (Kasvi®), lavados três vezes com um mL de água deionizada estéril, e após, secos em estufa a 55°C por 50 minutos.

Para avaliar a biomassa foi utilizado o método clássico, que utiliza a sequência: coloração com cristal violeta 1% (LaborClin®) por cinco minutos para fixação, e após, a dissolução com álcool-acetona (80-20, etanol-acetona, v/v) (Dinamica®). Depois da fixação e lavagem, o produto resultante do cristal violeta de cada um dos *slides* foi coletado e adicionado em uma nova placa de microtitulação de 96 poços, que foi utilizada para quantificação da DO<sub>600</sub> em espectrofotômetro (DNM-9602 microplatereader Perlong®).

A avaliação quantitativa dos biofilmes foi realizada por meio da contagem de células viáveis de *S. Minnesota* nos biofilmes. Os procedimentos foram de acordo com metodologia proposta por Nguyen e Yuk (2013) com adaptações.

#### **4.4. Avaliação da ação dos sanitizantes nos biofilmes**

Foram utilizados dois tratamentos nos biofilmes formados: hipoclorito de sódio 1% (Sanikoll®) e ácido peracético 0,8% (Synth®). O tempo de contato dos biofilmes com ambos foi de 15 minutos, tentando mimetizar um período semelhante aos utilizados nas indústrias para a desinfecção.

Para esta avaliação, dois biofilmes anteriormente formados por cada uma das três cepas em cada um dos materiais (poliuretano, polipropileno e aço inoxidável) foram transferidos assepticamente para três placas de poliestireno de 24 poços (Kasvi®). Após a lavagem por três vezes com o tampão PBS (Laborclin®) para a retirada de células livres, os mesmos foram submetidos à contagem de células viáveis (Nguyen e Yuk, 2013) com adaptações.

#### **4.5. Contagem de *S. Minnesota* nos biofilmes antes e após tratamentos**

Os procedimentos utilizados foram os recomendados por Nguyen e Yuk (2013) com adaptações.

Um slide de cada material (poliuretano, polipropileno e aço inoxidável) foi transferido para placas de poliestireno de 24 poços (Kasvi®). Para remover as células planctônicas, os mesmos foram previamente submetidos a três lavagens com o tampão estéril PBS (Laborclin®). Após, foram transportados assepticamente para tubos de ensaios com 5 mL contendo NaCl 0,85% (Synth®) estéril e 25 esferas de vidro estéreis de 0,5 mm de diâmetro, sendo submetidas à agitação em vortex por 90 segundos. O homogeneizado foi submetido a

diluições decimais seriadas e quantificado utilizando a semeadura na superfície de ágar TSA (Merck®) pelo método de gota (MILLES& MISRA, 1938; MACHADO, 2007).

### **3.6. Análise dos resultados**

Os resultados qualitativos e quantitativos obtidos nas análises dos biofilmes foram tabulados e sua normalidade verificada por meio do programa estatístico GraphPad Prism, versão (GraphPad Software, Estados Unidos).

Para os dados quantitativos, os resultados foram transformados para Log10 para posterior utilização na análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis para os dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Vivian (2014), as bactérias do gênero *Salmonella* possuem a capacidade de aderir a todos os tipos de materiais e se manter em qualquer fase da cadeia de produção, uma vez que a coleta de material de todo o processo demonstrou a presença da mesma. Em nosso estudo, todas as cepas de *S. Minnesota* analisadas apresentaram capacidade de formar biofilmes (Tabela 1), sendo classificadas como forte, moderada ou fraca dependendo da cepa ou da superfície em que foi formada quando o método de avaliação foi o da quantificação da biomassa (Tabela 1).

**Tabela 1** - Classificação\* da formação de biofilme por três cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola, de acordo com cepa e superfície utilizada para a formação.

| CEPA | LOCAL DE ISOLAMENTO      | MATERIAL       | IFB*     |
|------|--------------------------|----------------|----------|
| 1    | <i>carcaça in natura</i> | aço inoxidável | forte    |
|      |                          | poliuretano    | forte    |
|      |                          | polipropileno  | forte    |
| 2    | peito salgado            | aço inoxidável | forte    |
|      |                          | poliuretano    | moderada |
|      |                          | polipropileno  | moderada |
| 3    | coração de frango        | aço inoxidável | forte    |
|      |                          | poliuretano    | moderada |
|      |                          | polipropileno  | fraca    |

IFB= classificação conforme o índice de formação de biofilmes

Assim, nossos resultados concordam em parte com Vivian (2014) e com Souza & Moraes (2015), que afirmam que a capacidade de *Salmonella* em se aderir à superfície é cepa-dependente, com variações entre sorovares ou relacionadas às temperaturas de incubação.

Pesquisas vêm discutindo a influência da superfície (Bruinsma et al., 2001; Vivian, 2014; Nguyen et al., 2014) e da cepa (Stepanovic et al. 2004) na formação de biofilmes.

Em nosso estudo, a análise da classificação da biomassa dos biofilmes formados demonstrou diferenças tanto em relação à cepa tanto quanto ao tipo de superfície (Tabela 1).

Todas as três cepas (100%) foram capazes de formar biofilmes fortes em aço inoxidável, duas (66,66%) formaram biofilmes moderados em poliuretano. Já na superfície de polipropileno, o comportamento foi diverso, sendo cada uma das cepas (33,3%) classificadas como forte, moderada ou fraca.

Nossos resultados demonstram que apesar de o tipo de superfície ter influenciado na produção de biomassa ( $p < 0,05$ ), não houve diferenças quando se utilizou como critério de avaliação ( $p > 0,05$ ) a quantificação de células viáveis (Tabela 2). Estes resultados possuem importantes implicações práticas, pois se consideramos que o tipo de superfície influencia principalmente na produção de matriz extracelular e não no número de micro-organismos, os procedimentos de limpeza das indústrias devem privilegiar o uso de agentes químicos que também possuam ação na matriz, que é o componente com maior volume (Rhoads et al., 2008; Flemming & Wingerder, 2010), e não somente na redução ou eliminação dos micro-organismos.

A constituição do biofilme é um misto de micro-organismos e matriz extracelular em proporções de 20% e 80%, respectivamente (Rhoads et al., 2008) ou até 90% de toda a biomassa (FLEMMING & WINGERDER, 2010).

**Tabela 2.** Contagens médias (Log UFC) de biofilmes produzidos na superfície de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno por três cepas de *S. Minnesota*.

| Material              | Contagens médias (Log UFC) |           |           |
|-----------------------|----------------------------|-----------|-----------|
|                       | Cepa 1                     | Cepa 2    | Cepa 3    |
| <b>Aço inoxidável</b> | 5,2 ± 0,3                  | 5,0 ± 0,4 | 5,7 ± 0,3 |
| <b>Poliuretano</b>    | 5,0 ± 0,2                  | 4,9 ± 0,4 | 5,5 ± 0,2 |
| <b>Polipropileno</b>  | 5,7 ± 0,3                  | 5,5 ± 0,2 | 5,2 ± 0,2 |

\* ( $p > 0,05$ )

Bruinsma et al. (2001) afirmam que as características físico-químicas da superfície, principalmente a hidrofobicidade, têm relação com a formação de biofilme, assim, quanto mais hidrofóbica a superfície, maior será a facilidade de o micro-organismo se aderir àquela superfície. Porém, estudo realizado por Schlisselberg & Yaron (2013) mostrou que não somente o tipo de superfície é determinante para a formação do biofilme, mas também é importante seu acabamento, uma vez que superfícies mais polidas resultaram em biofilmes com menor altura e maior facilidade de remoção por sanitizantes.

Considerando somente a probabilidade de isolamento de *Salmonella* em uma planta abatedoura, Vivian (2014) determinou que materiais como o poliestireno fossem mais contaminados, e associou este resultado ao seu *design* e hidrofobicidade.

A Tabela 3 mostra a média das contagens de *S. Minnesota* em biofilmes formados em aço inoxidável, poliuretano e polipropileno após tratamentos pelo contato por 15 minutos com os sanitizantes hipoclorito de sódio 1 % e ácido peracético 0,8%.

**Tabela 3** - Contagens médias (log UFC) de biofilmes de *S. Minnesota* em superfícies de aço inoxidável (AI), poliuretano (PU) e polipropileno (PP) antes e após 15 minutos de contato com hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%.

| Contagem <i>S. Minnesota</i> (UFC) |      |                        |                      |                         |
|------------------------------------|------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| Superfície                         | Cepa | Antes dos tratamentos  | Hipoclorito Sódio 1% | Ácido Peracético 0,8%   |
| AI                                 | 1*   | 5,09 ±0,4 <sup>a</sup> | SC                   | 3,93 ±0,3 <sup>a</sup>  |
|                                    | 2**  | 4,99 ±0,3 <sup>A</sup> | SC                   | 4,02 ±0,6 <sup>A</sup>  |
|                                    | 3*** | 4,85 ±0,3 <sup>A</sup> | SC                   | 2,83 ±0,5 <sup>A</sup>  |
| PU                                 | 1*   | 5,04 ±0,4 <sup>A</sup> | SC                   | 4,24 ±0,7 <sup>A</sup>  |
|                                    | 2**  | 4,99 ±0,4 <sup>A</sup> | SC                   | 3,54 ±0,2 <sup>B</sup>  |
|                                    | 3*** | 4,92 ±0,4 <sup>A</sup> | SC                   | 4,63 ± 0,3 <sup>A</sup> |
| PP                                 | 1*   | 5,69 ±0,3 <sup>A</sup> | SC                   | 3,81 ± 0,2 <sup>B</sup> |
|                                    | 2**  | 5,55 ±0,2 <sup>A</sup> | SC                   | 2,45 ± 0,3 <sup>B</sup> |
|                                    | 3*** | 5,36 ±0,2 <sup>A</sup> | SC                   | 3,87 ± 0,3 <sup>B</sup> |

SC: sem crescimento; Classificação dos biofilmes antes dos tratamentos: \* (moderado); \*\* (forte); \*\*\* fraco; Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

O tratamento dos biofilmes com hipoclorito de sódio 1% foi capaz de eliminar todas as células viáveis das três cepas de *S. Minnesota* nos três tipos de materiais (aço inoxidável, poliuretano e polipropileno). Já, o uso do ácido peracético 0,8% não foi capaz de reduzir significativamente as contagens em todos os tratamentos, apresentando resultados variáveis em relação ao tipo de material, cepas e classificação dos biofilmes.

Com o uso do ácido peracético 0,8%, houve redução nas contagens de *S. Minnesota* ( $p < 0,05$ ) nos biofilmes formados em polipropileno pelas três cepas, independente da classificação do biofilme. Já em poliuretano, a ação do sanitizante foi capaz de reduzir significativamente as contagens dos biofilmes de somente uma das cepas (33,33%),

classificada anteriormente como moderadamente produtora de biofilme. Não houve diferenças nas contagens após o tratamento quando a superfície testada foi o aço inoxidável, demonstrando que o uso do ácido peracético 0,8% não é capaz de prevenir a presença destas comunidades neste material.

Ziech (2015) também observou distinção na eficiência da remoção de biofilmes em relação à superfície quando comparou os materiais polipropileno e o poliuretano utilizando microscopia eletrônica de varredura. Observou que a remoção destas comunidades em polipropileno foi facilitada, e concluiu que a maior eficiência estava relacionada à sua superfície mais lisa. Este comportamento também foi observado em nosso estudo, já que foi o único em que todas as cepas apresentaram redução nas contagens uso de ácido peracético 0,8% e também com hipoclorito de sódio 1%.

Nguyen & Yuk (2014) mostrou que a superfície em que o biofilme foi formado interfere na resistência desses micro-organismos ao sanitizante quando realizou estudos com adesão de *S. Typhimurium*. Observou que a adesão ao aço inoxidável foi maior quando comparada ao acrílico.

Apesar de em alguns materiais e cepas não haver diferença entre o uso de hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%, na prática, tratamentos de biofilmes em que restam células viáveis como as observadas com o uso do ácido peracético 0,8% não são indicados. Particularmente, no caso de patógenos como *Salmonella*, as células viáveis restantes irão se tornar um ponto constante de contaminação, comprometer a qualidade microbiológica do alimento produzido, e ainda, colocar em perigo a saúde do manipulador e consumidor.

Independente da avaliação estatística, para ser considerado eficiente, um desinfetante deve ser capaz de reduzir as contagens em 4 ciclos log (MØRETRØ et al., 2009). Assim, pode-se observar que o uso do ácido peracético 0,8% não pode ser considerado como eficiente em nenhum dos materiais e cepas testadas.

Os estudos com o uso de ácido peracético na inibição de biofilmes têm mostrado resultados conflitantes.

Vivian (2014) demonstrou que o ácido peracético só se mostrou eficaz quando a concentração utilizada foi maior que aquela recomendada pelos seus fabricantes (concentração 0,5%), mostrando uma tênue linha entre a formação de biofilme e a aquisição de resistência contra o sanitizante.

Já, Machado et al. (2010) obtiveram eficácia usando ácido peracético (0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,5% e 1%), amônia quaternária (2%; 1%; 0,3%; 0,2% e 0,1%) e hipoclorito de sódio

0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1% e 2%) na inativação das cepas de *Salmonella* spp., apesar de que, quando utilizados em concentrações abaixo da indicada pelos fabricantes (2%), permitiu sobreviventes.

Jaenisch et al. (2010) analisaram o uso dos sanitizantes: ácido peracético (ácido peracético 2%, peróxido de hidrogênio 6% e ácido acético 22%), hipoclorito de sódio a 1% e 0,1% de cloro ativo (hipoclorito de sódio com 10 a 12% de cloro ativo). Todos se mostraram eficazes nos testes antibacterianos, no entanto, o uso do ácido peracético foi prejudicado na presença de matéria orgânica.

Um estudo que avaliou o tratamento de superfícies após a formação de biofilme de *Salmonella* superfície de aço inoxidável e polietileno utilizando ácido peracético (0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,5% e 1%) e hipoclorito de sódio (0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1% e 2%) se mostrou ineficaz em ambos os casos Machado (2007).

Provavelmente, a maior eficiência do uso do hipoclorito neste e em outros estudos deve-se ao fato de além de possuir ação desinfetante também atuar na matriz extracelular, já que em nosso estudo, a biomassa foi à estrutura que apresentou maior variação nos biofilmes formados nas diferentes superfícies.

Biofilmes são estruturas complexas e de difícil controle e o uso isolado de tratamento com um único agente químico específico não deve ser a única estratégia para a sua prevenção. A melhor forma de prevenir a formação de biofilmes é com uma boa higienização das instalações, que inclui limpeza e desinfecção dos equipamentos utilizados para o processamento dos alimentos (Teixeira et al., 2015), além de respeito aos períodos entre higienização e a escolha e uso corretos de agentes químicos (ZIECH et al., 2016).

## 6. CONCLUSÃO

A capacidade de *S. Minnesota* em formar biofilmes classificados quanto à biomassa em fortes, moderados ou fracos variou de acordo com a cepa e o material, com a formação de biofilmes fortes por todas as cepas quando a superfície foi o aço inoxidável.

Na avaliação quantitativa, que utiliza as contagens de micro-organismos nos biofilmes formados, não houve diferença, o que indica que para o controle destas comunidades deve-se preferencialmente, utilizar agentes químicos com ação também na matriz extracelular.

O uso do hipoclorito de sódio 1% demonstrou ação superior ao da utilização do ácido peracético 0,8% na inibição das comunidades, independente da cepa e da superfície em que foi formado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Protocolo de bem-estar para frangos de corte. Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf)>. Acesso em 22 de março de 2018.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. DE O.; ROSADO M. S. Controle da higienização na indústria de alimentos. Varela, SP: Andrade NJ, editores. *Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. 2008. P. 181-226.
- BARAH, F. Non-Antibiotic Biocides: An Updated Review. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz, Spain: Formatex Research Centre, 2013. p. 598-607.
- BASSAN, J. D. L. et al. Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. [S.l.]: **Ciência Rural**, v. 38, n7, P. 1961-1965, 2008. 38(7): 1961-1965.
- BORSOI, A. et al. Número mais provável de *Salmonella* isolada de carcaças de frangos resfriadas. [Santa Maria, RS]: **Ciência Rural**, v. 40, n 11, nov., 2010.
- BRASÃO, S. C. Biofilmes de *Salmonella* Minnesota: formação, influência da superfície, inibição por agentes químicos e importância do período entre tratamentos. Uberlândia, MG, 2017.
- BRUINSMA, G. M. et al. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. [S.l.]: **Biomaterials**, v. 22, n. 24, p. 3217-24, 2001.
- CHAVANT, P. et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. [S.l.]: **Journal of Microbiol Methods**, 2007; 68 (3): 605-12.
- CONSTERTON, J.W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. [S.l.]: **Science**. V. 284, P. 1328-1322, 1999.
- CORCORAN, M. *Salmonella enterica* - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces. National University of Ireland Galway. 2013.
- D'AOUST, J.; MAURER, J. *Salmonella* species. [S.l.]: In: **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition**. American Society of Microbiology, p. 187-236, 2007.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. [S.l.]: **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, 2002.
- ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

EDWARD, S. P.R.; BRUNER, D.W. Two new Salmonella isolated from Fowls. [S.l.]: **Journal of Hygiene**, v.38, n.6, p.716-720, 1938.

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

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. Nature reviews. [S.l.]: **Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.

JAENISCH, F. R. F.; KUSSICHI, S. S.; CODELBELLA A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. [S.l.]: **Ciência Rural**, v.40, n.2, fev, 2010.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004.

MACHADO, T. R. M. Avaliação da aderência ao aço inoxidável e ao polietileno por três sorovares de *Salmonella* e da capacidade de desinfecção dessas superfícies. Porto Alegre, RS, 2007.

MACHADO, T. R. M. et al. Avaliação da resistência de Salmonella á ação de sanitizantes ácido peracético, quaternário de amônia e hipoclorito de sódio. São Paulo: **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2010.

MØRETRO T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of applied microbiology**, 2009.

NGUYEN, H. D. N.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. Biofilm formation of Salmonella Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. [S.l.]:LWT - **Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 383–388, 2014.

NGUYEN, H. D. N.; YUK, H.-G. Changes in resistance of Salmonella Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. [S.l.]: **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 236–240, 2013.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of Bacillus cereus by sanitizer and detergent. [S.l.]: **Int J Food Microbiol**. 2002.

PERETTI, C. Trabalho de conclusão de curso em agroindústria da região oeste catarinense na área de abate e processamento de aves. Curitiba, SC, 2017.

PERIN, A. P. Ocorrência e quantificação de salmonella sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no Estado do Paraná e perfil de suscetibilidade e antimicrobianos. Palotina, PR, 2017.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilm in wound management strategies. [S.l.]: **Journal of Wound Care**. 2008.

PICKLER, L. et al. Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com Salmonella Minnesota. [S.l.]: **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1203, 2014.

PICKLER, L. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de Frangos de corte desafiados com Salmonella Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. [S.l.]: **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(1): 27-36, 2012.

RODRIGUES, L. B.; RUSCHEL, L.; RIZZO, N. N. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por Salmonella Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. [S.l.]: **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. December 2008, p. 225–230, 2009.

ROSADO, M. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2009.

SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on Salmonella Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. [S.l.]: **Food microbiology**, v. 35, n. 1, p. 65–72, 2013.

SOUZA, S. N.; MORAES, H. L. M. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes por cepas de *Salmonella* Enteritidis e *S* Heidelberg de origem aviária em placas de poliestireno submetidas a diferentes temperaturas de incubação. Porto Alegre, RS, 2015.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. [S.l.]: **Letters in Applied Microbiology**. 2004.

STEPANOVIC S, et al. A modified micro titer-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. [S.l.]: **Journal of Microbiology Methods**. 2000.

TEXEIRA, P. et al. O impacto de biofilme microbiano na higiene e segurança alimentar. **Boletim de tecnologia**. Portugal: Braga, 2015.

VESTBY, L. K. et al. Biofilm forming abilities of Salmonella are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. [S.l.]: **BMC veterinary research**, v. 5, p. 20, 2009.

VIANA, E. de S. Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias picrotróficas isoladas de leite. Viçosa, MG, 2006.

VIVIA, M. R. C. Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por salmonella spp. isolada de abatedouro avícola. Botucatu, SP, 2014.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, p. 433– 441, 2015.

WANG, Hua et al. Complete genome sequence of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Minnesota strain. [S.l.]: **Genome biology and evolution**, v. 9, n. 10, p. 2727-2731, 2017.

WOLF, C. Estudo de caso da higiene (limpeza e desinfecção) em matadouro-frigorífico de bovinos, suínos e ovinos. Porto Alegre, RS, 2017.

ZIECH, R. E. Caracterização de *salmonella* sp isolada de indústria de aves baseada na formação de biofilme, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos. Palotina, PR, 2015.