

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Instituto de Biologia**

**Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado**



Trabalho de Conclusão de Curso

**Produção de biofilme *in vitro* por bactérias isoladas de carne moída bovina  
comercializada na cidade de Pelotas – RS**

**Daniela Rodriguero Wozeak**

Pelotas, 2018



**Produção de biofilme *in vitro* por bactérias isoladas de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas – RS**

**Daniela Rodriguero Wozeak**

**Trabalho de Conclusão de Curso, 2018**

**Daniela Rodriguero Wozeak**

**Produção de biofilme *in vitro* por bactérias isoladas de carne moída bovina  
comercializada na cidade de Pelotas – RS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biologia da  
Universidade Federal de Pelotas, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Gladis Aver Ribeiro

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

W837p Wozeak, Daniela Rodriguero

Produção de biofilme in vitro por bactérias isoladas de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas - RS / Daniela Rodriguero Wozeak ; Gladis Aver Ribeiro, orientadora. — Pelotas, 2018.

61 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Produto cárneo. 2. Salmonella spp.. 3. E. coli O157:H7. 4. Biofilme. I. Ribeiro, Gladis Aver, orient. II. Título.

CDD : 614.511

Daniela Rodriguero Wozeak

Produção de biofilme *in vitro* por bactérias isoladas de carne moída bovina  
comercializada na cidade de Pelotas – RS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23 de novembro de 2018

Banca examinadora:

Profa. Dra. Gladis Aver Ribeiro (Orientadora)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Kelly Lameiro Rodrigues

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Lisiane Martins Volcão

Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais. Sem eles eu não estaria concluindo esta etapa da minha vida. Obrigada pai e mãe, por me escutar, aconselhar, por serem tão presentes em toda a minha formação, por ajudar da melhor maneira possível e até mesmo procurar por plantas e insetos para trabalhos que pareciam intermináveis. Obrigada por tornarem os dias difíceis e algumas lágrimas em palavras de carinho e vitórias. Essa conquista não é somente minha, é nossa. E aos demais familiares, obrigada pela torcida e palavras de carinho.

Ao meu noivo, Mateus Britto, obrigada meu amor e melhor amigo, por estar sempre presente, por passar as noites me acompanhando nos estudos, por ser meu porto seguro e sempre me dizer "*Vai dar tudo certo!*". Por exaltar todo o orgulho que sentes por mim e tornar dias difíceis e nebulosos, mais leves e felizes.

A Prof. Gladis Aver Ribeiro, mestre, orientadora, amiga, confidente, uma verdadeira amiga. Prof., obrigada por tudo, por todas as oportunidades, por acreditar em mim, pelas conversas longas, pelos ensinamentos, tanto acadêmicos quanto sobre a vida, que eu jamais esquecerei e pela amizade. Nunca saberei expressar o quão agradecida eu sou por ter te encontrado e poder dividir esses anos. Meu simples, sincero e de coração, obrigado! A graduação não teria sido a mesma sem a tua presença.

A amiga Priscila Voigt, obrigada amiga por ser essa pessoa incrível, pelo apoio, palavras de incentivo e carinho. Obrigada por sempre ter uma palavra positiva para contagiar os momentos mais tensos. Obrigada por ser essa pessoa doce e compreensiva, tu és uma das pessoas mais incríveis que a vida já me presenteou. A amiga Adriéle Silva, essa pessoa maravilhosa que surgiu no fim da graduação e se

tornou uma das melhores amigas que a Biologia me deu. Amiga, muito obrigada por tudo, eu nunca vou esquecer de tudo que fizeste por mim.

A Prof. Daiane Hartwig, obrigada por toda ajuda, tempo dedicado, todos os momentos de aprendizagem, longas conversas e a paciência que tivestes comigo em momentos de desespero. Nunca esquecerei de todos os ensinamentos desses anos de convívio.

Aos colegas do Laboratório 15, principalmente Bruno, Matheus, Marcelle, Kamila, Suélen, Stella, Henrique e Aline, que acompanharam essa jornada de perto e estiveram sempre presentes. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelas risadas altas e pelos longos dias acompanhando nosso cotidiano em laboratório. Vou levar essas amizades para a vida.

Aos professores da Biologia, obrigada por me passarem todo seu conhecimento, por serem um exemplo e uma inspiração. Com vocês eu aprendi o que é ser Biólogo e amar a profissão.

Aos colegas que a Biologia me trouxe, sem vocês esses cinco anos não seriam os mesmos. Obrigada por fazerem com que a graduação fosse mais leve e divertida.

*[...] Eis o segredo que ninguém sabe  
Aqui está a raiz da raiz  
O broto do broto  
E o céu do céu  
De uma árvore chamada vida  
Que cresce mais do que a alma pode esperar  
Ou a mente pode esconder  
E esse é o prodígio  
Que mantem as estrelas a distância [...]  
(E. E. Cummings)*



## Resumo

WOZEAK, Daniela Rodriguero. **Produção de biofilme *in vitro* por bactérias isoladas de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas – RS.** 2018. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Carne moída é um produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento, altamente perecível, podendo sofrer contaminação desde o momento do abate até a oferta ao consumidor. Doenças transmitidas por alimentos são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos, toxinas ou outras substâncias químicas que possam contaminar os alimentos. Seus sintomas variam desde dores de estômago, náuseas, vômitos, diarreias e febre. Essas enfermidades são um grande problema de saúde pública e tornaram-se uma preocupação constante dos órgãos sanitários. Enterobactérias como *Salmonella* e *Escherichia coli* são amplamente estudadas pelo fato de todas serem potencialmente patogênicas ao homem e comporem a microbiota de humanos e de animais de sangue quente, sendo utilizadas como indicador das condições higiênico-sanitárias de alimentos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de carne moída obtidas de estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas – RS, através do isolamento e identificação de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. assim como verificar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* por estas bactérias, através do teste do ágar vermelho congo e do ensaio em placas de microdiluição. Foram analisadas 35 amostras de carne moída, e obtidos 29 isolados, sendo 11 identificados como *Salmonella* spp. e 18 como coliformes termotolerantes, onde 5 foram confirmados como EPEC outros 2 como EHEC pertencente ao sorotipo O157:H7. A formação de biofilme através do teste do ágar vermelho congo foi confirmada em 31,42% dos isolados. E a produção de biofilme pela técnica de microdiluição foi detectada em todos os isolados investigados. Verificou-se que a suplementação de glicose não interferiu na produção deste polissacarídeo ou no desenvolvimento bacteriano. Este estudo demonstrou alto

índice de contaminação bacteriana nos alimentos investigados mostrando a importância do uso de boas práticas de higiene, bem como a necessidade de treinamento para os manipuladores, para que seja proporcionado ao consumidor um produto de boa qualidade.

**Palavras-chave:** produto cárneo; *Salmonella* spp.; *E. coli* O157:H7; biofilme

## Abstract

WOZEAK, Daniela Rodriguero. **Biofilm production *in vitro* by isolated bacteria from ground bovine meat commercialized in Pelotas - RS.** 2018. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado. Instituto de Biologia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Ground beef is a meat product obtained from the grinding of muscle masses of bovine carcasses, followed by immediate cooling or freezing, highly perishable and may suffer contamination from the time of slaughter to supply to the consumer. Foodborne diseases are caused by the ingestion of food contaminated with microorganisms, toxins or other chemicals that may contaminate food. It's symptoms range from stomach upset, nausea, vomiting, diarrhea and fever. These diseases are major public health problem and have become a constant concern of health agencies. Enterobacteria such as *Salmonella* and *Escherichia coli* are widely studied because they are all potentially pathogenic to man and make up the microbiota of humans and warm-blooded animals and are used to evaluate the hygienic-sanitary conditions of food. The objective of this study was to evaluate the hygienic-sanitary conditions of samples of ground beef obtained from commercial establishments in the city of Pelotas - RS, through the isolation and identification of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. Also to verify the capacity of biofilm formation *in vitro*, through the red congo agar test and the microdilution plate test. Thirty - five ground beef samples were analyzed, and 29 isolates were obtained, of which 11 were identified as *Salmonella* spp. and 18 as thermotolerant coliforms, where 5 of these were confirmed as EPEC other 2 as EHEC belonging to serotype O157: H7. The biofilm formation through the congo red agar test was confirmed in 31.42% of the isolates. The biofilm production by microdilution technique was detected in all isolates investigated. It was found that glucose supplementation did not interfere in the production of this polysaccharide or in bacterial development. This study demonstrated a high bacterial contamination index in the foods investigated, showing the importance of the use of good hygiene practices, as well as the need for training for the manipulators, so that the consumer is provided with a good quality product.

**Key-words:** meat product; *Salmonella* spp; *E. coli* O157:H7; biofilm

## Lista de Figuras

- Figura 1 - Sequência de eventos que ocasionam a formação de biofilme em superfície (SHI & ZHU, 2009) ..... 25
- Figura 2 - Esquema utilizado para a verificação da produção de biofilme em placa de microdiluição. A: controle positivo de formação de biofilme. B: controle negativo de formação de biofilme. C: área teste onde cada número corresponde a amostra inoculada, sendo 2, 3, 5, 6 e 9 são isolados de *E. coli* e os demais são isolados de *Salmonella* spp..... 33
- Figura 3 - Teste em Ágar Vermelho Kongo. A: colônias de coloração rosada, indicando isolado não produtor de biofilme. B: colônias negras, indicando isolado produtor de biofilme..... 41
- Figura 4 - Placa de microdiluição corada com Cristal Violeta, ensaio com suplementação 0,75% de glicose. A: Controle positivo de formação de biofilme; B: Controle negativo de formação de biofilme; C: Área teste, com todos os isolados bacterianos..... 43
- Figura 5 - Médias das Densidades Ópticas (DO) dos biofilmes formados por *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de carne moída bovina, frente a diferentes concentrações de glicose..... 47
- Figura 6 - Médias das Densidades Ópticas (DO) do crescimento bacteriano *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de carne moída bovina, frente a diferentes concentrações de glicose..... 48

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Contagem de coliformes a 45 °C pelo Teste do Número Mais Provável e identificação do grupo sorológico em amostras de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas - RS..... 37
- Tabela 2 - Relação de resultados para o Teste de Capacidade de Formação em Biofilme Ágar Vermelho Congo por isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* provenientes de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas - RS..... 42
- Tabela 3 - Valores da Densidade Óptica (DO) e classificação qualitativa dos isolados bacterianos quanto a formação de biofilme..... 44

## Sumário

1 Introdução .....	14
1.1 Objetivos .....	16
1.1.1 Objetivo Geral .....	16
1.1.2 Objetivos Específicos .....	16
1.2 Hipótese .....	16
2 Revisão de Literatura .....	17
2.1 Contaminação em alimentos .....	17
2.2 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) .....	19
2.3 Família Enterobacteriaceae .....	20
2.3.1 Gênero <i>Salmonella</i> .....	21
2.3.2 Gênero <i>Escherichia</i> .....	22
2.4 Biofilmes .....	24
3 Material e Métodos .....	28
3.1 Obtenção das amostras .....	28
3.2 Identificação de <i>Salmonella</i> spp. ....	28
3.3 Identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	29
3.4 Testes de capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	31
3.4.1 Caracterização fenotípica da produção de biofilme – Teste do Ágar Vermelho Congo .....	31
3.4.2 Ensaio da produção de biofilme .....	31
4 Resultados e discussão .....	34
4.1 Contaminação das amostras .....	34
4.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp e <i>E. coli</i> .....	34
4.3 Potencial de formação de biofilmes .....	40
5 Conclusão .....	49
Referências .....	50

## 1 Introdução

Nos últimos anos, com o crescimento da indústria alimentícia e a globalização, os problemas relativos à qualidade dos alimentos para consumo humano ficaram mais evidentes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) vem alertando constantemente sobre a necessidade de tomar providências sobre a contaminação por agentes biológicos com potencial de causar danos à saúde e, não há dúvidas sobre a importância das bactérias como agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

A carne moída é definida como “produto cárneo obtido através da moagem de massas musculares e carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento” (BRASIL, 2003) e é um alimento que se destaca entre os demais, pois é bem aceito pelo consumidor devido a sua praticidade e valor de mercado (PIGARRO; SANTOS, 2008; MENDONÇA; SILVA, 2012). Além disso, é um alimento de amplo consumo em todo país, estando presente, mesmo que em quantidade, qualidade e modo de preparo diferenciados, na dieta da grande maioria da população. É um alimento rico em proteínas essenciais para o organismo e uma importante fonte de vitaminas e minerais (OLIVO; OLIVO, 2006; FERREIRA; SIMM, 2012). Pelo fato de ser amplamente consumida, é de extrema importância oferecer ao consumidor um produto de alta qualidade microbiológica (MARCHI, 2006).

No Brasil são produzidos cerca de 10 milhões de toneladas de carne bovina, e desse total aproximadamente 21% é negociado para dezenas de países em todo o mundo, segundo a Associação Brasileira de Indústria Exportadora de Carne Bovina (ABIEC, 2017). Para que seja comercializada dentro do país, a carne deve estar de acordo com os padrões descritos pela RDC nº 12 de 2001 (BRASIL, 2001), estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que define como parâmetro de qualidade microbiológica da carne *in natura*, ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. Para *Escherichia coli*, não há limite estabelecido, porém, alguns autores utilizam parâmetros, também descritos na RDC

nº 12 estabelecidos pela ANVISA, dados a produtos semelhantes como Luz et al. (2015), que utilizaram os valores determinados para alimentos prontos para consumo à base de carnes embaladas a vácuo, onde o limite é de  $1 \times 10^4$  NMP.g<sup>-1</sup>. Ou torna-se como referência os valores determinados para carne bovina fracionada (DIAS et al., 2008), com limite estabelecido em  $1 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup>. E, ainda, o padrão estabelecido para produtos cárneos crus (CARNEIRO; SANTOS, 2010; DAMER et al., 2014), onde o limite é de  $5 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup> de amostra. A enumeração de coliformes, mesmo que não seja exigida por lei, pode ser um indicador de contaminação (PIGARRO; SANTOS, 2008).

Durante o processo de abate, a esfolagem e a evisceração são considerados pontos críticos de controle de contaminação, determinado pela conduta do manipulador, logo, também é inevitável o contato com superfícies, facas, equipamentos e água de lavagem dentro do abatedouro (TERRA; FRIES, 2000). Os equipamentos e utensílios devem ser adequados para que não se tornem potenciais riscos de contaminação, devido a dificuldades durante os processos de higienização, pelo acúmulo de matéria orgânica e levando a formação de biofilme (MACHADO et al., 2004).

Grande parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células individualizadas, livres, em suspensão, mas sim com as células bacterianas organizadas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme. A associação dos organismos em biofilme é uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (IST, 2008). Biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios (JOSEPH et al., 2001).

Visto isto, é necessário buscar a presença de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em amostras provenientes de mercados e açougues na cidade de Pelotas – RS, bem como a busca de mais informações sobre esses micro-organismos e métodos de eliminação destes. A investigação a respeito da qualidade microbiológica de alimentos permite verificar o atendimento da legislação vigente e alertar sobre a importância de boas práticas de manipulação nos estabelecimentos e do papel das unidades de vigilância dos municípios.



## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi isolar, identificar, avaliar a formação de biofilme *in vitro* por bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas de amostras de carne moída bovina de segunda qualidade, obtidas em estabelecimentos comerciais na cidade de Pelotas – Rio Grande do Sul.

### 1.1.2 Específicos

Como objetivos específicos o presente trabalho visa:

- Isolar e identificar bactérias dos gêneros *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. oriundos de carne moída bovina, comercializada na cidade de Pelotas – RS, através de testes bioquímicos e sorológicos;
- Verificar qualitativa e quantitativamente a capacidade de formação de biofilme *in vitro* pelos isolados bacterianos obtidos a partir das amostras de carne moída.
- Verificar a influência da suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de glicose.

## 1.2 Hipótese

Uma vez que a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 define ausência de *Salmonella* spp. em amostras de carne *in natura*, e para *Escherichia coli* em produtos cárneos crus o limite de  $5 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup> de amostra, a hipótese estabelecida é de que não haja contaminação destes micro-organismos nas amostras de carne moída utilizadas no experimento.

## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Contaminação em alimentos**

O modo de vida contemporâneo dos brasileiros, devido ao crescimento econômico e globalização, vem provocando mudanças nos hábitos culturais da população, inclusive hábitos alimentares. Ainda, o tempo para preparo de alimentos está diminuindo, o que leva grande parte da população a buscar por refeições mais rápidas e práticas (GERMANO, 2001).

Na visão do consumidor, o conceito de qualidade de alimentos se resume à satisfação de características como sabor, aroma, aparência, preço e disponibilidade. Entretanto o termo 'alimento seguro' significa ausência de micro-organismos capazes de causar toxinfecções alimentares e microbiota deteriorante extremamente reduzida (PINHEIRO et al., 2010). Sendo assim, partindo do princípio de que os alimentos podem ser veículos de transmissão de micro-organismos e metabólitos microbianos, as unidades responsáveis pela produção de alimentos merecem especial atenção (PIRAGINE, 2005).

Dentro deste contexto, a carne moída se destaca entre os alimentos que podem ser facilmente contaminados, e está frequentemente relacionada com surtos de toxinfecções alimentares (GERMANO, 2001). Segundo Martinelli Filho et al. (1975) a carne moída constitui um ambiente favorável para a multiplicação de bactérias, sendo a fragmentação dos tecidos responsável pela liberação do suco celular, proporcionando a proliferação destas. Também, segundo Jay (2005), após o processo de moagem, a carne possui maior área superficial exposta, e, mesmo sendo mantida sob refrigeração, micro-organismos deteriorantes podem continuar se desenvolvendo. Ornellas (2001) diz que um ponto importante deve ser observado é a qualidade higiênico-sanitária dos produtos, considerando a cor normal da carne

como vermelho-vivo e odor próprio, devendo-se rejeitar-se as carnes de cor arroxeada, acinzentada ou esverdeada ou, ainda, de odor forte e/ou desagradável.

Ainda, Jay (2005) sugere que a contaminação da carne moída se dá de diversas maneiras, dentre elas, podemos citar: a) A faca de sangria que, quando não esterilizada antes de cada abate, pode carrear micro-organismos contaminantes; b) A pele do animal pode ser contaminante tanto da faca de sangria quanto das carcaças em locais esfolados ou, ainda, propagar micro-organismos pelo ar; c) O trato gastrointestinal possui uma enorme e variada microbiota e uma vez perfurado, pode contaminar a carcaça por inteiro; d) As mãos dos manipuladores são uma das mais importantes fontes de contaminação cruzada; e) Os recipientes onde são armazenadas as peças de carne, quando não estéreis acabam por contaminar a peça; f) Ambientes de manuseio e armazenamento podem permitir a contaminação através das bancadas de apoio ou até mesmo pelo ar.

A higiene dos equipamentos e utensílios utilizados na manipulação e preparo de refeições também representa um fator importante em sua qualidade. Apesar de não existir uma legislação vigente em que está descrito um padrão microbiológico para superfícies e utensílios que entram em contato com alimentos, a presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp, demonstra que há um risco a saúde dos consumidores, ainda maior quando estes equipamentos são utilizados em preparações consumidas cruas (CHESCA et al., 2003). Além disso, após o processamento, a carne fica exposta a uma série de oportunidades de contaminação microbiana devido ao seu alto grau de manipulação (SILVA, 2002).

Máquinas e utensílios que não recebem boa higienização são um excelente meio de crescimento bacteriano e conseqüente formação de biofilme. O biofilme é uma comunidade de células de micro-organismos que se encontram envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e associadas a superfícies bióticas ou abióticas (SAUER et al., 2007), essas substâncias poliméricas consistem principalmente de macromoléculas, incluindo polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BRANDA et al. 2005), e tornam possível a resistência das células bacterianas ao ambiente (COSTERTON et al., 2005).

Diversos estudos demonstram a alta incidência de contaminação por agentes microbiológicos. Ferreira & Simm (2012) analisaram 6 amostras de carne moída e

consideraram 16,67% delas inadequadas para consumo, uma vez que detectaram a presença de micro-organismos patogênicos. Em uma análise feita em 23 restaurantes de autosserviço, da cidade de Itumbiara-GO, von Dolinger et. al. (2010) encontraram apenas um que não apresentou contaminação dos alimentos acima do padrão exigido pela ANVISA. E ainda, uma análise feita com tábuas de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior de São Carlos, indicou que de 10 tábuas analisadas, 70% apresentava acúmulo de micro-organismos, indicando má qualidade higiênico-sanitária (PINHEIRO et al., 2010).

## **2.2 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)**

Ao ingerir um alimento com micro-organismos ou toxinas produzidas por eles, o indivíduo pode desenvolver uma determinada enfermidade que frequentemente é chamada de toxinfecção alimentar (FORSYTHE, 2002), essas toxinfecções são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. Conforme a RDC nº 12, são consideradas DTA quando a enfermidade é causada pela ingestão de um alimento contaminado por agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico (BRASIL, 2001).

Pesquisas realizadas pela OMS apontam as toxinfecções alimentares como as doenças de origem alimentar mais comuns, entre as quais, 60% dos casos decorrem de técnicas inadequadas de manipulação, processamento e contaminação dos alimentos (ROSSI, 2006).

Dentro dos agentes causadores das DTA destacam-se as enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., sendo os sintomas mais comuns de infecções alimentares por esses patógenos, dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. Dependendo do sorotipo envolvido, o quadro clínico pode ser mais grave, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória, septicemia e a morte (FORSYTHE, 2002; RODRIGUES et al., 2004; MÜRMAN et al. 2008).

As DTA constituem um dos problemas de saúde pública de maior frequência no mundo todo, em 1999 os *Centers for Disease Control* (CDC) registraram uma

epidemia de 207 casos confirmados de diarreia pela ingestão de suco de laranja não pasteurizado. Em apenas um mês, centenas de habitantes de 15 estados americanos e duas províncias canadenses haviam consumido o produto contaminado por *Salmonella* spp. Ainda nos Estados Unidos, entre 1983 e 1987 foram registrados 909 surtos de intoxicações alimentares, afetando cerca de 50 mil pessoas (SCHAECHER, 2002). Na Europa, nos anos 1990, cerca de 120 surtos foram notificados em 11 países e afetaram cerca de 100 mil pessoas (FORSYTHE, 2002). No Brasil, entre os anos de 1999 e 2003 cerca de 2406 surtos de DTA, acometendo cerca de 42642 pessoas (FERREIRA; SIMM, 2012).

Segundo o SINAN (Sistema de Informação de Agravos e Notificações) entre os anos de 2007 e 2017 houveram 7.170 surtos de DTA no Brasil, destes, apenas 29,4% tiveram seus agentes etiológicos identificados. As bactérias estão em primeiro lugar na lista de agentes etiológicos causadores de DTA, com 95,9% dos casos identificados, desta lista de bactérias, a *E. coli* ocupa o primeiro lugar com 525 casos, seguido de *Salmonella*, com 515 casos (BRASIL, 2017).

### **2.3 Família Enterobacteriaceae**

Dentre os inúmeros micro-organismos que podem contaminar a carne moída, utensílios e equipamentos podemos dar especial atenção a família Enterobacteriaceae. As enterobactérias são importantes bactérias que predominam na microbiota intestinal humana, são Gram-negativas, tem formato bacilar, não esporulados, apresentam ou não motilidade, são aeróbias ou anaeróbias facultativas (PATERSON, 2012) fermentadoras de glicose e são comumente associadas tanto a infecções na comunidade como a infecções nosocomiais. Várias espécies dessa família podem dar causa a numerosos processos patogênicos como abscessos, meningites, sepses, pneumonias, infecções do trato urinário, infecções gastrointestinais e colonização de cateteres (KONEMAN et al., 2001) e ainda, podemos citá-las dentre as bactérias Gram-negativas de maior relevância epidemiológica, sendo as mais importantes *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. entre outras. Segundo Farmer (1995) estas bactérias causam uma série de doenças em humanos, incluindo 30% a 35% de todos os casos de septicemia e mais de 70% dos casos de infecção intestinal e das

vias urinárias. Ainda, algumas enterobactérias, como *Salmonella* spp., *Shigella* sp., e *Yersinia pestis* estão constantemente associadas a doenças em seres humanos, enquanto outras como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* fazem parte da microbiota do homem, sendo grandes oportunistas e podendo causar infecções em indivíduos imunodeprimidos.

As bactérias podem ser adquiridas a partir de um reservatório animal (como *Salmonella* spp.) ou de um portador humano. *E. coli* é a espécie do seu gênero de maior importância clínica, sendo seu maior reservatório o homem, classificada dentro do grupo de coliformes termotolerantes e sua transmissão se dá de diversas maneiras como: fecal-oral, ingestão de água ou alimentos contaminados e também via contato com fômites (TRABULSI et al., 2008).

### **2.3.1 Gênero *Salmonella***

As salmonelas são o grupo mais complexo das Enterobacteriaceae, com mais de 2.200 sorotipos descritos, ainda possuem antígenos somáticos (O), que são lipopolissacarídeos, e flagelares (H), que são proteínas (KONEMAN et al., 2001) e apesar de seu parentesco próximo, sorovares de *Salmonella* diferem nos seus hospedeiros e nas doenças que causam (FORSYTHE, 2013).

Ainda segundo Forsythe (2013), a *Salmonella* spp. é uma causa importante de doenças de origem alimentar no mundo todo e uma causa significativa de morbidade, mortalidade e perdas econômicas. A salmonelose é considerada uma das doenças de origem alimentar relatadas mundialmente com mais frequência. Deve-se ressaltar também, que a maioria dos sorotipos desse gênero são patogênicos ao homem, apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência de variação no mecanismo de patogenicidade além da idade e da resposta imune do hospedeiro (TRABULSI, 2008). Os diferentes sorotipos de *Salmonella* estão envolvidos em: gastroenterites (*S. enteritidis* e *S. typhimurium*), febre entérica (*S. typhi* e *S. paratyphi*) e doença sistêmica invasiva (*S. choleraesuis*), dos sintomas característicos de doenças de origem alimentar causadas por *Salmonella* podemos citar: diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda e calafrios, vômitos, cefaleia, fraqueza (FORSYTHE, 2013) septicemia e infecção gastrointestinal (SHINOHARA et al., 2008).

Estima-se que 96% dos casos de salmonelose sejam causados pela contaminação de uma ampla variedade de alimentos, isso inclui carnes cruas, produtos de frango crus ou mal-cozidos, ovos, produtos com ovos crus, leite e produtos lácteos entre outros (FORSYTHE, 2013), essa afirmação pode ser confirmada por diversos trabalhos, como por exemplo, Neitzke (2017) que pesquisou a contaminação de carcaças suínas por *Salmonella* spp. em abatedouros e, de 258 amostras obteve uma frequência de 7,75% de contaminação.

Já um estudo feito em Cascavel - PR com hambúrgueres de carne bovina onde de 10 amostras, 3 foram consideradas impróprias para consumo (LEMUNIE & WEBER, 2018). Como já mencionado, a contaminação microbiológica é uma preocupação de forma geral no setor da alimentação, um estudo foi feito com saladas contendo maionese no município de Ji-Paraná - RO, onde 20 amostras coletadas em 5 restaurantes diferentes, após as análises 30% delas foram consideradas impróprias para o consumo, uma vez que estavam contaminadas por *Salmonella* spp. (BARCELOS et al., 2016).

### 2.3.2 Gênero *Escherichia*

As cepas enteropatogênicas de *E. coli* são divididas de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos de patogenicidade, em vários grupos que podem variar em seus períodos de incubação e duração da enfermidade, considerável variação na virulência (FORSYTHE, 2013).

Os seis grupos reconhecidos como enteropatogênicos são os seguintes:

- *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), causa diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (HUS) e púrpura trombótica trombocipênica (FORSYTHE, 2013). Tem como fenótipo patogênico a produção de citotoxinas (SLT) (KONEMAN, 2001), neste grupo estão incluídos sorovares como O157:H7, O26:H11 e O111:NM (FORSYTHE, 2013).

- *E. coli* enteropatogênica (EPEC), em geral, ocorre em crianças. Caracterizada por febre baixa, mal-estar, vômitos e diarreia com abundante quantidade de muco, mas pouco ou nenhum sangue (KONEMAN, 2001; FORSYTHE, 2013). O micro-organismo coloniza as microvilosidades de todo o intestino e produz a lesão

característica de adesão e desaparecimento (“attaching and effacing”) nas bordas da microvilosidade (FORSYTHE, 2013).

- *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), conhecida como causadora da “diarreia dos viajantes” (FORSYTHE, 2013), os sintomas predominantes são diarreia aquosa profusa, acompanhada de câimbras abdominais leves e em alguns casos causa desidratação e vômitos (KONEMAN, 2001), o micro-organismo coloniza a parte proximal do intestino delgado (FORSYTHE, 2013), e produzem toxinas secretoras (LT, ST) que não causam danos ao epitélio mucoso (KONEMAN, 2001).

- *E. coli* enteroinvasora (EIEC), causa febre e diarreias profusas contendo muco e sangue (FORSYTHE, 2013) os sintomas são de urgência e tenesmo (KONEMAN, 2001). O micro-organismo coloniza o colo e contém um plasmídeo de 120 a 140 mD responsável pela invasividade, o qual carrega todos os genes necessários para a virulência (FORSYTHE, 2013).

- *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), causadora de vômitos, desidratação, menos comumente dores abdominais (KONEMAN, 2001) e diarreia aquosa persistente, sobretudo em crianças, durando mais de 14 dias. A EAggEC alinha-se em fileiras paralelas, tanto em tecidos celulares quanto em lâminas. Essa agregação foi descrita como “empilhamento de tijolos”. Elas produzem uma toxina termossensível, relacionada antigenicamente à hemolisina, mas que não é hemolítica, e uma toxina termoestável codificada por um plasmídeo (EAST1) sem qualquer relação termoestável da ETEC. Imagina-se que a EAggEC fique aderida à mucosa intestinal e produza as enterotoxinas e citotoxinas, as quais resultam em diarreia secretória e em danos à mucosa (FORSYTHE, 2013).

- *E. coli* difusamente adesiva (DAEC) tem sido associada com diarreia em alguns estudos, mas não de forma consistente (FORSYTHE, 2013). As cepas deste grupo são capazes de se aderirem de modo homogêneo, ou seja, cobrindo uniformemente toda a superfície da célula intestinal do hospedeiro (CANHIZARES, 2017).

As cepas de *E. coli* podem ser utilizadas como um excelente indicador da qualidade higiênico-sanitária de alimentos e fontes de água. Neste sentido, Gomes (2015) realizou um estudo com 20 amostras de alface, adquiridas em supermercados e feiras livre e 20 amostras de água de coco industrializada, onde a presença de *E. coli* foi identificada em sete das amostras de alface e em duas das amostras de água de coco. Já Cavalin et al. (2018) fez um estudo com 46 amostras



de linguiça fresca comercializadas em supermercados da cidade de Londrina – PR, onde em 33 (71,3%) foram isoladas *E. coli*, o que indica condições de higiene precárias.

## 2.4 Biofilmes

Há uma crescente compreensão de que a formação de biofilme contribui para a patogenicidade bacteriana em virtude da formação de um ambiente estável e protegido, que aumenta a persistência do micro-organismo em condições ambientais diversas (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2009). A interação entre bactéria, superfície e microambiente, torna o processo de formação do biofilme muito complexo (TRENTIN GIORDANI & MACEDO, 2013) e no caso da indústria alimentícia, e mais precisamente na indústria de carnes e derivados cárneos, alguns elementos como: resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos (WATNICK & KOLTER, 2000) oriundos da manipulação, corte e moagem, são importantes elementos para formação da camada condicionante.

Biofilmes podem levar horas, ou até mesmo semanas para desenvolver-se, dependendo das condições do ambiente em que a bactéria está exposta (MACEDO 2000). Sendo assim, é possível encontrar diversos estudos sobre a formação e fixação de biofilmes a superfície inerte e na literatura há mais de uma teoria proposta para tal fenômeno. Macedo (2000) diz que, a primeira teoria proposta foi a de Marshall et al. (1971) onde, a formação de biofilme se daria em duas etapas: primeiramente a adesão reversível, uma vez que as interações entre micro-organismo e superfície são por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática. Logo, na segunda etapa, ocorre a interação física com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica, produzida pela bactéria, e é denominada matriz de glicocálix. Uma segunda teoria, mais detalhada, sugere que a formação do biofilme se dá ao longo de diversas etapas (Figura 1):

1) Primeiramente ocorre a adesão das células ao substrato, formando o filme condicionante. Na indústria de alimentos, os resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, provenientes principalmente de carnes ou derivados laticínios, são importantes para formação dessa camada condicionante (WATNICK & KOLTER, 2000);

2) seguido da agregação e fixação de novas células ao meio (WATNICK & KOLTER, 2000), e logo há aderência à superfície, que ocorre em dois estágios, adesão reversível seguida de adesão irreversível (IST, 2008). A adesão reversível é caracterizada pela interação fraca entre a bactéria e substrato, envolvendo forças de atração de Van Der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, nesse estágio as células bacterianas ainda podem ser removidas pela aplicação de forças mínimas (WATNICK & KOLTER, 2000). A adesão irreversível se dá quando há o ancoramento de apêndices, como pili, flagelo, proteínas adesinas e/ou produção de substâncias poliméricas extracelulares, provocando o fortalecimento das interações químicas entre células bacterianas e a superfície de contato (IST, 2008), essas interações levam pouco tempo para ocorrer (de 20 minutos a 4 horas após o contato) e caracterizam-se por ligações químicas dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (HOOD & ZOTTLA, 1995);

3) Multiplicação das células bacterianas presentes na estrutura do biofilme, formando microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares (MALONE & CARDWELL, 1983), logo ocorre a adesão de outros micro-organismos colonizadores secundários (IST, 2005), provenientes da passagem de outras peças de alimento;

4) E finalmente o desprendimento de células únicas ou fragmentos (COSTERTON et al., 2005).

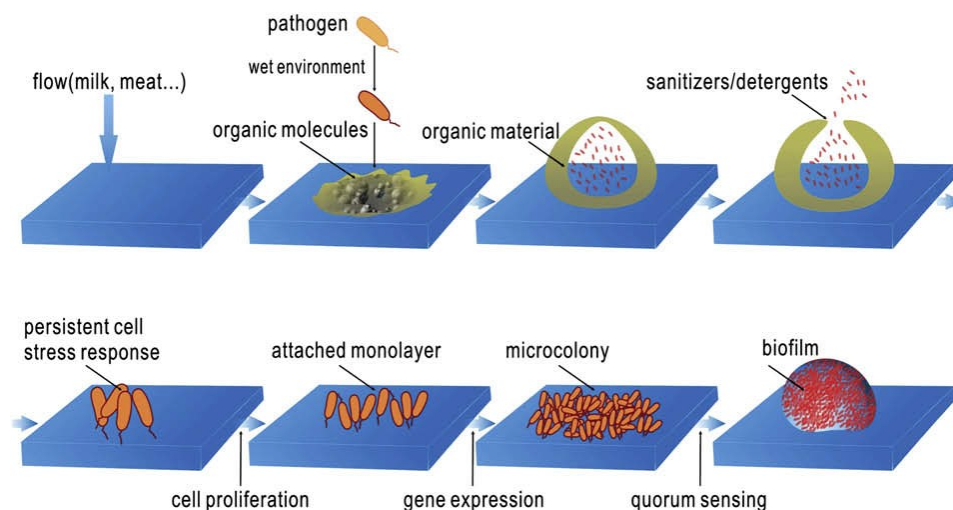


Figura 1 – Sequência de eventos que ocasionam a formação de biofilme em superfície (SHI & ZHU, 2009).

Micro-organismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxinfecções alimentares (CHAVANT et al., 2007).

Falhas nos procedimentos de higienização contribuem para que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Em condições favoráveis, micro-organismos se aderem a esses resíduos, interagem com as superfícies e iniciam a multiplicação celular (MACEDO, 2000) e conseqüentemente, a produção de biofilme. Após a formação de biofilme as bactérias continuam a se multiplicar, constituindo assim outra fonte potencial de contaminação de alimentos (ROSADO, 2009).

O crescimento de micro-organismos na superfície de alimentos é uma das principais causas de deterioração e perdas de produtos processados e *in natura* (CAMILLOTO et al., 2007) e a presença de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos em superfícies, sobre as quais comunidades bacterianas podem se desenvolver (OLIVEIRA, BRUGNERA & PICCOLI, 2010).

Biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios (JOSEPH et al., 2001). Ainda, podem ser até 1000 vezes mais resistentes a um antimicrobiano, quando comparadas às mesmas células planctônicas (KYAW, 2008), podendo persistir a processos de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxinfecções alimentares (CHAVANT et al., 2007).

Vários fatores têm sido sugeridos para explicar a resistência de biofilmes a agentes microbianos: a matriz de polímeros extracelulares age como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme; adicionalmente, a matriz de substâncias poliméricas extracelulares pode reduzir fisicamente a penetração do agente antimicrobiano (GILBERT et al., 2002), além de limitar a difusão de sanitizantes, a matriz de exopolissacarídeos pode reagir

e causar a inativação destes (TRENTIN, GIORDANI & MACEDO, 2013). Após a adesão irreversível, a remoção destas células é muito difícil e envolve força mecânica, aplicação de detergentes, sanitizantes, surfactantes ou calor (SINDE & CARBALLO, 2000).

Para oferecer ao consumidor um produto seguro, além de controlar a presença de micro-organismos em alimentos, é essencial verificar e monitorar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios utilizados no processamento. Assim, é necessário um bom programa de limpeza e sanitização para inativar micro-organismos e prevenir o acúmulo de matéria orgânica, conseqüentemente a proliferação de células bacterianas ou biofilmes nas superfícies de contato com os alimentos (PENG; TSAI; CHOU, 2002).

Além dos riscos associados a saúde pública, também podemos ressaltar os impactos causados pela presença destes biofilmes. Uma vez instalados, os biofilmes desencadeiam um processo denominado corrosão microbiologicamente induzida (MANSFELD, 2007), esse fenômeno causa a deterioração e baixa na vida útil de utensílios e equipamentos.

A intervenção na educação para manipulação adequada de alimentos pode contribuir para maximizar a segurança do manipulador no manuseio de alimentos, ampliar as perspectivas educacionais deste e fornecer à população um alimento seguro do ponto de vista microbiológico (LEVINGER, 2005).

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Obtenção das amostras**

As 35 amostras de carne moída foram obtidas através de compra direta em estabelecimento comercial, supermercados e açougues escolhidos aleatoriamente e distribuídos na cidade de Pelotas – RS. Foram adquiridos 100g de carne moída bovina de segunda categoria, vendida a granel, e logo após a compra, as amostras foram mantidas sob refrigeração e levadas ao Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, alocado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, situado no Campus Capão do Leão.

#### **3.2 Identificação de *Salmonella* spp.**

Para identificação de *Salmonella* spp., foi utilizada a metodologia descrita por Silva et. al. (2001). Primeiramente, 25g da amostra foi homogeneizada com 225 ml de Caldo Lactosado (Isofar ®), logo o pH foi ajustado para  $6,8 \pm 0,2$  utilizando NaOH ou HCl, ambos na concentração 1N. Posteriormente a amostra foi incubada a 36°C por 24h. Após o período de incubação, o caldo com amostra passou por agitação moderada, afim de homogeneizar o precipitado com o solvente, e logo transferido 0,1 ml para tubo de ensaio contendo 10 ml de Caldo Rappaport (Acumedia ®), 1 ml para tubo de ensaio contendo 10 ml de Caldo Tetrionato (Acumedia ®) acrescido de 0,2 ml de solução de iodo e 0,1 ml de verde malaquita a 0,1% e logo, levado a estufa de incubação a 36°C por 24h. Em seguida estes tubos de ensaio foram agitados para homogeneização dos componentes, e uma alçada de cada caldo foi inoculada em placas de Petri contendo Ágar Xilose Desoxicolato (XLD) (Kasvi ®) e Ágar Hektoen Enteric (HE) (Kasvi ®) e levado à estufa, incubando-as a 36°C por

24h, após esse período, as colônias suspeitas, ou seja, colônias com coloração rosa com ou sem centro negro ou totalmente negras, em ágar XLD, e colônias azul-verdeadas com ou sem centro negro ou totalmente negras em ágar HE, foram semeadas em Ágar Müller Hinton (Kasvi ®) para coloração de Gram e provas bioquímicas.

Foram utilizados Ágar Triple Sugar Iron (TSI) (Himedia ®), Lysine Iron Agar (LIA) (Oxoid ®) e caldo Uréia (Vetec ®). Para o teste feito em ágar TSI foi utilizada alça de platina e feita inoculação em zigue-zague e posterior introdução da alça até o fundo do tubo. O teste com ágar LIA foi feito com a agulha de inoculação introduzindo-a duas vezes no meio de cultura. Para o teste com caldo Uréia a inoculação ocorreu por dispersão com alça de platina. Logo, todas as provas bioquímicas foram incubadas a 36°C por 24h. Os testes considerados positivos foram interpretados da seguinte maneira: tipicamente, as reações de *Salmonella* spp. em ágar TSI são rampa alcalina (vermelho) e fundo ácido (amarelo) com ou sem escurecimento pela produção de H<sub>2</sub>S, em ágar LIA não há alteração do pH e por consequência não há alteração de coloração de meio, com ou sem produção de H<sub>2</sub>S, em caldo Uréia não deverá haver a viragem alcalina, ou seja, o caldo deverá permanecer com cor alaranjada.

Para o teste de pesquisa do antígeno somático (teste sorológico), uma gota de água destilada estéril foi colocada em uma lâmina e, a partir da cultura bacteriana de 24h, transferiu-se uma alçada para esta lâmina. Seguido de homogeneização e então, uma gota do Soro *Salmonella* Somático Polivalente (Probac do Brasil ®) foi adicionada, onde a formação de grumos na suspensão indicou reação positiva.

### **3.3 Identificação de *Escherichia coli***

Para identificação da *E. coli* foi utilizada a metodologia descrita por Silva et. al. (2001), onde primeiramente foi feito o teste presuntivo para coliformes. Inicialmente homogeneizou-se 25g de amostra de carne moída em 225mL de água peptonada 0,1% estéril, a partir desta foram feitas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-4</sup>, 1mL de cada diluição foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (ISO FAR ®) e tubo de fermentação invertido (tubo de Durham), inoculado 3 tubos para cada diluição para realizar a contagem estimativa

de coliformes pelo Número Mais Provável (NMP), e foram incubados a 37°C por 48h. Após esse período os tubos foram analisados e, os que apresentaram turbidez e retenção de gás no tubo de Durham, foram considerados positivos. Logo iniciou-se o teste de confirmação de coliformes termotolerantes, e a partir dos tubos presuntivamente positivos para coliformes, uma alçada foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10mL do Caldo EC (Himedia ®) com tubo de Durham. Esses tubos foram incubados em banho-maria a 45°C por 48h e foram considerados positivos, os tubos que apresentavam turvação e continham gás retido no tubo de Durham. Baseando-se na distribuição dos tubos positivos em Caldo EC, foi utilizada a tabela do NMP para calcular o Número Mais Provável de coliformes termotolerantes. Para isolamento e confirmação de *Escherichia coli*, uma alçada foi retirada dos tubos positivos do Caldo EC e inoculada em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (ISOFAR ®) e incubando-as a 37°C por 24h. Colônias com coloração rosa e centro negro, com ou sem brilho verde metálico, foram consideradas positivas e essas colônias foram semeadas em Ágar Müller Hinton e submetidas a coloração de Gram e provas bioquímicas.

Para as provas bioquímicas, primeiramente foi inoculada uma alçada em ágar Citrato de Simmons (Oxoid ®) em tubo de ensaio inclinado, incubando-o a 35°C por 24h, o crescimento e viragem de cor de verde para azul indicou teste positivo. Logo o teste de indol foi realizado, este teste é feito com Ágar SIM semi-sólido (MERCK ®), onde com a agulha de inoculação foi feito apenas uma perfuração central e incubado a 35°C por 24h, após esse período foi adicionado 0,2mL de Reagente de Kovac's, o aparecimento de halo superior na cor vermelha indicou positividade no teste. O meio SIM também foi utilizado para o teste de motilidade, onde observou-se o crescimento da cultura, nos tubos onde houve crescimento apenas no local de inoculação, o teste é considerado negativo, nos tubos onde observou-se crescimento expandido, o teste foi considerado positivo, *Escherichia coli* é motilidade variável.

O último teste bioquímico feito foi o Teste de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer, utilizando caldo MR-VP (ISOFAR ®). Por dispersão inoculou-se uma alçada, neste teste foram feitos dois inóculos bacterianos, um para cada teste, e incubou-se a 35°C por 48h. Em um dos tubos foi adicionado 0,3mL de Solução de Vermelho de Metila (teste MR), onde o aparecimento de cor vermelha indicou reação

positiva, o segundo tubo (teste VP) foi incubado por 24h a mais, logo adicionou-se 0,6mL de solução  $\alpha$ -naftol e 0,2mL de solução de KOH 40%, agitando o tubo após a adição de cada reagente, o desenvolvimento de cor vermelho claro até 4h depois, indicou reação positiva.

Após observar os resultados dos testes bioquímicos, foi feito o teste sorológico para pesquisa de sorogrupo enteropatogênico, sendo testados para *E. coli* Polivalente A Clássica, *E. coli* Polivalente B Clássica, *E. coli* Polivalente C Clássica e *E. coli* O157:H7 Enterohemorragica (Probac do Brasil ®). Uma gota de água destilada estéril foi colocada em lâmina e a partir de cultura recente (24h), transferiu-se uma alçada do cultivo para esta lâmina e homogeneizou-se com uma gota de soro. A formação de grumos indica positividade no teste.

### **3.4 Testes de capacidade de formação de biofilme *in vitro***

#### **3.4.1 Caracterização fenotípica da produção de biofilme – Teste do Ágar Vermelho Congo**

Foi realizada a caracterização fenotípica da produção de biofilme, através do Teste do Ágar Vermelho Congo (FREEMAN et al, 1989). Para tal, foi utilizado Caldo Müller-Hinton acrescido de 1% de ágar-ágar, 5% sacarose e 0,08% de corante Vermelho Congo. Após esterilização, o meio foi disposto em placas de Petri e os isolados foram inoculados por esgotamento e incubados por 24h em estufa a 36°C. Passado o tempo de incubação as placas foram retiradas da estufa e deixadas em temperatura ambiente por mais 18h e logo se observou a presença de colônias de coloração vermelho escuro a negra, indicando positivo para produção de biofilme, a presença de colônias rosadas indica negativo para produção de biofilme.

#### **3.4.2 Ensaio da produção de biofilme**

Para os testes quantitativos de formação do biofilme *in vitro* foram utilizadas placas de microdiluição estéreis de poliestireno de fundo chato com 96 poços onde cada ensaio foi feito em triplicata (STEPANOVIC, 2001). Cada teste foi realizado em triplicata, para garantir uma melhor média e resultados mais confiáveis.



Para iniciar os testes, primeiramente os isolados foram repicados em ágar Brain and Heart Infusion (BHI) (Kasvi ®) e incubados a 37°C, por 16-18h. Deste cultivo foi preparado um inóculo bacteriano de acordo com a escala 0,5 MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml<sup>-1</sup>). Logo, 20µl da suspensão foram transferidos para as placas de microdiluição (cada isolado bacteriano foi inoculado em quadruplicata) e foi adicionado 180µl de Caldo Triple Soy Broth (TSB) (Kasvi ®) acrescentado das seguintes concentrações de glicose: 0%, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1%. Para controle positivo para produtor de biofilme foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25904, já conhecida como produtora de biofilme. Como controle negativo foi utilizado uma solução de NaCl 0,9% estéril sem inóculo bacteriano. Ainda, para controle de esterilidade do meio, foi utilizado meio TSB sem adição de glicose (esquema representado na Figura 2 abaixo). As placas foram incubadas a 37°C por 24h, após esse período, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa foi lavada com solução de NaCl 0,9% três vezes. Logo se adicionou 150µl de metanol e mantido por 20 minutos para fixação do biofilme, o metanol foi descartado e as placas permaneceram em temperatura ambiente por 16-18h para secagem e então se adicionou 200mL de solução de Cristal Violeta 0,15% durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após o descarte da solução de Cristal Violeta, as placas foram lavadas com água Milli-Q e foi adicionado 150µl de etanol 95% por 30 minutos para fixação do biofilme.

A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos foi lida com o auxílio de aparelho Espectrofotômetro POLARIS EE (Celer Biotecnologia S.A.) com comprimento de onda de 540nm. Para acompanhamento do crescimento bacteriano, foram feitas leituras na hora zero e nas 24 horas de incubação, com comprimento de onda de 630nm.

A classificação das amostras quanto a capacidade de formar biofilme foi feita relacionando com a densidade óptica do controle negativo ( $DO_c$ ), sendo assim, a classificação fica da seguinte forma:  $DO \leq DO_c$  não produtor de biofilme,  $DO_c \leq DO \leq 2 \times DO_c$  fraco produtor,  $2 \times DO_c \leq DO \leq 4 \times DO_c$  produtor moderado,  $DO \geq 4 \times DO_c$ . (STEPANOVIC et al. 2007). Os testes foram realizados em triplicada e os resultados foram analisados no programa GraphPad Prisma 8 através de teste ANOVA e Teste T com nível de significância  $p < 0,05$ .

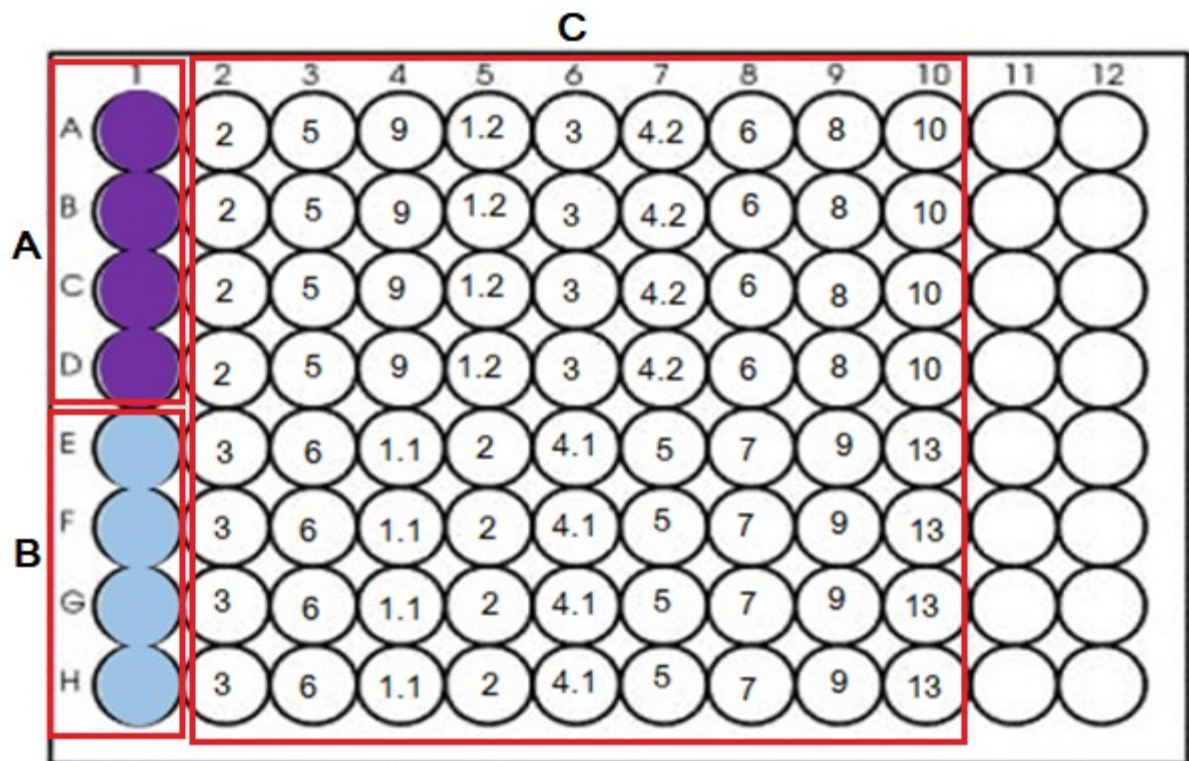


Figura 2 - Esquema utilizado para a verificação da produção de biofilme em placa de microdiluição. A: controle positivo de formação de biofilme. B: controle negativo de formação de biofilme. C: área teste onde cada número corresponde a amostra inoculada, sendo 2, 3, 5, 6 e 9 são isolados de *E. coli* e os demais são isolados de *Salmonella* spp.

## **4 Resultados e Discussão**

### **4.1 Contaminação das amostras**

Foram analisadas 35 amostras de carne moída provenientes de 35 estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas - RS, no período de março de 2017 a fevereiro de 2018. Das 35 amostras, obteve-se 11 (31,43%) isolados de *Salmonella* spp. e 18 (51,43%) isolados de coliformes a 45°C, onde 7 (38,89%) foram identificados como *Escherichia coli*. Ainda, 5 amostras (14,29%) estavam contaminadas com ambas bactérias investigadas.

### **4.2 Detecção de *Salmonella* spp. e *E. coli***

Todos os isolados suspeitos de *Salmonella* spp. foram confirmados a partir da pesquisa de antígeno somático e, os de *E. coli* foram submetidos a testes sorológicos para a pesquisa de sorogrupos enteropatogênicos (Tabela 1).

Os alimentos onde foram confirmados a presença de *Salmonella* spp. foram considerados impróprios para consumo, uma vez que a RDC nº 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) estabelece ausência deste gênero bacteriano em qualquer tipo de alimento, sendo que todos os sorotipos são potencialmente patogênicos ao homem.

Vários estudos vêm demonstrando a incidência de contaminação por *Salmonella* spp. em carne moída, Dias et al. (2008) realizaram uma pesquisa em comércios no estado do Rio Grande do Sul e analisaram a qualidade higiênico-sanitária de 67 amostras de carne moída e embutidos frescos no qual, do total de amostras, 6 (8,9%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. destas 6, uma (4,2%) era de carne moída bovina, duas (9,5%) de linguiça suína e três (13,6%) de linguiça de

frango. Além da carne bovina moída, podemos observar que o autor encontrou em outros produtos contaminação por *Salmonella* spp., sendo assim, este fator pode estar ligado ao fato de que os outros produtos também são muito manuseados durante a produção, pois para o preparo de linguiças as carcaças passam por processo de moagem e, ainda, em alguns estabelecimentos utiliza-se tripa natural proveniente de suínos e ovinos. Mesmo com avanços tecnológicos a carne de frango é passível de contaminação por *Salmonella* spp., estas podem estar parasitando o trato gastrointestinal do animal, possibilitando a contaminação das carcaças caso o abate ou descarte não seja devidamente higienizado (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

Salienta-se também o uso da carne moída bovina para a produção de diversas preparações amplamente consumidas como, por exemplo, o hambúrguer. Lemunie e Weber (2018) obtiveram resultados que afirmam que a contaminação da carne moída bovina pode acontecer em diversas etapas do seu processamento, inclusive no momento de preparo do alimento. Ao fazer um ensaio com sanduíches contendo hambúrguer de carne bovina, oriundos de sanduícherias do tipo trailer na cidade de Cascavel – PR, onde de 10 amostras coletadas de forma randômica, 3 (30%) estavam contaminadas por *Salmonella* spp. Este trabalho destaca-se pelo fato de as amostras conterem carne moída bovina já cozida, indicando que o veículo de contaminação é pós-preparo do alimento, uma vez que já se sabe que o calor mata os micro-organismos pela desnaturação de suas enzimas, que resulta em mudanças na forma tridimensional das proteínas de membrana, inativando-as.

Ainda corroborando com este estudo, uma pesquisa realizada em Campina Grande – PB, fez o levantamento das condições higiênico-sanitárias do Mercado Central, onde 8 amostras de carne moída bovina foram avaliadas quanto a presença de *Salmonella* spp., e outros micro-organismos, como resultado de presença/ausência de *Salmonella* spp. obteve-se um total de 4 amostras (50%) positivas (NASCIMENTO et al., 2014) demonstrando grande risco a saúde dos frequentadores locais, pois como já dito, a presença de *Salmonella* spp. torna o alimento impróprio para consumo uma vez que causa diversas doenças. Locais como mercados centrais tem alto fluxo de público, aumentando ainda mais as chances de ocorrer um surto de DTA.

Os resultados obtidos por Dias et al. (2008), Nascimento (2014), Lemunie e Weber (2018) e o presente trabalho, divergem gravemente dos resultados obtidos por outros estudos, como na pesquisa realizada por Chagas et al. (2017) que investigaram a presença de *Salmonella* spp. em peças cárneas de matadores frigoríficos do estado do Pará, no período de 2014 – 2015 e não isolaram a bactéria em nenhuma das amostras analisadas, conferindo higiene satisfatória no estabelecimento, e ainda, sugere que a peça inteira tem menor área de contato, fato que diminui o índice de contaminação, ressalta-se também a pouca manipulação da peça, passando por menor número de setores dentro da indústria, consequentemente menores chances de contaminação. Ainda, Bezerra, Reis e Bastos (2010) analisaram a qualidade microbiológica de sanduíches denominados “baguncinha” (um sanduíche que reúne diversos tipos de carne e embutidos, inclusive carne moída bovina), típicos da região metropolitana de Cuiabá - MT. Cento e cinco amostras foram coletadas e analisadas afim de detectar a presença de uma série de bactérias, incluindo *Salmonella* spp. que não foi isolada em nenhuma das amostras.

Quanto a contaminação por *E. coli* lembramos que, a RDC nº 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) não estabelece um limite específico de coliformes a 45°C para carne moída bovina, assim o padrão utilizado para este estudo é o de produtos cárneos crus que estabelece o limite de  $5 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>. Podemos observar na Tabela 1 a listagem de amostras contaminadas por coliformes. Do total de 35 amostras, 18 estavam contaminadas com coliformes a 45°C acima do valor estabelecido e destes, 7 foram confirmados como enteropatogênicos através de teste sorológico.

Tabela 1 – Contagem de coliformes a 45 °C pelo Teste do Número Mais Provável e identificação do grupo sorológico de *E. coli* em amostras de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas - RS.

Amostra	NMP.g <sup>-1</sup>	Grupo sorológico
CM 2	9,3 x 10 <sup>3</sup>	Polivalente B clássica
CM 3	4,3 x 10 <sup>3</sup>	O157:H7
CM 5	4,3 x 10 <sup>3</sup>	O157:H7
CM 6	9,3 x 10 <sup>3</sup>	Polivalente B clássica
CM 9	2,3 x 10 <sup>3</sup>	Polivalente B clássica
CM 10	2,3 x 10 <sup>3</sup>	Polivalente C clássica
CM 12	1,5 x 10 <sup>3</sup>	NI
CM 13	9,3 x 10 <sup>3</sup>	Polivalente A clássica
CM 14	4,3 x 10 <sup>3</sup>	NI
CM 15	1,1 x 10 <sup>5</sup>	NI
CM 16	1,5 x 10 <sup>4</sup>	NI
CM 20	9,3 x 10 <sup>3</sup>	NI
CM 23	1,1 x 10 <sup>3</sup>	NI
CM 24	1,5 x 10 <sup>4</sup>	NI
CM 30	7,3 x 10 <sup>2</sup>	NI
CM 31	2 x 10 <sup>3</sup>	NI
CM 32	1,5 x 10 <sup>4</sup>	NI
CM 35	4,6 x 10 <sup>4</sup>	NI

CM: denominação dada às amostras de carne moída bovina, seguido do número dado ao estabelecimento comercial de origem; NMP: número mais provável; NI: não identificado.

Apesar da presença de coliformes, este fato nem sempre indica que a amostra está imprópria para consumo, porém, uma vez que, a ANVISA permite para produtos cárneos crus, limites máximos de  $5 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup> podemos determinar que as 18 amostras de carne moída apresentaram contaminação acima do limite estabelecido, demonstrando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e, sendo assim, impróprias para consumo, tornando-se um perigo potencial para os consumidores. Estes resultados demonstram o quão importante é a higiene do manipulador, de todos os setores de produção de alimentos, desde o abate até o produto final, uma vez que a presença de *E. coli* indica contaminação de origem fecal.

Ressaltamos a alta porcentagem de amostras contaminadas por coliformes termotolerantes (51,43%), e ainda, o grande número de amostras confirmadas como *E. coli* (38,89%) presentes neste estudo. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em uma pesquisa realizada em 20 estabelecimentos comerciais na cidade de Montes Claros – MG, onde foram analisadas quanto a qualidade microbiológica, 20 amostras de carne moída bovina, provenientes de peças de carne do corte acém e/ou patinho e moídas no ato da compra. Destas 20 amostras, 9 apresentaram valores elevados de coliformes totais e 8 para coliformes termotolerantes (GOMES et al., 2017). As peças de carne, quando inteiras, podem não apresentar contaminação, porém quando passam pelo moedor, ou quando são cortadas e manipuladas sobre superfícies, podem carregar por fricção células bacterianas, e já que a carne é um excelente substrato, o crescimento se dá rapidamente, estes fatores podem ter contribuído para a contaminação bacteriana encontrada em nosso trabalho.

Com relação a contagem de coliformes a 45°C podemos observar na Tabela 1 que os números variaram de  $2 \times 10^3$  a  $1,1 \times 10^5$  NMP.g<sup>-1</sup>. Ferreira & Simm (2012) em um trabalho realizado em um açougue do município de Pará de Minas – MG, obtiveram resultados semelhantes, onde 5 de suas 6 amostras, estavam com contagens elevadas de coliformes variando entre  $1,5 \times 10^2$  NMP/g<sup>-1</sup> e  $4,8 \times 10^3$  NMP/g<sup>-1</sup>.

Luz et al. (2015) realizaram uma análise da qualidade microbiológica de carne moída bovina de 4 estabelecimentos diferentes (2 supermercados e 2 mercados públicos) na cidade de Natal – RN, reunindo 20 amostras, foi verificada a presença de coliformes. Das 20 amostras, oito (40%) estavam fora do limite estabelecido pela ANVISA. Em nosso trabalho, verificamos que todas as amostras contaminadas por coliformes estavam acima do limite estabelecido pela ANVISA, essa alta contagem pode se dar ao fato de ser um alimento extremamente manipulado, pois passa por diversos processos, desde a preparação até a moagem, armazenamento e chegada ao consumidor final.

Apesar de a carne moída ser um alimento com muito manuseio, sua contaminação pode ser originário de diversas fontes como, evisceração, maquinário, equipamentos de corte (facas, cutelos e serras), superfícies, contaminação cruzada e ainda, peças maiores de carne podem já estar contaminadas, gerando a carne

moída bovina também contaminada. Estes fatores podem ser evidenciados em um estudo feito em Aracajú – SE, onde foi traçando o perfil microbiológico em peças de carne bovina *in natura* comercializadas em feiras livres. Os resultados mostram que em 100% (52) das amostras havia contaminação por coliformes totais e termotolerantes e destas, foi confirmada em 8 a presença de *E. coli* (GÓES et al. 2012). Em nossa pesquisa, detectamos a presença de coliformes termotolerantes em 51,43% das amostras, uma taxa também alta, demonstrando que a carne bovina *in natura* é um produto que necessita de boa refrigeração e boas práticas de manipulação. Também foi feito um estudo no Vale do Jequitinhonha - MG, no qual Antunes et al. (2016) analisaram 15 amostras de diversos cortes de carne bovina provenientes de 3 açougues da região, destas 15 amostras, 13 (86,7%) apresentaram resultado positivo para coliformes.

Uma pesquisa realizada em diversas cidades de Minas Gerais analisou 396 alimentos de diversas origens, dentre eles 48 eram de carnes e derivados cárneos (embutidos e preparações prontas) e em 4 (8,3%) foi detectada a presença de *E. coli* (FAÚLA et al., 2017). Resultados inferiores aos encontrados em nosso estudo, possivelmente pela diferença de origem, onde os alimentos embutidos e preparações prontas são feitos com diversos componentes químicos conservantes, tornando o índice de contaminação inferior.

Ainda observando a Tabela 1, vemos que as amostras CM 3 e CM 5 (28,57%) estavam contaminadas por *E. coli* O157:H7, sorotipo de extrema importância, é uma das variedades mais frequentes de *E. coli* que causam colite hemorrágica. Habitante do intestino de bovinos, o sorotipo O157:H7 é muito estudado, como a pesquisa desenvolvida em um abatedouro localizado no estado de São Paulo, onde foram avaliados 50 animais em seis pontos do fluxograma de abate: fezes e pele dos animais, interior e exterior da carcaça, água residuária da lavagem das carcaças e carne, tendo como resultado a presença de *E. coli* O157:H7 em 6 (12%) dos animais, nas fezes de 3 (6%) dos animais, na pele de um (2%) e concomitantemente nas fezes e pele de dois animais (4%) (NESPOLO et al., 2014). Comprovando o fato de que a contaminação da carne pode ter início na hora do abate e ainda, muitas vezes há contaminação cruzada entre as carcaças, pela falta de higienização de bancadas e instrumentos, comprometendo até mesmo um lote inteiro da produção industrial. Estes dados podem ser evidenciados em nosso estudo, pois a presença



de EHEC, ademais o sorotipo O157:H7, é um importante indicativo de contaminação de origem fecal, e possivelmente pode contaminar superfícies e equipamentos, bem como, também, poderá haver contaminação por parte do manipulador.

Além do sorotipo específico O157:H7 foram pesquisadas também, sorogrupos enteropatogênicos (EPEC) pois são uma das principais causadoras de diarreias em crianças e adultos (CHANDRAN & MAZUMBER, 2013).

As EPEC também podem ser isoladas de diferentes fontes como: alimentos crus e processados, animais domésticos e silvestres, ambientes naturais como água, solo e areia de praia, fezes e solo de abatedouros bovinos e fazendas (SOUZA et al., 2016). Vale ressaltar que neste estudo foram isoladas 5 (71,43%) cepas bacterianas confirmadas com EPEC, sendo essa contaminação proveniente de qualquer etapa de produção. Pádua et al., (2018) realizaram um estudo no município de Mineiros - GO que tinha como objetivo verificar a qualidade microbiológica de carcaças bovinas oriundas de abatedouro local, e obtiveram 154 amostras que geraram 690 isolados, destes 16 (2,32%) foram confirmados como EPEC. Dias et al., (2012) isolou de queijo minas, comercializado em supermercados do Rio de Janeiro, 5 (16,67%) cepas identificadas molecularmente de EPEC. Ainda podemos destacar o estudo realizado por Sidhu et al. (2013), que ao analisarem 300 cepas de *E. coli* isoladas de água superficial na Austrália, constataram a prevalência de 11% de EPEC em seus isolados, mostrando assim, que as EPEC estão presentes em diversos veículos de contaminação.

Para que não haja contaminação dos alimentos, é fundamental que o manipulador tenha um bom treinamento, visto que são fontes potenciais de bactérias patogênicas. Portadores assintomáticos, ou não, podem disseminar uma série de bactérias envolvidas em DTA. Vale ressaltar a importância da capacitação como estratégia para cumprimento da legislação vigente e produção de refeições que não ofereçam riscos à saúde do consumidor.

### **4.3 Potencial de formação de biofilme**

O Teste do Ágar Vermelho Congo foi realizado para fins de avaliação fenotípica da produção de biofilme pelos isolados e está demonstrado na Tabela 2. Isolados com colônias de coloração rosada, indicam resultado negativo, isolados em que as

colônias apresentaram coloração negra foram considerados positivos para formação de biofilme (Figura 3).

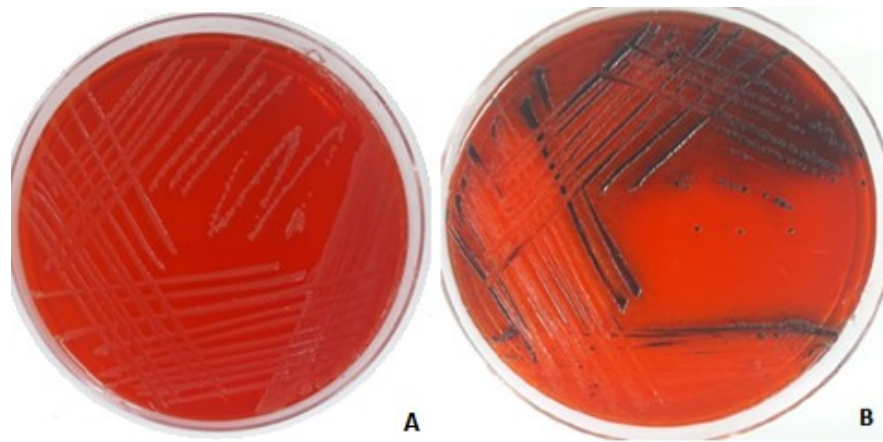


Figura 3 – Teste em Ágar Vermelho Kongo. A: colônias de coloração rosada, indicando isolado não produtor de biofilme. B: colônias negras, indicando isolado produtor de biofilme.

Analisando a Tabela 2, podemos observar que dos 11 isolados de *Salmonella* spp., 5 (45,45%) apresentaram-se fenotipicamente formadoras de biofilme. Já para *E. coli*, o teste foi feito apenas com os isolados com sorogrupo identificado, sendo analisados 7 isolados e destes, 4 (57,14%) apresentaram colônias fenotipicamente formadoras de biofilme.

Tabela 2 - Relação de resultados para o Teste de Capacidade de Formação de Biofilme em Ágar Vermelho Congo por isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* provenientes de carne moída bovina comercializada na cidade de Pelotas - RS.

ISOLADOS			
<i>Salmonella</i> spp.	Resultado	<i>E. coli</i>	Resultado
CM 1.1	Negativo	CM 2	Positivo
CM 1.2	Negativo	CM 3	Positivo
CM 2	Negativo	CM 5	Positivo
CM 3	Positivo	CM 6	Negativo
CM 4.1	Positivo	CM 9	Positivo
CM 4.2	Negativo	CM 10	Negativo
CM 5	Negativo	CM 13	Negativo
CM 6	Positivo		
CM 7	Positivo		
CM 8	Negativo		
CM 9	Positivo		

CM: denominação dada às amostras de carne moída bovina, seguido do número dado ao estabelecimento comercial de origem.

Além do teste fenotípico, os isolados foram submetidos a ensaio de formação de biofilme *in vitro* (Figura 4) e classificados qualitativamente em não formador ou formador de biofilme (forte, moderado e fraco).

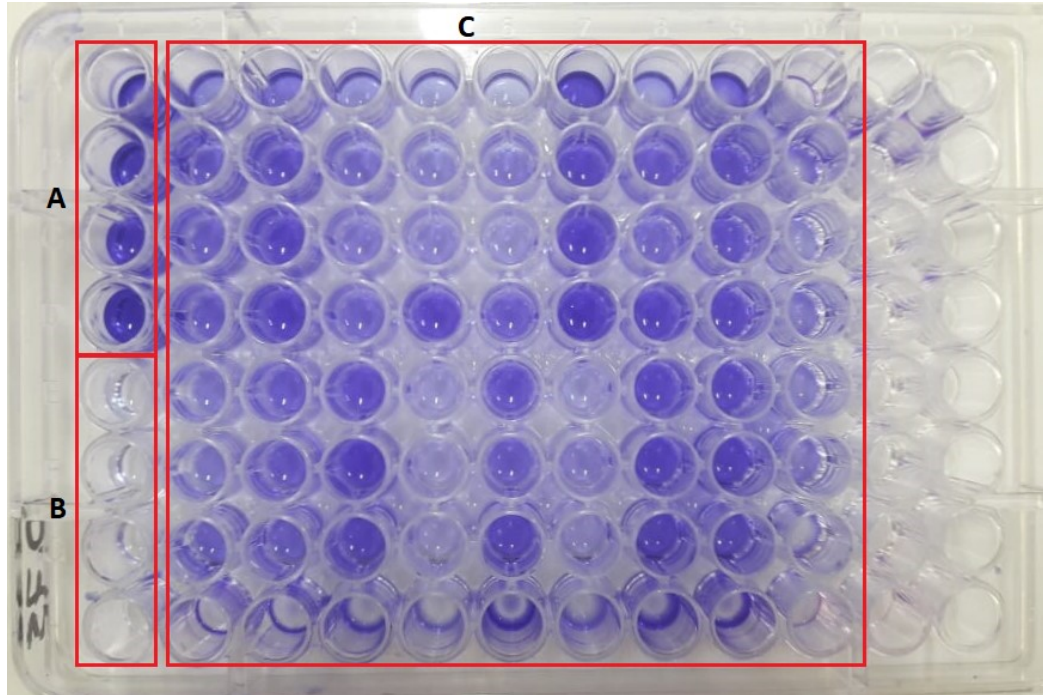


Figura 4 - Placa de microdiluição corada com Cristal Violeta, ensaio com suplementação 0,75% de glicose. A: Controle positivo de formação de biofilme; B: Controle negativo de formação de biofilme; C: Área teste, com todos os isolados bacterianos.

A classificação dos formadores de biofilme foi baseada na medida da densidade óptica (DO) do controle negativo. Neste ensaio, foi obtida, a partir da média dos controles, uma DO de 0,178 e então foi feita a seguinte classificação: não formador de biofilme  $DO < 0,178$ , fraco formador  $DO 0,178$  a  $0,356$ , moderado formador  $DO 0,356$  a  $0,712$ , e forte formador  $DO > 0,712$ . Dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores das médias Densidade Óptica (DO) e classificação qualitativa dos isolados bacterianos quanto a formação de biofilme.

Bactéria	Amostra	Médias da Densidade Óptica (DO)	Classificação qualitativa
<i>E. coli</i>	CM 2	0,803	Forte
	CM 3	0,230	Fraco
	CM 5	0,699	Moderado
	CM 6	0,428	Moderado
	CM 9	0,752	Forte
	CM 10	0,587	Moderado
	CM 13	0,539	Moderado
<i>Salmonella spp.</i>	CM 1.1	1,532	Forte
	CM 1.2	0,617	Moderado
	CM 2	0,295	Fraco
	CM 3	0,310	Fraco
	CM 4.1	1,311	Forte
	CM 4.2	1,837	Forte
	CM 5	0,203	Fraco
	CM 6	0,583	Moderado
	CM 7	0,601	Moderado
	CM 8	0,484	Moderado
CM 9	0,430	Moderado	

CM: denominação dada às amostras de carne moída bovina, seguido do número do estabelecimento comercial de origem.

Neste ensaio, a capacidade de formação de biofilme foi observada em todos os isolados bacterianos, sendo 4 (22,23%) fracos formadores, 9 (50%) moderados formadores e 5 (27,78%) fortes formadores nas diferentes concentrações de glicose inseridas no meio de cultura e também sem a adição da mesma. Em ambientes naturais, 95% a 99% dos micro-organismos existem na forma de biofilmes, podendo ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para seu crescimento (NIKOLAEV & PLKUNOV, 2007). A aderência e persistência de patógenos de origem alimentar em ambientes de processamento de

alimentos está ligado a sua resposta ao ambiente, tanto biótico quanto abiótico (WINKELSTROTTER et al., 2013). A grande maioria das bactérias que estão envolvidas em surtos de DTA são capazes de formar biofilmes sob a maioria dos materiais, e ainda, sob quase todas as condições ambientais encontradas no processamento industrial. No teste em placa de microdiluição desenvolvido no presente estudo foi observado que todos os isolados foram capazes de produzir biofilme, sugerindo que mesmo em condições não naturais, as células bacterianas ainda têm a capacidade de formar biofilme.

Podemos observar que houve discrepância entre os resultados das duas análises, uma vez que a análise feita em Ágar Vermelho Congo demonstrou menor incidência (50%) do que o ensaio feito em microplaca. Assim como em nosso estudo, resultados discrepantes entre as técnicas também foram observados por Babapour et al. (2016), em um ensaio de formação de biofilme realizado com 3 técnicas diferentes (ágar Vermelho Congo, microplaca e em tubo de vidro) com *Acinetobacter baumannii* onde de 156 isolados submetidos ao ágar Vermelho Congo, apenas 16 foram fenotipicamente positivos, em teste de tubo de vidro 131 foram positivos e em microplaca 151. O estudo feito por Ramachandran et al. (2016) também demonstra diferença de resultados entre os dois métodos, considerando o método utilizando placas de microdiluição mais confiável, pois foi mais sensível e específico, com alta precisão entre não formadores e formadores de biofilme.

A alta capacidade de formação de biofilme no setor de alimentos, e principalmente no de carnes, vem sendo estudado amplamente. Demoliner (2015) avaliou 69 isolados originários de carne de frango e bubalinos, dentre os isolados estavam presentes *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. e obteve como resultado 73,7% e 32% respectivamente, formadores de biofilme. Destacamos que em nosso estudo, também isolamos bactérias formadoras de biofilme, trazendo uma grande preocupação, uma vez que as enterobactérias são em sua maioria patogênicas ao homem.

A boa higienização dos materiais e as boas práticas na manipulação dos alimentos são fundamentais, pois o nosso estudo evidencia esta importância, pois a alta taxa de contaminação provavelmente seja devido a falta de higiene ou tratamento inadequado dos alimentos. Stocco (2017) também evidencia tal importância quando realizou uma pesquisa em frigorífico de processamento de

carne bovina na região de Campos Gerais – PR, onde coletou amostras de 25 pontos diferentes e em diversos setores como: armazenamento e refrigeração, pré-corte, desossa e fabricação, embalagem e expedição, e em cada local foram obtidas amostras de diversas origens como facas, maçanetas, armários de utensílios, mãos dos manipuladores, uniformes entre outros. Dez pontos de controle estavam contaminados com bactérias potencialmente formadoras de biofilme, demonstrando higiene insuficiente no local.

Em contrapartida, um estudo realizado no Rio Grande do Sul, avaliou o potencial de formação de biofilme de cepas de *E. coli* produtoras de Shiga-toxina previamente isoladas de fezes de bovinos. Cento e sessenta e cinco amostras foram avaliadas e nenhuma apresentou capacidade de formar biofilme, demonstrando uma grande variabilidade gênica dentro do gênero (MILLAN & TIMM, 2013). O presente trabalho demonstrou que os sorotipos de EHEC isolados são produtores de biofilme, indicando seu alto potencial de virulência, e sendo característica alarmante, pois as EHEC colonizam o cólon intestinal, e estão envolvidas em doenças como a Síndrome hemolítica urêmica (SHU) e diarreias sanguinolentas.

Apesar de seus malefícios para a indústria de alimentos, biofilmes são bem aceitos em alguns setores, por exemplo, em estações de tratamento de água e/ou efluentes há remoção organismos patogênicos e redução da quantidade de matéria orgânica na água e/ou efluentes através da interação com biofilmes (XAVIER et al., 2005). Biofilmes ainda podem ser utilizados na indústria de alimentos como embalagens, como demonstra a pesquisa desenvolvida por Pires (2017) que desenvolveu um filme acrescido de óleos essenciais que se mostrou eficiente com relação a preservação e outros fatores quando utilizado para embalar carnes. Estes estudos demonstram a eficiência dos biofilmes a favor do bem estar da população.

Para verificar se a suplementação de glicose interfere na formação de biofilme, os resultados obtidos neste estudo foram submetidos a ANOVA e Teste T. Foi observado que a suplementação de glicose não apresentou diferença significativa na formação do biofilme bacteriano (Figura 5).

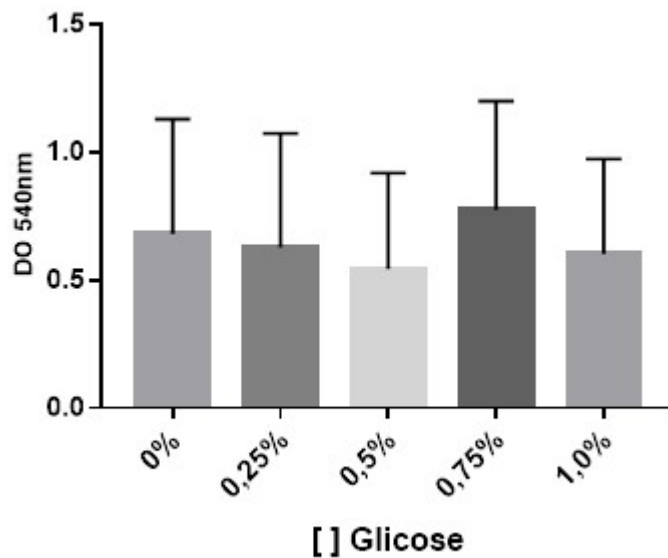


Figura 5 - Médias das Densidades Ópticas (DO) dos biofilmes formados por *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de carne moída bovina, frente a diferentes concentrações de glicose.

Algumas pesquisas avaliaram a formação de biofilme com adição de glicose, como o de Rodrigues et al., (2009) que analisaram cepas de *Salmonella* Heidelberg isoladas de carcaças de um abatedouro avícola e cultivadas em caldo TSB com diferentes suplementações de glicose. Em incubação sem suplementação todas as amostras produziram biofilme, em concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% as amostras continuaram a formar biofilme e em altas concentrações (2% a 4% de glicose), várias amostras não formaram biofilme e as demais, fracamente formadoras. Os resultados encontrados em nosso estudo diferem dos encontrados por Rodrigues et al., (2009), pois a suplementação não interferiu na formação de biofilme. Ainda percebemos em nosso estudo que a bactéria tem potencial de formar biofilme com eficiência sem suplementação alguma.

Quanto ao crescimento bacteriano (Figura 6), observou-se que a suplementação deste carboidrato não interferiu no desenvolvimento, pois quando comparada ao controle negativo, não há diferença significativa, ou seja, não aumentou o potencial de crescimento bacteriano nas diferentes concentrações deste carboidrato.



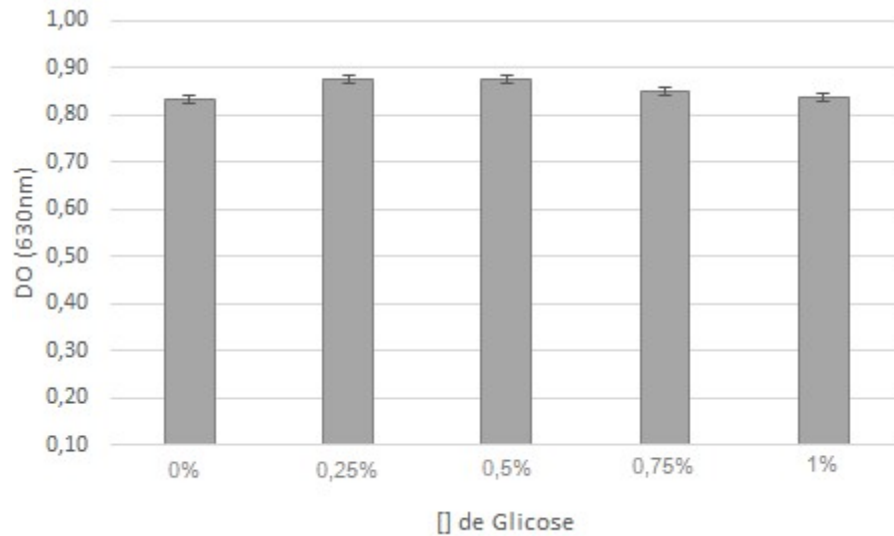


Figura 6 - Médias das Densidades Ópticas (DO) do crescimento bacteriano *Salmonella* spp. e *E. coli* isoladas de carne moída bovina, frente a diferentes concentrações de glicose.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo feito por Furtado (2015), onde foi utilizada suplementação de glicose para o crescimento bacteriano de *Staphylococcus* spp. oriundos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas e, comparando ao controle negativo, não apresentou diferenças significativas, não potencializando o crescimento dos isolados nas diferentes concentrações.

## **5 Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, 62,86% das amostras estavam contaminadas. Foi possível verificar que 20% das amostras de alimentos estudadas apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., e coliformes termotolerantes EHEC, EPEC estão presentes em 31,43%, 5,72% e 14,28% respectivamente.

Observou-se que todos os isolados bacterianos foram identificados como formadores de biofilme no teste em placa de microdiluição, e a suplementação do meio de cultura com glicose não interferiu na produção deste polissacarídeo.

Os alimentos investigados estão, em sua maioria impróprios para consumo, por apresentarem bactérias envolvidas em Doenças Transmitidas por Alimentos, oferecendo risco a saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira de Indústria Exportadora de Carne Bovina, 2017. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/Exportacoes.aspx>>. Acesso em 04 abr. 2017.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.

ANTUNES, A. R. et al. Pesquisa de coliformes em carne bovina comercializada no município do Vale do Jequitinhonha - MG. **Revista Higiene Alimentar**. v. 30, n. 256/257. Maio/jun., 2016.

BABAPOUR, E. et al. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 6, n. 6, p. 528 - 533. 2016.

BARCELOS et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em saladas contendo maionese comercializadas em restaurantes localizados no município de JI – Paraná, Rondônia, Brasil. **Journal of Health Sciences**, v. 18, n. 3, p. 159 – 162. 2016.

BEZERRA, A. C. D.; REIS, R. B.; BASTOS, D. H. M. Microbiological quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá - MT, Brazil and vendor hygiene – awareness. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n. 2, p. 520 - 524. abr./jun., 2010.

BRANDA, S. S. et al. Biofilms: The matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 20-26, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)> Acesso em: 8 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=4317>> Acesso em: 8 out. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Brasília, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf> Acesso em: 11 jul. 2018.

CAMILLOTO, G.P.; et al. Desenvolvimento e avaliação de filme incorporado com triclosan para inibição de *Staphylococcus* spp. em queijo mussarela fatiado. **Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora. MG: EPAMIG. v. 62, n. 357. 2007.

CANHIZARES, T. M. **O papel da *Escherichia coli* na retocolite ulcerativa**. 2017. 56f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/151404>>. Acesso em: 11 out. 2018.

CARDOSO, R. C. V. et al. Avaliação da eficiência de agentes sanificantes para mãos de manipuladores de alimentos em serviços de refeição coletiva. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 41, p. 17-22, 1996.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465 - 1468. Santa Maria, 2005.

CAVALIN, P. B. B. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreiogênica em linguiças suínas frescas. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 39, n. 4, p. 1533 – 1546. Londrina, Jul./Ago. 2017.

CHAVANT, P. et. al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 68, p. 605-612. 2007.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRET, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. **Journal of Clinical Microbiology Tennessee**. v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

Centers for Disease Control. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice: United States and Canada. **Journal of the American Medical Association**, v. 282, p. 726-728, ago. 1999.

CHAGAS, V. P. S. et al. Investigação de *Salmonella* spp. em produtos cárneos de matadouros frigoríficos do estado do Pará no período de 2014 – 2015. **Revista de Higiene e Sanidade Animal**. v. 11, n. 1, p. 1 – 7, jan./mar., 2017.

CHANDRAN, A.; MAZUMDER A. Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animals hosts. **Appl Environ Microbiol**. v. 79, n. 23, p. 7371 - 7380. Dez. 2013.

CHESCA, A. C. et al. Equipamentos e utensílios de unidades de alimentação e nutrição: um risco constante de contaminação das refeições. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 114/115, p. 20-23. 2003.

CHRISTENSEN, B. E., CHARACKLIS, W. G. Physical and Chemical properties of biofilms. In: Characklis W. G., Marshall K. C., editores. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; p. 93 - 130. 1990.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **The International Journal of artificial organs**. n. 11, v. 28, p. 1062- 1068, 2005.

DOLINGER, E. J. O Von. Contaminação microbiológica de alimentos comercializados em restaurantes de auto-serviço de Itumbiara – GO. **Revista Biotemas**. v. 4, n. 23. Dezembro, 2010.

DAMER, J. R. S. *et al.* Contaminação de carne moída bovina por *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Revista **Contexto e Saúde**, v. 14, n. 26, p. 20-27, 2014.

DIAS, P. A. *et al.* Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. São Paulo. **Arquivos Instituto biológico**. v. 75, n. 3, p. 359 – 363. Setembro, 2008.

DEMOLINER, F. **Formação de biofilme e perfil de resistência antimicrobiana e a sanitizantes de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. de corte de carne de frango e bubalino**. 2015. 89f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

FARMER, J.J. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. **Manual of Clinical Microbiology**. 6 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995.

FAÚLA, L. L. *et al.*, Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e identificação de patótipos diarréogênicos entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 24, n. 1, p. 108 - 115. Abr./jun., 2017.

FERREIRA, R. S.; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG. **Revista Digital FAPAM**. Pará de Minas, n. 3, p. 37–61. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 2002. 424 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 620p.

FREITAS, L. H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FREEMAN, D.J.; FALKINER F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**. n. 42, p. 872 - 874. 1989.

FURTADO, K. C. **Determinação do perfil de sensibilidade e avaliação da formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de um hospital de ensino em Pelotas, RS, Brasil**. 2015. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela. 2001.

GILBERT, P., ALLISON, D. G., MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal Applied Microbiology**. n. 92, p. 98 - 110. 2002.

GÓES, R. C. T; JÚNIOR, A. M. B.; AQUINO, L. C. L. Perfil microbiológico de carnes bovinas in natura comercializadas em feiras livres. **Revista Higiene Alimentar**. V. 26, n. 204/205, p. 121 – 125. 2012.

GOMES, A. F. A et al. Avaliação microbiológica de carnes bovinas em diferentes estabelecimentos comerciais. **Caderno de Ciências Agrárias**. v. 9, n. 3, p. 95 – 100. 2017.

GOMES, T. S. **Pesquisa de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em amostras de alface e água de coco comercializadas em Campina Grande - PB**. 2015. 21f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de graduação em Farmácia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2015.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**. v. 7, p. 1034-1043. 2009.

HOOD S. K., ZOTTOLA, E. A. **Biofilms in food processing**. Food Control. v. 6, n. 1, p. 9 -18, 1995.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Crescimento microbiano em biofilmes. Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008. Disponível em: < <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=354> >. Acesso em: 30 nov. 2017.

JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-72. 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução Eduardo Cesar Tondo et al. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KYAW, C.M. Biofilmes Microbianos. Disponível em <[www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm](http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm)>. Acesso em 12 de outubro de 2008.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, Paul C.;

JUNIOR, W. C. W. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 564p.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v. 26, p. 170-178, 2005.

LEMUNIE, A. Q.; WEBER, L. D. Análise microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializada em sanduicherias tipo trailer em Cascavel/PR. In: 2<sup>o</sup> Congresso Nacional de Medicina Veterinária FAG. 2018. Cascavel. Anais do Congresso Nacional de Medicina Veterinária FAG, 2018.

LUZ, J. R. D. et al. Qualidade microbiológica da carne moída comercializada em Natal, Rio Grande do Norte. **Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**. v. 2, n. 2. 2015.



MACEDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica.

**Revista Fármacos & Medicamentos**. v. 2, n. 7, p. 19 - 24, nov./dez., 2000.

MACHADO E. C. et al. Monitoramento da qualidade microbiológica em uma indústria mineira de pão de queijo. **Higiene Alimentar**. v. 18, p. 59-63. 2004.

MALONE, J. A.; CALDWELL, D.E. Evaluation of surface colonization kinetics in continuous culture. **Microbiology Ecology**. v.9, n. 4, p. 299 - 305. 1983.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.

MARCHI, P.G.F. **Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp), Campus de Jaboticabal, 2006. Disponível em: <<http://javalı.fcav.unesp.br/sgcd/Home/download/pgtrabs/mvp/m/2703.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

MARTINELLI FILHO, A. M.; GRANER, M.; CRUZ, V. F. Microbiologia da carne moída: 3. Avaliação da qualidade em diferentes épocas do ano. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, v. 32, n. 1. 1975.

MENDONÇA B. S.; SILVA C.S. Qualidade microbiológica da carne moída comercializada na cidade Cariacica, ES. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 26, n. 208/209, p. 101-105. 2012.

MILAN, C.; TIMM, C. D. Avaliação da capacidade de formar biofilme de *Escherichia coli* produtoras de shiga toxina. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 31 - 33, jan./jun. 2013.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 10, p. 2760 – 2764. 1998.

MÜRMAN, L., et. al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 529-534. 2008.

NASCIMENTO, M. V. D. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída fresca comercializada no mercado central em Campina Grande – PB. **Revista Saúde e Ciência**. v. 3, n. 1, p. 56 - 68. 2014.

NEITZKE, D. C.; ROZA, C. R.; WEBER, F. H. Segurança dos alimentos: contaminação por *Salmonella* sp. no abate de suínos. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 20. Campinas, 2017.

NESPOLO, N. M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e suscetibilidade a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 81, n. 3, p. 209 - 217. São Paulo. 2014.

NIKOLAEV Y.A.; PLAKUNOV V. K. Biofilm – “city of microbes” or na analogue of multicellular organisms. **Mikrobiologija**. v. 76, n. 2, p. 149 - 163. 2007.

OLIVO, R.; OLIVO, N. **O mundo das carnes**. 3. ed. Criciúma: Varela, 2006.

OLIVEIRA, M. A. et al. Enterobacteriaceae: Bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n. 25. Garça, Jul. 2015.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 69, n. 3, p. 277 - 284. São Paulo, 2010., 2001.

ORNELLAS, L. H. **Técnica Dietética: Seleção e Preparo de Alimentos**. 7 ed. Revisada e ampliada. São Paulo: Atheneu

PÁDUA, G. T. ***Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) multirresistente em carcaças de bovinos**. 2018. 38f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2018. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8942>. Acesso em: 20 out. 2018.

PATERSON, D. L. Infections due to other of members of the Enterobacteriaceae, Including management of multidruging-resistant Strains. **Goldman's Cecil Medicine**. v. 2, p. 1874 – 1877. 2012.

PENG, J. S.; TSAI W. C.; CHOU C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77. p. 11-18. 2002.

PIGARRO, P. M. A.; SANTOS, M. **Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina- PR**. 2008. 54f. Monografia (Especialização em higiene e inspeção de produtos de origem animal) Universidade Castelo Branco, 2008. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwig3oKJ5JLYAhUGHZAKHVNxDcsQFggoMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.periodicos.unc.br%2Findex.php%2Fsma%2Farticle%2Fdownload%2F468%2F393&usg=AOvVaw2HdNm1ronwJcukoFik5Hnk>. Acesso em: 7 dez. 2017.

PINHEIRO, M. B.; WADA, T.C.; PEREIRA, C. A. M. Análise Microbiológica de Tábuas de Manipulação de Alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos – SP. **Simbio-Logias**, São Paulo, v. 3, n. 5. 2010.

PIRAGINE, K. O. **Aspectos higiênicos e sanitários do preparo da merenda escolar na rede Estadual de Ensino de Curitiba**. 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

- PIRES, J. R. A. **Desenvolvimento de biofilmes para indústria alimentar**. 2017. 112f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- RAMACHANDAN, R.; SANGEETHA, D. Phenotypic evaluation of biofilm formation in human pathogenic bacterial isolates from diferente clinical specimens. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. v. 4. 2017.
- RODRIGUES, K. L., et. al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v. 34, p. 297-299. 2004.
- RODRIGUES, L. B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n. 3, p. 225 - 230, 2009.
- ROSADO, M. S. **Biofilme de Enterococcus faecium em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes**. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- ROSSI, C. F. **Condições higiênico–sanitárias de restaurantes comerciais do tipo self-service de Belo Horizonte-MG**. 2006. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.
- SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **American Society for Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.
- SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- SIDHU J.P.; AHMED, W.; HODGERS L.; TOZE S. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 79, n. 1, p. 328 - 335. Jan. 2013.

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

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 4, n. 13, p. 1675 - 1683. Rio de Janeiro. 2008.

SILVA, Jr. E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5ª ed. São Paulo: Varela, 2002.

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, Valéria Christina Amstalden; SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Varela, 2001.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**. v. 17, n. 4, p. 439 - 47. 2000.

SOUZA, C. O. et al. *Echerichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 7, n.2, p. 79 - 91. 2016.

STOCCO, C. W. **Controle de qualidade microbiológico em frigorífico**. 2017. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa. 2017.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; VLAHOVIC, M. S. A. modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Jornal of microbiology Methods**, v. 40, n.2, p. 175-179, 2001.

TERRA N. N.; FRIES L. L. M. A qualidade da carne suína e sua industrialização. In: Conferência Virtual Internacional sobre Qualidade de Carne Suína, Informe Técnico EMBRAPA. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2000. v. 1, p.1-5. Disponível em:

<[http://www.cnpqa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais00cv\\_terra\\_pt.pdf](http://www.cnpqa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais00cv_terra_pt.pdf)>.  
Acesso em: 6 dez. 2017.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 706p.

TRENTIN, D.S., GIORDANI, R.B., MACEDO, A. J. Biofilmes Bacterianos Patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113 – 238. 2013.

WATNICK P, KOLTER R. Minireview: Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 182, n. 10, p. 2675 – 2679. 2000.

WINKELSTROTER, L.K.; TEIXEIRA, F.B.; SILVA, E.P.; ALVES, V.F.; MARTINIS, E.C. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microbial Ecology**. 2013.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, 2005. Disponível em:  
<<https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/biofilmes.pdf>.> Acesso em: 20 set. 2018.