

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA
EM AÇO E VIDRO**

MAX SEIJI TSUNADA

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2013**

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA EM AÇO E VIDRO

MAX SEIJI TSUNADA

Orientadora Prof^a. Dr^a: Kelly Mari Pires de Oliveira

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Curso de Graduação em Ciências biológicas, para obtenção do título de Biólogo.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL

2013

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA
EM AÇO E VIDRO**

Por

Max Seiji Tsunada

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Biólogo.

Aprovado em: / /

Prof^a. Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira

Orientadora – UFGD/FCBA

Prof^a. Dr^a. Maricy Raquel Lindenbah Bonfa

Membro da Banca – UFGD/FCBA

Me^a. Fabiana Gomes da Silva Dantas

Membro da Banca – UFGD/FCBA

Dedico

A minha família, em especial meus pais Luciana e Alberto, por toda compreensão, apoio e contribuição para o início e conclusão da minha graduação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A professora Dr^a Kelly Mari Pires de Oliveira pela orientação, dedicação e confiança.

Aos componentes da comissão examinadora: Dr^a Maricy Raquel Lindenbah Bonfa e Me.^a Fabiana Gomes da Silva Dantas, pela participação na avaliação e pela contribuição no aprimoramento deste trabalho.

A Universidade Federal da Grande Dourados, em especial a Faculdade de Ciências Biológicas por fornecer condições para a realização desta graduação.

A todos os professores que contribuíram em minha formação acadêmica.

Ao grupo de pesquisa em Microbiologia Aplicada, pela contribuição no que diz respeito ao desenvolvimento do perfil laboratorial e na condução do experimento.

A minha família e amigos, pelo amparo, parceria e por sempre acreditarem no meu potencial.

E a todos que aqueles que colaboraram para a conclusão deste projeto.

RESUMO

A formação de biofilme microbiano sobre superfícies de manipulação de alimentos é encarada como grande desafio pela indústria. Quando aderidos a esses substratos, os micro-organismos possuem alto potencial contaminante o que acarreta em riscos à saúde pública e redução da qualidade dos alimentos. O aço e vidro, materiais amplamente empregados em superfícies de processamento de alimentos, são suscetíveis de serem colonizados por micro-organismos e propiciar contaminação cruzada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme por *Salmonella* spp sobre aço e vidro e discutir a aplicabilidade de duas metodologias amplamente empregadas, adesão em cupons de aço e adesão em tubos de ensaio (vidro), seguido da quantificação da densidade óptica do biofilme após tratamento com cristal violeta. Quarenta e nove isolados foram submetidos a quantificação de biofilme sobre aço através da técnica de adesão em chip, em seguida, o biofilme formado sobre os cupons foi mensurado pela metodologia de contagem padrão em placa. Para a superfície vidro, a adesão foi avaliada pelos testes semi-quantitativo e quantitativo. Os resultados apontam à alta porcentagem de amostras com capacidade de formação de biofilme sobre aço e vidro, 95,9% e 81,6%, respectivamente, com maior prevalência de adesão em aço ($P < 0,005$). O teste semi-quantitativo e quantitativo de formação de biofilme em vidro apresentaram alto índice de correlação (Teste de Spearman: 87,17%), apesar disso é indicado que os testes sejam aplicados juntos para melhor avaliação do perfil de produção de biofilme dos isolados. Os isolados de *Salmonella* spp. apresentaram alta capacidade de formação de biofilme, sendo o material aço mais favorável a esse processo. O teste de contagem padrão em placa para aço e teste quantitativo em vidro podem ser considerados mais eficazes devido a menor influência do observador na leitura dos resultados.

Palavras-chave: Doença Transmitida por Alimentos; Indústria Alimentícia; Superfícies de processamento.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Perfil de formação de biofilme em aço e vidro dos isolados de *Salmonella* spp.18
- Figura 2:** Variância de UFC em cada classe de produção de biofilme por *Salmonella* spp. sobre aço20
- Figura 3:** Variância da absorbância em cada classe de produção de biofilme por *Salmonella* spp. sobre vidro20
- Figura 2:** Formação de biofilme por *Salmonella* spp. em vidro. Os isolados foram classificados em (esquerda pra direita): Forte (+++), Médio (++), Fraco (+) e Não Formador, respectivamente. De acordo com Raza et al (2010)27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de isolados de <i>Salmonella</i> spp produtores de biofilme em aço e vidro.....	18
--	----

Sumário

Sumário.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	9
REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA's).....	11
SALMONELLA	12
BIOFILME E INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	13
MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME.....	14
METODOLOGIA.....	15
3.1 AMOSTRAS DE SALMONELLA spp.....	15
3.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA spp. EM AÇO INOX	15
3.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA spp. EM VIDRO.....	16
3.3.1 TESTE SEMI-QUANTITATIVO EM VIDRO DE AVALIAÇÃO DO BIOFILME	16
3.3.2 TESTE QUANTITATIVO EM VIDRO DE AVALIAÇÃO DO BIOFILME COM CRYSTAL VIOLETA.....	16
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23
ANEXO I.....	27
.....	27

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças transmitidas por alimentos (DTA's), bactérias do gênero *Salmonella* são uma das principais causadoras de infecção em seres humanos em todo o mundo (WHO, 2008). Segundo CDC (2002), esses micro-organismos estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas principalmente no trato gastrointestinal de vários animais, como no homem e outros mamíferos, além de répteis, aves e peixes.

Embora vegetais estejam vinculados a transmissão deste patógeno, a salmonelose é geralmente causada pela ingestão de alimentos de origem animal contaminados por salmonela, como carne bovina, aves, ovos crus, leite e seus derivados. Os sintomas clínicos incluem disenteria, dores abdominais, febre tifóide, gastroenterites e, em casos mais extremos, o óbito (SHINOHARA et al., 2008).

A cadeia de produção de alimentos apresenta ambiente propício ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e, desta forma, esta exposta a contaminações por *Salmonella* spp.. Trachoo (2003) relata a capacidade que essas bactérias possuem em formar biofilme e, conseqüentemente, contaminar alimentos em diferentes superfícies abióticas como o plástico, vidro e aço inoxidável.

A formação de biofilme microbiano sobre superfícies de manipulação de alimentos é encarada como grande desafio pela indústria. Quando aderidos a esses substratos, os micro-organismos possuem alto potencial contaminante o que acarreta em riscos à saúde pública e redução da qualidade dos alimentos (FLACH et al., 2005).

Masaaki (2006) afirma que a presença de biofilmes em materiais da linha de produção industrial, caso não controlado, pode gerar prejuízos que vão além da contaminação dos alimentos, incluindo danos em equipamentos através da biocorrosão, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito e resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão.

Considerando a tendência contemporânea de hábitos alimentares ligadas ao consumo de alimentos altamente processados, a contínua expansão das indústrias no Brasil, e a existência de grupos favoráveis é importante estudos que visem avaliar e melhor compreender os mecanismos biológicos em que bactérias patogênicas conseguem se desenvolver e disseminarem-se sobre alimentos e materiais utilizados no manuseio destes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme por *Salmonella* spp sobre aço e vidro, e discutir a aplicabilidade de duas metodologias amplamente empregadas, adesão em cupons de aço e adesão em tubos de ensaio (vidro), seguido da quantificação da densidade óptica do biofilme após tratamento com cristal violeta.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA's)

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem aumentando significativamente em nível mundial. Vários fatores contribuem para a emergência dessas enfermidades, entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante a qualidade dos alimentos ofertados a população (LEITE e WAISSMAN, 2006).

Esta multiplicidade de fatores junto a diversidade de agentes causadores resultam no aumento significativa da incidência de DTA's, infecções ou intoxicações que podem se apresentar de forma crônica ou aguda, com características de surto ou isoladas, com distribuição localizada ou disseminada e formas clínicas diversas (BRASIL, 2010).

Oliveira et al. (2010) relata que existem aproximadamente 250 tipos de doenças alimentares e, dentre elas, muitas são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas.

No Brasil, o perfil epidemiológico das DTA's ainda é pouco conhecido. Somente alguns estados ou municípios dispõem de estatísticas e dados publicados sobre os principais agentes etiológicos, alimentos frequentemente contaminados, população de maior risco e fatores contribuintes. De acordo com os escassos dados disponíveis referentes a surtos alimentares, os agentes causadores mais frequentes são de origem bacteriana dentre eles, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2010).

Em face dos limitados estudos que se tem dos agentes etiológicos, a forma como esses contaminam os alimentos e as quantidades necessárias a serem ingeridas na alimentação para que possa se tornar um risco, vários países da America Latina estão implantando sistemas nacionais de vigilância epidemiológica das DTA. Essas medidas vêm sendo estimuladas por recomendações e acordos internacionais, dos quais se destacam os subscritos pelo Brasil na VII Reunião Interamericana de Saúde Ambiental de Nível Ministerial (RIMSA) e na XXXV Reunião do Conselho Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) (BRASIL, 2010).

SALMONELLA

Pertencente a família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* spp. compreende bastonetes Gram negativos e compõe um dos grupos mais complexo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2005) mais de 2500 sorotipos dessa bactéria já foram identificados. São anaeróbias facultativas, usualmente móveis com flagelos peritríquios, apresentam como condições ótimas de crescimento temperatura de 37°C, pH 7,0 e atividade da água a 0,94 (TORTORA et al., 2012).

Salmonela está amplamente distribuída na natureza, habitando em especial o trato intestinal dos seres humanos e demais animais. O principal portador e reservatório natural são as aves, as quais não desenvolvem nenhum sintoma. Além disso, suínos, bovinos equinos, animais silvestres e domésticos também podem ser vetores deste patógeno, o que faz da salmonela uma zoonose de grande distribuição e fácil dispersão (GERMANO e GERMANO, 2003).

No âmbito da saúde pública, salmonela destaca-se por sua grande frequência em surtos alimentares humanos sendo, portanto, uma dos principais micro-organismos patogênicos causador de DTA (CDC, 2008). Os sintomas clínicos incluem disenteria, dores abdominais, febre tifóide, gastroenterites e, em casos mais extremos, o óbito (SHINOHARA et al., 2008).

As intoxicações por *Salmonella* spp. em humanos geralmente estão relacionados ao consumo de alimentos de origem animal, especialmente carne de frango ou ovos. Nos últimos anos, porém, tem aumentado o relato de casos associados a ingestão de carne suína, bovina, leite, pescados, produtos de confeitaria recheados com cremes, gelatina desidratada, cacau, chocolate, côco, mariscos e molhos para saladas não industrializados. Além disso, vegetais contaminados também podem ser veículos de transmissão da doença (CASTAGNA et al, 2004; FDA/CFSAN, 2007).

No Brasil foram relatados surtos de salmonelose entre os anos de 1994 e 1995 em vários estados, com o número de pessoas afetadas variando de duas a 300 por surto (GELLI, 1995). Segundo Tavechio et al. (2002), de um total de 4.581 isolamentos de *Salmonella* sp. realizados pelo Instituto Adolfo Lutz – SP - Brasil, entre 1996 e 2000, a *Salmonella enteritidis* foi o sorovar predominante, correspondendo a 32,7% dos isolados.

BIOFILME E INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Na indústria de alimentos, falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos a superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Os micro-organismos podem aderir-se às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (OLIVEIRA et al., 2006). Quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos, o biofilme está estabelecido (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

A matriz extracelular secretada durante o processo de construção do biofilme apresenta perfil complexo, constituído por proteínas, DNA, RNA, lipídeos e íons. Além disso, os exopolissacarídeos são fundamentais no estabelecimento e fixação; já os apêndices extracelulares filamentosos, como flagelos e fimbrias, desempenham papel complementar no processo de adesão (HARBRON e KENT, 1988; BRANDA et al., 2005).

A organização e características físico-químicas da matriz extracelular e células bacterianas conferem ao biofilme um perfil fenotípico de resistência a agentes antimicrobianos e sanitizantes, por esse motivo, sua eliminação das instalações de processamento de alimentos tornou-se um grande desafio (PAPAVASILEIOU et al., 2010; JOSPEPH et al., 2001). Kasnowski (2010) relata também a proteção adquirida contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação.

Jass e Walker (2000) afirma que a presença de biofilmes em materiais da linha de produção industrial caso não controlado pode gerar prejuízos que vão além da contaminação dos alimentos, incluindo danos em equipamentos através da biocorrosão, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito e resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão.

No caso da salmonela, a cadeia de produção de alimentos que inclui a indústria primária, serviços e instituições alimentícios e ambiente doméstico são, muitas vezes, os locais propícios para seu desenvolvimento. Diversos autores afirmam que este micro-organismo é capaz de formar biofilme e, conseqüentemente, contaminar alimentos em diferentes superfícies abióticas como o plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável (JOSEPH et al., 2001; SOLANO et al., 2002; PROUTY e GUNN, 2003; ARNOLD e YATES, 2009; HURREL et al., 2009; MORETRO et al., 2009).

O aço inoxidável é frequentemente utilizado em diferentes equipamentos na indústria de processamento de alimentos, estando presente em superfícies de trabalho e

pias devido sua força mecânica, resistência a corrosão, longevidade e facilidade de fabricação (ARAÚJO, 2012). Já o emprego do vidro em potes e tábuas vem crescendo no ambiente doméstico, além disso, na indústria esse material também é utilizado em revestimento de reservatórios.

MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

Existem diversas metodologias descritas para avaliar a formação de biofilme sobre diferentes substratos (ESTIVILL, et al., 2011; JOSEPH et al., 2000; MANIJEH et al., 2008; BERBOM et al., 2009; SOLOMON et al., 2005; JUN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009; SOLANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007). Uma técnica muito aplicada é a contagem padrão em placa provenientes do biofilme formado sobre cupons do material de interesse (BORBOM et al., 2008; MANIJEH et al., 2008) Apesar desta técnica ser amplamente difundida, é altamente dispendiosa.

Para avaliação da adesão de bactérias em vidro alguns autores preconizam o teste semi-quantitativo em tubos de ensaio (RAZA et al., 2011; SOLANO et al., 1998; GAMAZO, et al., 1997). Esta técnica requer menos recursos quando comparado à contagem de unidades formadoras de colônia, porém não é tão eficaz visto sua subjetividade na avaliação do biofilme, que é realizado pelo olhar do pesquisador.

Para complementar esta metodologia, o teste proposto por Proulty et al (2003) pode ser utilizado para quantificar o corante cristal violeta absorvido pelas células microbianas do biofilme. Desta forma a absorbância é diretamente proporcional à quantidade de biofilme formado sobre o vidro.

METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS DE *SALMONELLA* spp.

Foram avaliados 49 isolados de *Salmonella* spp provenientes de amostras ambientais, processos clínicos e alimentos do Mato Grosso do Sul, Brasil. Os isolados foram identificados e sorotipados pelo instituto Adolfo Lutz. As amostras foram armazenadas a -85°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com glicerol. Os testes ocorreram no laboratório de Microbiologia Aplicada lotado na Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados.

3.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *SALMONELLA* spp. EM AÇO INOX

O teste de produção de biofilme em aço foi baseado na metodologia proposta por Manijeh et al. (2008) e Bernbom et al. (2008) com modificações.

Os isolados de *Salmonella* spp. armazenados à -85°C foram transferidos para água peptonada e incubadas durante 5h à 37°C, posteriormente as amostras foram plaqueadas em estrias descontínuas no Ágar Hainback® e incubadas *overnight* na mesma temperatura. Três colônias foram transferidas para 10 mL de caldo Trypticase Soy Broth (caldo TSB) e incubados à 37°C durante 3h.

Os chips de aço inoxidável (tipo 304, acabamento nº4) foram confeccionados com diâmetro de 1cm². As superfícies foram limpas por escovação utilizando água e detergente neutro. Para remoção de gordura, os chips foram rinsados com água destilada e imersas em acetona, durante 30 minutos. Em seguida, foram secos e autoclavados.

Com auxílio de uma pinça estéril cada cupom foi colocado no fundo de uma placa de 12 poços. O inóculo foi ajustado a uma OD₅₉₀ de 0,125 (aproximadamente 10⁸ UFC). Aliquotas 230 µL de inóculo mais 3mL de TSB foram distribuídas em triplicatas nas cavidades da placa de 12 poços junto ao chip, e novamente incubado à 37°C por 24 horas.

Os cupons foram lavados com 3 mL de solução salina para remoção das células planctônicas, em seguida, cada cupom foi transferido para um tubo Falcon® contendo 10 mL de solução salina e homogeneizado em agitador de tubos Vortex durante 10 minutos. Das suspensões homogeneizadas foram retiradas alíquotas de 1 ml para o preparo das diluições seriadas (10⁻¹ à 10⁻⁸) em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina.

Para avaliar a adesão das células vegetativas nos cupons foi utilizado o método de Contagem Padrão em Placa (CPP). Com auxílio da alça de Drigauski, 200µL de inóculo provenientes de cada diuição foram plaqueados sobre Ágar TSA em duplicata. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 24 horas e após a contagem das colônias foi determinado o número de UFC/cm².

3.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *SALMONELLA* spp. EM VIDRO

3.3.1 TESTE SEMI-QUANTITATIVO EM VIDRO DE AVALIAÇÃO DO BIOFILME

Para o teste de formação de biofilme em vidro foi seguido a metodologia proposta por Raza et al (2011) e Solano et al (1998). Os isolados de *Salmonella* spp. armazenados à -85°C foram transferidos para água peptonada e incubadas durante 5h à 37°C, posteriormente as amostras foram plaqueadas em estrias descontínuas no Ágar Hamback e incubadas overnight na mesma temperatura. Três colônias foram transferidas para 50mL de caldo Trypticase Soy Broth (caldo TSB) e incubados à 37°C em agitador orbital (150rpm) durante 3h. até que os micro-organismos alcançaram a fase logarítmica (Densidade óptica 590nm [OD₅₉₀], 0.4). Após centrifugação, as bactérias foram ressuspensas no caldo teste de adesão média (caldo ATM).

Raza et al (2010) propõe o caldo ATM suplementado contendo 60 mM NaCl, 20 mM KCl, 110 mM glicose, 30 mM Na₂HCO₃, 20 mM NH₄Cl, 40 mM K₂HPO₄, 50 mM (NH₄)H₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 980 µM MgCl₂, 86µM FeCl₃, e 40 mM Na₂SO₄.

A suspensão bacteriana foi então ajustada para OD₅₉₀ de 0,125 (Aproximadamente 10⁸ UFC/ml). Quatro mililitros da suspensão foram acondicionados em tubos de vidro estéreis e livre de óleo durante 24h à temperatura de 37°C, agitação orbital a 170rpm e em triplicata.

Para a realização da leitura do teste semi-quantitativo foram desenvolvidas quatro categorias de classificação dos isolados, variando desde o não formador (-) até o máximo formador de biofilme (+++) (Anexo 1).

3.3.2 TESTE QUANTITATIVO EM VIDRO DE AVALIAÇÃO DO BIOFILME COM CRYSTAL VIOLETA

Para a quantificação do biofilme foi seguida a metodologia proposta por Prouty et al (2003). As células planctônicas da fase líquida foram aspiradas, e o anel de

biofilme foi lavado com pulverização contínua de tampão 1 x Phosphate Buffered Saline (PBS; p.H: 6.8) e incubado a temperatura ambiente durante 1h. para fixação das células. O corante cristal violeta (em 1% de isopropanol–metanol -1 x PBS; 1:1:18) foi vertido em cada tubo teste, que ficou incubado durante 15 minutos à temperatura ambiente. Novamente o anel de biofilme foi lavado cuidadosamente com 1x PBS (p.H:6.8) até que o buffer correu claro no tubo de vidro. Em seguida, o biofilme foi imerso em solução 33% de ácido acético para a extração das células coradas do biofilme. A quantificação do corante retido pelas células foi medida a 570 nm.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Analises de variância, ANOVA e Kruskal-Wallis, foram utilizadas para determinar a diferença na capacidade de formação de biofilme em aço e vidro entre os quatro grupos (forte, médio, fraco e não formador de biofilme). O teste Tukey e Duns foram aplicados para comparar o perfil de adesão entre cada duas classes de produção, a diferença média foi considerada significativa com $p < 0,05$. O teste de contingência Qui-Quadrado foi utilizado para determinar a diferença de adesão por *Salmonella* spp. entre as duas superfícies avaliadas ($p < 0,005$). Os resultados dos testes semi-quantitativo e quantitativo de adesão em vidro foram submetidos a teste de correlação de Spermán. O programa estatístico utilizado foi o software **GraphPad Prism®**.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 e Tabela 1 apresentam a quantidade e porcentagem, respectivamente, de isolados por classe de formação de biofilme, que variou desde o não produtor, incluindo os fracos, médios e fortes formadores.

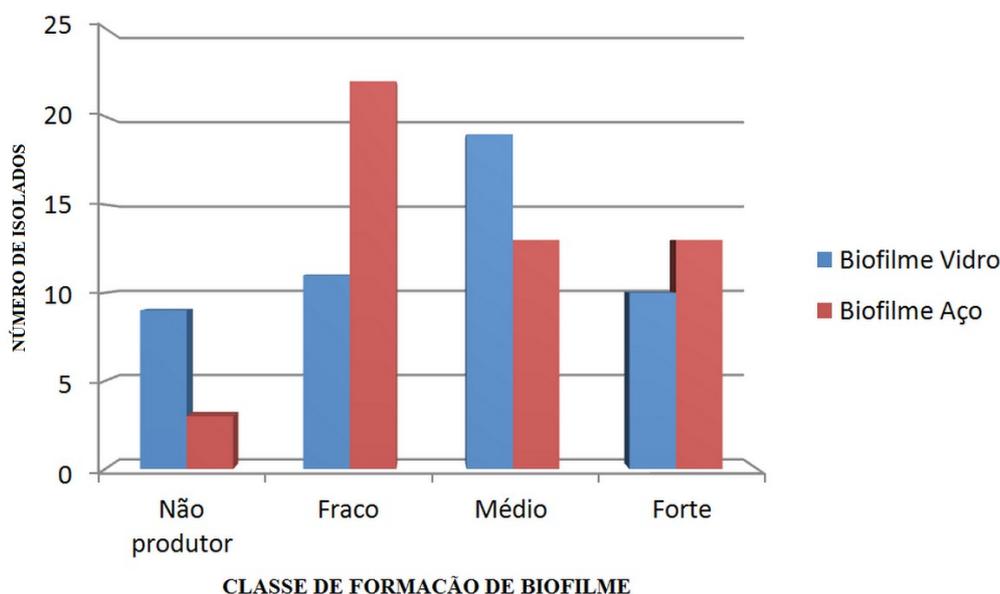


Figura 1: Perfil de formação de biofilme em aço e vidro dos isolados de *Salmonella* spp.

Tabela 1: Porcentagem de isolados de *Salmonella* spp. produtores de biofilme em aço e vidro

Material	Total de Produtores	Não Produtor ⁰	Fraco ¹	Médio ²	Forte ³
Aço	47 (95,9%)	2 (4,1%)	21 (42,9%)	13 (26,5%)	13 (26,5%)*
Vidro	40 (81,6%)	9 (18,4%) 0x2* 0x3*	11 (22,4%) 1x3*	19 (38,8%) 2x0*	10 (20,4%) 3x0* 3x1*

= $p < 0,001$; Índices 0,1,2 e 3 foram utilizados no teste de Tukey para identificar as classes não produtor, fraco, médio, e forte respectivamente. No caso 0x2: houve diferença significativa ($P < 0,001$) entre não produtor e Médio, e assim sucessivamente.

Na superfície aço, apenas 4,1% das amostras não apresentaram capacidade de adesão. Do total de isolados, o perfil mais frequente foi o de fraco produtor com 42,9%, ou seja, 21 amostras. Na superfície vidro, houve maior quantidade de isolados que não obtiveram adesão, 18,4%, além disso o perfil mais frequente foi o de médio formador de biofilme com 38,8%.

A literatura apresenta resultados distintos quanto à capacidade de formação de biofilme por *Salmonella* nas superfícies testadas. Raza et al (2010) estudando a capacidade de adesão de 30 isolados em vidro encontrou a seguinte proporção: 23,3% não foram capazes de produzir biofilme (12/30), 20% foram fracos produtores de biofilme (6/30), 16,7% médio (5/30) e 14% foram fortes. Já Solano et al (2002) observou que das amostras positivas para a produção de biofilme em vidro 50% eram fortes produtoras e 25,6% médio, somente.

Para a superfície aço, a divergência de proporções de adesão relatadas na literatura também se manteve. Oliveira et al. (2011) avaliaram a capacidade de *Salmonella* spp nas mesmas condições metodológicas porém à temperatura de 35°C, relatou que 39,7% dos isolados não produziram biofilme, 55,2% foram fracos, 5,2% moderado e 60,3% fortes.

Estes dados pouco uniformes podem estar relacionados tanto à variação da metodologia empregada quanto aos sorotipos de *Salmonella* analisadas. Solano et al (1998) utilizou para teste de adesão em vidro isolados de *Salmonella enteritidis* em meio ATM contendo somente 60 mM NaCl, 30 mM NaHCO₃, 20 mM KCl, and 111 mM glucose (pH 8.4). Raza et al (2011) suplementou o meio ATM e procedeu sua análise com isolados de *Salmonella typhi*. Já Oliveira et al (2011) empregou em seu trabalho temperatura distinta (35°C), além de realizar a quantificação do biofilme formado sobre os chips de aço através da absorbância e não por contagem de colônia como realizado neste trabalho. Com isso podemos indicar que além de características da superfície celular da bactéria envolvida e o tipo de substrato, outros fatores interferem no processo de adesão como a temperatura e composição de nutrientes do meio.

Levando em consideração os materiais aço e vidro, os quarenta e nove isolados de *Salmonella* spp. analisados apresentaram perfis de adesão distintos, diagnosticado pelo teste de Qui-Quadrado (Chi-Square: 9,096 e $p < 0,05$). As figuras 2 e 3 apresentam a distribuição dos isolados nas classes de formação de biofilme sobre aço e vidro, respectivamente.

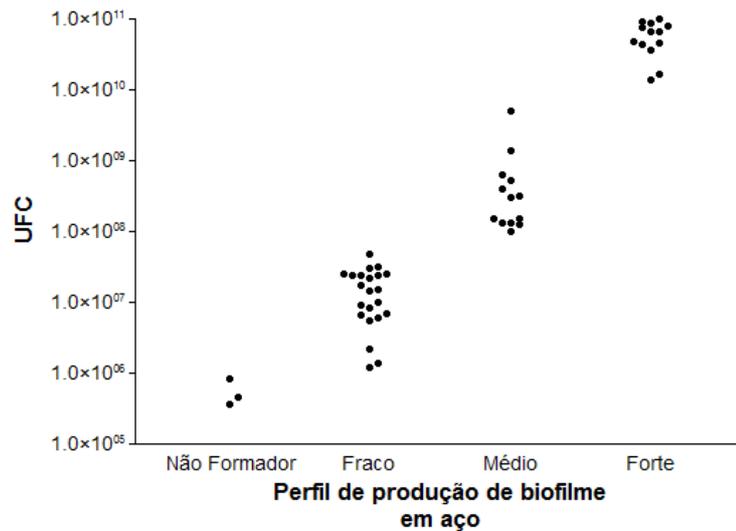


Fig. 2: Variância de UFC em cada classe de produção de biofilme por *Salmonella* spp. sobre aço

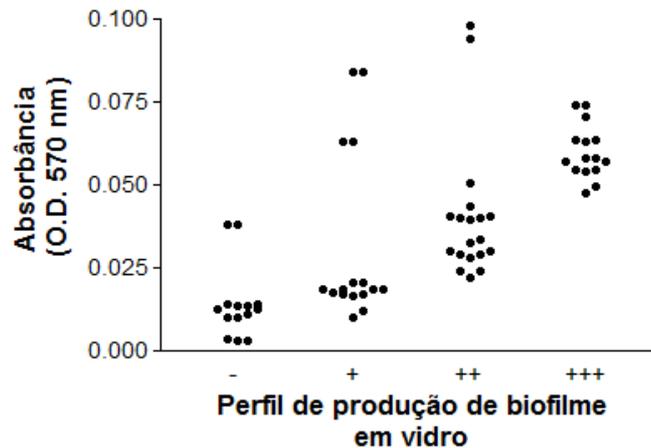


Fig. 3: Variância da absorbância em cada classe de produção de biofilme por *Salmonella* spp. sobre vidro proposto por RAZA et al. (2010)

As propriedades físico-químicas e termodinâmicas do substrato, incluindo características de cargas elétricas e hidrofobicidade interferem diretamente no processo de adsorção bacteriana (VADILLO-RODRIGUEZ e LOGAN, 2006). Na indústria de alimentos, as superfícies de processamento adquirem carga elétrica superficial em meio aquoso devido à ionização dos grupos químicos constituintes ou por íons agregados a interface. (Julien, 2002).

Segundo Flint (2002) e Li e Logan (2004) o aço inoxidável apresenta uma mistura de substâncias químicas, como óxidos de ferro, cromo e molibdênio, que provocam modificações nas interações eletrostáticas entre a superfície sólida e as células microbianas. Em ambiente aquoso, estes grupos químicos liberam íons

carregados positivamente que reduzem as interações eletrostáticas repulsivas entre a célula microbiana e a superfície sólida, carregadas negativamente, conduzindo a um aumento na adesão bacteriana em um líquido com baixa força iônica.

O vidro apresenta caráter mais hidrofílico quando comparado ao aço. A literatura aborda vários estudos relacionando o grau de hidrofobicidade como fator determinante no processo de adesão microbiana (TEXEIRA e OLIVEIRA, 1999; SHENG et al., 2008; LEE et al., 2009). Em geral há o favorecimento do processo de adesão em superfícies mais hidrofóbicas, o que foi compatível com a porcentagem total de isolados que apresentaram a capacidade de formar biofilme sobre aço (95,9%) e vidro (81,6%).

Para análise de adesão por *Salmonella* sobre aço, cada amostra foi classificada levando em consideração a quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após a realização da metodologia proposta por Manijeh et al. (2008) e Bernbom et al. (2008) e adaptada. Conforme a Fig. 2 proveniente do teste ANOVA (F: 57,97, R:0,78), propusemos aos grupos “não formador”, “fraco”, “médio”, e “forte” produtor de biofilme, a quantidade de UFC: menor que 10^6 ; entre 10^6 à 10^7 ; entre 10^8 à 10^9 ; e acima de 10^9 , respectivamente.

Na fig. 3 proveniente do Teste Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis statistic: 35,69), os isolados de *Salmonella* foram agrupados de acordo com a leitura semi-quantitativa em vidro (Anexo 1) e suas respectivas absorvâncias provenientes do teste quantitativo. Para confirmação da correlação entre estes testes, seus resultados foram submetidos ao teste de Spearman, o qual apresentou o índice de 87,17%, ou seja, os testes estão fortemente relacionados. Apesar disso, é muito importante a realização de ambos para a confirmação da capacidade de formação de biofilme de cada isolado, pois o teste semi-quantitativo em vidro é passível de erros inerente ao observador, que é amenizado quando a densidade óptica é mensurada em conjunto.

Analisando a influência da fonte de isolamento sobre a capacidade de formação de biofilme, não foi detectada diferença significativa nos isolados de *Salmonella* infantis isolados de processos clínicos, ambientais e de alimentos ($p>0,05$). Este dado corrobora com a pesquisa de Solomon et al.(2005) que avaliaram *Salmonella* proveniente de casos clínicos, carne-relacionados e produtos lácteos e também não encontrou diferenças estatísticas entre esses grupos na capacidade de adesão.

CONCLUSÃO

Os isolados de *Salmonella* spp apresentaram forte formação de biofilme sobre as superfícies de aço e vidro. A capacidade de adesão de um mesmo isolado de *Salmonella* sp. pode variar de acordo com a superfície estudada, sendo o aço inox o material mais favorável a este processo. O teste semi-quantitativo e quantitativo de formação de biofilme ao vidro são metodologias que devem ser utilizadas em conjunto para melhor avaliação da capacidade de formação de biofilme sobre esse substrato. A fonte de isolamento dos micro-organismos não está correlacionada ao processo de adesão.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. A. A.; ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F. RAMOS, A. M.; SILVA, C. A.S. Aspectos coloidais de adesão de micro-organismos. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 9, 1940-1948, 2010
- ARNOLD, J.W., YATES, I.E. Interventions for control of Salmonella: clearance of 335 microbial growth from rubber picker fingers. *Poultry Science*, 88(6):1292-8, 2009
- BRANDA, S. S. S.; VIK, L. FRIEDMAN R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13:20–26, 2005
- BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Manual integrado de vigilancia, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica. – Brasília : Editora do Ministerio da Saude, 2010
- CASTAGNA, S.M.F. et al. Presença de Salmonella sp. no trato intestinal e em tonsilas/ linfonodos submandibulares de suínos ao abate. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 56, n. 3, p. 300-306, 2004
- CDC. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport United States, Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 51, p. 545-8, 2002
- CDC. (2008) Division of foodborne, bacterial and mycotic diseases:salmonellosis. Available at: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html. Accessed Apr. 15, 2013
- ESTIVILL, D.; ARIAS, A. TORRES-LANA, A. CARRILLO-MUÑOZ, A. J. ARÉVALO, M. P. Biofilm formation by Five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods.* (86) p. 238-242, 2011
- FDA/CFSAN - United States Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook “Bad Bug Book”. Maryland: FDA, 2007
- FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em materia-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae.* 33(3), 291-296, 2005
- FLINTH, S.H.; BROOKS, J.D.; BREMER, P.J. Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J Food Eng* 43(4):235–42, 2000
- GAMAZO C.; SOLANO C.; DIAZ R.; SESMA B.; DORRONSORO I.; ALVAREZ M. Procedimiento para la diferenciación *in vitro* de las cepas virulentas de *S. enteritidis*. Spanish Patent 9700408, 1997
- GELLI, S. D. Surtos humanos por Salmonela em alimentos. *Aves e Ovos.* jun, 1995

- GERMANO, P. M. L. & GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2003.
- HARBRON, R. S.; KENT, C. A. Aspects of cell adhesion. In: L. F. Melo, T. R. Bott, & C. A. Bernardo (Eds.), *NATO ASI series*, v.145, p. 125–140, 1988
- HURREL, E.; KUCEROVA, E.; LOUGHLIN, M., CAUBILLA- BRARRON, J.; FORSYTHE, S.J. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Food Microbiology*, 136:227-231, 2009
- JASS, J.; WALKER, J.T. Biofilms and biofouling. Industrial biofouling - detection, prevention and control. J. T. Walker, S. Surman and J. Jass. New York, *John Wiley & Sons*: 1-12, 2000
- JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64:367-372, 2001
- JULLIEN, C.; BÉNEZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *J. Food. Engin.*, 56, 77, 2002
- KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T. FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária*. FAMED/FAEF e Editora FAEF. Ano VIII. n.15, 2010
- LEITE, L.H.M.; WAISSMAN, W. Foodborne illness in the elderly: risk and prevention. *Revista Ciências Médicas*. Campinas, 15(6): 525-530, nov./dez., 2006
- LEE, J.; MAEDA, T.; HONG, S.H. e WOOD, T.K. Reconfiguring the quorum-sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and Nacylhomoserine lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.75, No.6, p. 1703-1716, 2009
- LI, B.; LOGAN, B. E. Colloids and Surfaces B. *Biointerfaces* 36.81–90, 2004
- MASAAKI, M. Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 101, n. 1, 1–8. DOI: 10.1263/jbb.101.1, 2006
- MANIJEH, M.; MOHAMED, J.; ROHA, K. K. Biofilm formation by *Salmonella enteritidis* on food contact surfaces. *Journal of Biological Sciences*. 8(2): 502-505, 2008
- MORETRO, T.; VESTBY, L.K.; NESSE, L.L.; HANNEVIK, S., KOTLARZ, K.; LANSRUD, S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106:1005-12, 2009

PAPAVASILEIOU, K.; PAPAVASILEIOU, E.; TSELENI-KOTSOVILI, A.; BERSIMIS, S.; NICOLAOU, C.; IOANNIDIS, A.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica* strains isolated from children with gastroenteritis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29, 1401-5, 2010

PROUTY, A.M.; GUNN, J.S. Comparative analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium biofilm formation in gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 70(5):2640-2649, 2003

OLIVEIRA, A. A. A.; PAULA, C. M. D., CAPALONGA R.; R.; CARDOSO M. R. I.; TONDOS, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *Rev HCPA*. 30(3):279-285, 2010

OLIVEIRA, D. C. V. Produção de biofilme por *Salmonella* sp. isolada de frango. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu : [s. n.], 2011

OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P.; ALMEIDA FILHO, E.S.; GONÇALVES, P.M.R. Biofilme na indústria de alimentos. *Higiene Alimentar*, 20(141):33-35, 2006

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; Teixeira, P.; AZEREDO, J. OLIVEIRA R. Adhesion of *Salmonella Enteritidis* to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*.38:318-323ISSN 1517-8382, 2007

RAZA, A.; SARWAR, Y.; ALI, A.; JAMIL A.; HAQUE, A. HAQUE, A. Effect of biofilm formation on the excretion of *Salmonella* entérica serovar Typhi in feces. *International Journal of Infectious Diseases* 15 e747-e752, 2011.

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

SHENG, X.; TING, Y.P.; PEHKONEN. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *J. Colloid Interface Sci.* 321. p. 256-264, 2008

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, p. 1675-83, 2008.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.M.; GAMAZO C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43:793–808, 2002

SOLANO, C.; SESMA, B. ALAVAREZ, M.; HUMPHREY T.J.; THORNS, C.J.; GAMAZO C. Discrimination os strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. *J. Clin Microbio.* 36: 674-8, 1998

SOLOMON, E.B.; NIEMIRA, B.A.; SAPERS, G.M.; ANNOUS, B.A. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J. Food. Prot.*, 68: 906-912, 2005

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; PERESI, J.T.M. *et al.* *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *J. Food protect.*, 65: 1041-1044, 2002.

TRACHOO, N. Biofilms in the food industry. *J. Sci. Technol.* 25(6): 807-815, 2003

TEXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *J. Adhesion Sci. Technol.* 13 1287-1294, 1999

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

VADILLO-RODRIGUEZ, V.; LOGAN, B.E. Localized attraction correlates with bacterial adhesion to glass and metal oxide substrata. *Environ. Sci. Technol.*, 40(9):2983-2988, 2006

WHO - World Health Organization. Drug-resistant *Salmonella*. Fact Sheet N°139, Revised April, 2005

WHO - World Health Organization. Zoonoses and veterinary public health (VPH). 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/en/>>. Acesso em 01 de abril de 2013

ZOTOOLA, E.A., SASAHARA K.C. Microbial bio- films in the food-processing industry – should they be a concern. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 125–148, 1994

ANEXO I

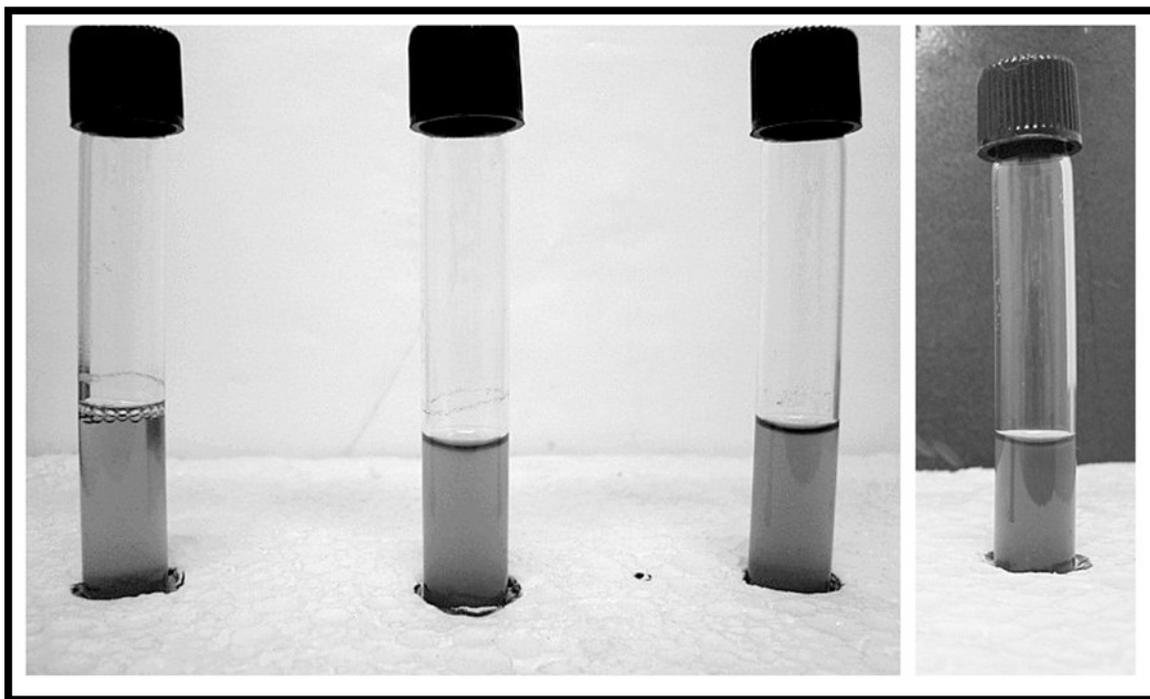


Figura 2: Formação de biofilme por *Salmonella* spp. em vidro. Os isolados foram classificados em (esquerda pra direita): Forte (+++), Médio (++), Fraco (+) e Não Formador, respectivamente. De acordo com Raza et al (2010)