

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Departamento de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**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**

**Fernanda Demoliner**

**Pelotas, 2015**

**FERNANDA DEMOLINER**

**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**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra  
Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Lameiro Rodrigues

Pelotas, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D383f Demoliner, Fernanda

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 / Fernanda Demoliner; Eliezer Ávila Gandra, orientador; Kelly Lameiro Rodrigues, coorientadora. - Pelotas, 2015.  
90 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Adesão bacteriana. 2. Aço inoxidável. 3. Cloro orgânico.  
4. Quaternário de amônio. 5. Antibiótico. I. Gandra, Eliezer Ávila, orient.  
II. Rodrigues, Kelly Lameiro, coorient. III. Título.

CDD: 641.1

**FERNANDA DEMOLINER**

**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**

Dissertação aprovada com requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 20 de fevereiro de 2015-03-17

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (Orientador)  
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Eduarda Hallal Duval  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Nunes Moreira  
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho  
aos meus pais e às minhas irmãs,  
por todo o apoio e incentivo.**

## **Agradecimentos**

A **Deus**, por estar sempre me iluminando, guiando e dando força para vencer os desafios de cada dia.

A minha amada família, especialmente aos meus pais, **Armando e Inês**, por sempre me apoiarem e me incentivarem para que eu continuasse estudando não medindo esforços para que isso fosse possível; às minhas irmãs, **Cristiana e Adriana**, pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos; aos meus cunhados, **Luciano e Cleverton**, por estarem dispostos a me ajudar sempre que precisei.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, obrigada pelo espaço e recursos disponibilizados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (**FAPERGS**) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao orientador Prof. **Eliezer Ávila Gandra**, pela confiança e orientação e pelos ensinamentos que me transmitiu durante estes dois anos de trabalho.

Às Professoras **Kelly L. Rodrigues e Jozi F. Mello** pela co-orientação, pela disposição em me ajudarem sempre que necessário, pelo incentivo, pelo carinho e amizade.

À professora **Eduarda Duval** e a **Flávia Voloski** por gentilmente cederem os isolados de sua pesquisa para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

À amiga **Denise**, pela ajuda e ensinamento no início do meu trabalho.

A estagiária **Karen**, pela disposição em sempre me ajudar e acima de tudo pela amizade e companhia durante esse tempo no laboratório.

Aos meus queridos amigos “os mudinhos”, **Júlia, Laura, Rogério, Thais e Katharine**, pelos momentos de descontração, de diversão e confraternização que tornaram esses dois anos mais alegres e inesquecíveis. Agradeço especialmente a **Júlia**, pelos momentos agradáveis de convívio no laboratório, pelas palavras amigas nos momentos de angústia, pelo apoio e incentivo.

À **Mayra**, minha amigona e colega desde a graduação, obrigada pela tua amizade, pelo carinho e por sempre estar ao meu lado.

As colegas de laboratório **Greici e Josipela** pela parceria, pela ajuda e companheirismo.

À professora **Simone**, pela disposição em sempre tirar as minhas dúvidas.

Às funcionárias e técnicas do laboratório, **Joana, Renata, Rosi, e Evelise**, pelos ensinamentos e ajudas.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Se o desejo de alcançar a meta estiver vigorosamente vivo dentro de nós, não nos faltarão forças para encontrar os meios de alcançá-la e traduzí-la em atos”.*

*Albert Einstein*



## RESUMO

Demoliner, Fernanda. **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.** 90f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A adesão e formação de biofilmes de micro-organismos a superfícies de equipamentos e utensílios no processamento de alimentos resulta em grave problema para a indústria, pois atua como fonte de contaminação do alimento, por serem mais resistentes a ação de sanitizantes e antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp., provenientes de cortes de carnes de frango e de búfalo de frigoríficos e do comércio varejista da região sul do Rio Grande do Sul, de formar biofilmes em superfície de placas de poliestireno e aço inoxidável, bem como verificar a resistência destes a sanitizantes e a antimicrobianos. Foram utilizados 69 isolados bacterianos provenientes de cortes de carnes de frango e de búfalo, sendo 19 de espécies de *Listeria* e 50 de *Pseudomonas* spp. Os isolados foram avaliados quanto à formação de biofilme em microplacas de poliestireno e em corpos de prova de aço inoxidável. Os isolados formadores de biofilme em aço inoxidável foram testados quanto à ação de sanitizantes: cloro orgânico e quaternário de amônio (200 ppm) e submetidos ao teste de resistência antimicrobiana. A formação biofilme em microplacas de poliestireno foi de 73,7 % para isolados de *Listeria* spp. e de 32 % para isolados de *Pseudomonas* spp. Todos os isolados de *Listeria* spp. e 72% dos isolados de *Pseudomonas* spp. formaram biofilmes em corpos de prova de aço inoxidável. O quaternário de amônio foi mais eficaz que o cloro orgânico na redução de biofilme de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. Os isolados pertencentes ao gênero *Listeria* apresentaram maior resistência à penicilina (94,7 %), à clindamicina (84,2 %), à oxacilina (73,7 %) e à cefepime (57,9 %), sendo que 94,7 % foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos. Meropenem foi o antimicrobiano menos efetivo para *Pseudomonas* spp. Também foram encontrados 84% dos isolados de *Pseudomonas* spp. multirresistentes a antimicrobianos. Conclui-se que os isolados provenientes de cortes de carnes de frango e de bubalino foram formadores de biofilme em poliestireno e aço inoxidável e apresentaram resistência a antimicrobianos, o que confere riscos a saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** adesão bacteriana; aço Inoxidável; cloro orgânico; quaternário de amônio; antibiótico.

## ABSTRACT

Demoliner, Fernanda. **Formation biofilm and antibiotic resistance profile and sanitizers isolates of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* spp. of chicken cuts and buffalo.** 90f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The adhesion and microorganisms biofilm formation on surfaces of equipment and utensils in food processing results in a serious problem for the industry because it acts as a source of contamination and is less resistant to sanitizers and antimicrobial action. The objective of this study was to evaluate the ability of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* spp. present in chicken and buffalo meat, to form biofilms on the surface of polystyrene plates and stainless steel as well as verify their resistance to sanitizers and antimicrobials. Sixty nine bacterial isolates were used, 19 species of *Listeria* and 50 species of *Pseudomonas* spp. The isolates were evaluated to their biofilm formation capacity in polystyrene microplates and stainless steel. Isolated stainless steel biofilm formers were tested for sanitizing action of organic chlorine and quaternary ammonium (200 ppm) and submitted antimicrobial resistance testing. The ability to form biofilm on polystyrene microplates was 73,7 % in isolates of *Listeria* spp. and 32 % for *Pseudomonas* spp. All isolates of *Listeria* spp. and 72 % of *Pseudomonas* spp. showed the ability to form biofilm on stainless steel specimens. The sanitizing organic chlorine and quaternary ammonium were effective to reduce *Listeria* spp. and *Pseudomonas* spp. biofilm formation in stainless steel. Quaternary ammonium was more effective than organic chlorine to reduce *Listeria* spp. biofilm formation from buffalo meat. Isolates belonging to the *Listeria* genus showed greater resistance to penicillin (94.7 %), clindamycin (84.2 %), oxacillin (73.7 %) and cefepime (57.9 %), and 94.7 % were resistant to two or more antimicrobials. Meropenem was the less effective antimicrobial for *Pseudomonas* spp. It was also found that 84 % of isolates of *Pseudomonas* spp. were multiresistant to antimicrobials. The isolates from chicken meat cuts and buffalo were biofilm-forming on polystyrene and stainless steel and were resistant to antimicrobials, which gives risk to consumer health.

**Keywords:** bacterial adhesion; stainless steel; organic chlorine; quaternary ammonium; antibiotic.

## Lista de figuras

<b>Figura 1 -</b> Processo de formação de biofilme.....	51
---	----

## Lista de tabelas

**Artigo - Formação de biofilme em poliestireno e em aço inoxidável e resistência a sanitizantes e a antimicrobianos em isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp.**

<b>Tabela 1 -</b> Origem dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. e de <i>Listeria</i> spp. provenientes de carnes de frango e bubalino do sul do Brasil.....	61
<b>Tabela 2 -</b> Classificação da formação de biofilme dos isolados de <i>Listeria</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp provenientes de carnes de frango e bubalino do sul do Brasil.....	65
<b>Tabela 3 -</b> Eficiência dos sanitizantes, cloro orgânico e quaternário de amônio, na remoção de biofilmes em corpos de prova de aço inoxidável, formados por <i>Listeria</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes de carnes de frango e bubalino do sul do Brasil.....	67
<b>Tabela 4 -</b> Resistência a antimicrobianos de isolados de <i>Listeria</i> spp. provenientes de carne de frango e bubalino do sul do Brasil.....	70
<b>Tabela 5 -</b> Resistência a antimicrobianos de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. provenientes de carne de frango e bubalino do sul do Brasil.....	73

## Sumário

1 Introdução geral .....	15
2 Projeto de pesquisa.....	18
3 Revisão de Literatura .....	45
3.1 Carnes de Frango e bubalino .....	45
3.2 <i>Pseudomonas</i> spp. ....	46
3.3 <i>Listeria</i> spp.....	47
3.4 Biofilmes bacterianos .....	49
3.4.1 Etapas de formação de biofilme .....	51
3.4.2 Resistência de biofilme a sanitizantes .....	53
3.5 Resistência antimicrobiana.....	54
4. Relatório do trabalho de campo .....	57
<b>Artigo: Formação de biofilme em poliestireno e em aço inoxidável e resistência a sanitizantes e a antimicrobianos em isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Listeria</i> spp.</b> .....	<b>58</b>
RESUMO.....	58
INTRODUÇÃO .....	58
MATERIAL E MÉTODOS .....	60
Isolados bacterianos .....	60
Avaliação da capacidade de formação de biofilme. ....	61
Avaliação da formação de biofilme em superfície de aço inoxidável.....	62
Avaliação da remoção de biofilme sob a ação de sanitizante .....	63
Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
Capacidade de formar biofilme em microplaca de poliestireno .....	65
Capacidade de formar biofilme em aço inoxidável .....	66
Remoção de biofilme sob ação de sanitizantes .....	67
Susceptibilidade a antimicrobianos .....	70
CONCLUSÕES .....	73
REFERÊNCIAS .....	74
5. Conclusões.....	80

6. Referência .....	81
---------------------	----

## 1 Introdução geral

O Brasil é um país de destaque em relação a produção de carne, principalmente da carne de frango, pois é o terceiro maior produtor mundial, sendo destaque na exportação do produto (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2014). Além disso, o consumo de carne de búfalo vem crescendo de maneira constante e significativa, sendo que a bubalinocultura de corte está conquistado cada vez mais espaço na pecuária brasileira (BRASIL, 2014).

Apesar dos avanços tecnológicos e científicos, principalmente na indústria de carnes, ainda se observa a ocorrência de doenças de origem alimentar, devido à ingestão de produtos cárneos contaminados por micro-organismos patogênicos. A carne é um alimento ideal para o desenvolvimento de micro-organismos, devido a sua composição em nutrientes, atividade de água elevada e ao pH próximo à neutralidade. As bactérias que se desenvolvem na carne podem estar ligadas aos processos de deterioração ou até mesmo a transmissão de doença (DOULGERAKI et al., 2012).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Listeria* são micro-organismos que apresentam a capacidade de multiplicação e sobrevivência em temperaturas de refrigeração, sendo possível, portanto, o seu desenvolvimento em câmaras frias ou ao longo da cadeia do frio, na qual a carne é comumente armazenada (JAY, 2005; TODD & NOTERMANS, 2011). *Pseudomonas* spp. são bactérias potencialmente deteriorantes, sendo responsáveis por grande parte das alterações sensoriais da carne, fazendo com que diminua a sua vida comercial (ARSLAN et al., 2011). Dentre as bactérias patogênicas, *Listeria monocytogenes* tem grande relevância por ser responsável pela listeriose, doença grave que possui alta taxa de mortalidade em grupos de risco (20-30%) (GÓMEZ et al., 2014; MUHTEREM-UYAR et al., 2015).

As indústrias de alimentos, principalmente as de carnes, ainda enfrentam vários problemas relacionados aos processos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios, muitas vezes relacionados com a ineficácia destes produtos e dos processos de higienização na remoção de micro-organismos destes ambientes. Essas falhas podem tornar estes locais

focos de contaminação cruzada. Isso ocorre, principalmente devido à formação de biofilmes bacterianos nos equipamentos e ambiente da linha de produção. Nesses locais, a formação de biofilme é muito favorável pelo fato de ser um ambiente com acúmulo de material orgânico e inorgânico, o qual é utilizado pelos micro-organismos para sua fixação na superfície e consequente desenvolvimento de biofilmes, onde as comunidades bacterianas podem se estabelecer e resistirem por longos períodos (UHITIL et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010).

O termo biofilme é usado para descrever a forma de vida sésil das bactérias, caracterizado pela adesão destas a suportes sólidos, sendo extremamente vantajoso para todas as espécies de micro-organismos, pois fornece proteção contra adversidades como desidratação e colonização por bacteriófagos. Biofilmes são mais resistentes do que as células em seu estado planctônico, podendo sobreviver aos processos de sanitização e a alta concentração de antimicrobianos. A presença destes biofilmes em superfícies de contato com alimentos pode impactar negativamente na segurança dos alimentos (BOARI et al., 2009; VAN HOUDET & MICHIELS, 2010).

Bactérias provenientes de alimentos de origem animal, como *Pseudomonas* spp. e *Listeria monocytogenes* apresentam capacidade de formação de biofilme e, conseqüentemente, resistência ou até multirresistência a um grande número de produtos químicos utilizados na sanitização de indústrias, bem como a agentes antimicrobianos comumente utilizados em seres humanos. Essa resistência pode ocorrer devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e no tratamento de animais (ARIAS & CARRILHO, 2012). A ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes a agentes antimicrobianos pode levar ao desenvolvimento de doenças, requerendo um tratamento mais complexo, maior tempo de internação hospitalar e conseqüentemente maiores gastos para a saúde pública (NEIDELL et al., 2012).

É de fundamental importância conhecer as características dos micro-organismos que podem estar presentes nos alimentos e processos alimentícios, como a capacidade destes de formar biofilmes e a resistência a antimicrobianos, principalmente em alimentos de origem animal como carnes



de frango e bubalinos, afim de que possam ser tomadas medidas preventivas e corretivas no decorrer da cadeia alimentícia para garantir que não tragam danos a saúde do consumidor.

A adesão do biofilme a superfícies presentes no processamento de alimentos pode variar em função das condições ambientais, da espécie formadora, do tipo de superfície e dos processos de higienização a que são submetidas estas superfícies, sendo necessários, para um melhor entendimento do processo e para escolha correta de substancias sanificantes. São necessários estudos mais aprofundados e específicos relacionados a capacidade de formação do biofilme de determinados micro-organismos, como *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp., em determinadas superfícies como o aço inoxidável, na presença de diferentes soluções sanificantes.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp., provenientes de cortes de carnes de frango e de búfalo de frigoríficos e do comércio varejista da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, de formar biofilmes em material de poliestireno e aço inoxidável, bem como verificar a resistência aos sanificantes utilizados na indústria de alimentos e a antimicrobianos de uso comum em humanos e animais.

**2 Projeto de pesquisa**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



**PROJETO DE PESQUISA**

**CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES E PERFIL DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS BACTERIANOS DE CARNE DE  
BUBALINO**

**FERNANDA DEMOLINER**

**Pelotas, 2014**

**CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES E PERFIL DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS BACTERIANOS DE CARNE DE  
BUBALINO**

**Orientador:** Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

**Co-Orientadoras:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Lameiro Rodrigues

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jozi Fagundes de Mello

**Mestranda:** Fernanda Demoliner

**Pelotas, 2014**

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 Carne de Frango .....	9
2.1.1 Mercado interno e externo.....	9
2.1.2 Microbiologia da carne de frango .....	9
2.1.2.1 <i>Salmonella</i> spp.....	9
2.1.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2.1.2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.1.2.4 <i>Pseudomonas</i> spp. ....	14
2.2 Biofilmes Bacterianos .....	14
2.3 Micro-organismos resistentes a Antibióticos .....	14
3 HIPÓTESE .....	17
4 OBJETIVOS .....	18
4.1 Objetivo geral .....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	19
5.1 Isolados Bacterianos .....	20
5.2 Delineamento experimental.....	20
5.3 Métodos.....	21
5.3.1 Análises microbiológicas .....	21
5.3.1.1 <i>Samonella</i> spp.....	21
5.3.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	22
5.3.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	22
5.3.2 Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes .....	20
5.3.3 Avaliação do Perfil de Resistência/Sensibilidade a Antibióticos.....	20
5.4 Avaliação dos Resultados .....	20
6 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	25

## RESUMO

Este projeto tem por objetivo verificar a capacidade de formação de biofilmes e a resistência a antibióticos de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos da região sul do Rio Grande do Sul. Para isto serão utilizados 25 isolados de *Pseudomonas* spp. e 25 de *Listeria* spp., todos provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos, do banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os isolados serão submetidos à avaliação da capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno através do método proposto por Djordjevic et al., (2002), com modificações e a teste de resistência/sensibilidade a antibióticos de acordo com protocolo proposto pelo manual *Clinical and Laboratory Standards Institute*, utilizando-se a técnica de disco-difusão. As análises microbiológicas serão realizadas no Laboratório de Análise Microbiológicas da Faculdade de Nutrição da UFPel. Os resultados serão avaliados através da análise de variância seguida do teste de *Tukey*.

**Palavras chave:** Búfalo. *Listeria* spp. *Pseudomonas* spp.

## 1 INTRODUÇÃO

A bubalinocultura é uma atividade em crescimento no Brasil, apresentando vantagens em relação à criação de bovinos. Os búfalos (*Bubalus bubalis*) são bons produtores de leite e carne, resistentes às enfermidades e adaptam-se às diferentes condições ambientais (RAMOS, 2003). A produção de carne de búfalos nos últimos anos vem passando por grandes modificações, desde os conceitos de produção animal e melhoramento genético, até aqueles relacionados à identificação, caracterização e garantia de qualidade da carne.

A carne é um meio de cultura ideal para o desenvolvimento de micro-organismos e é ainda mais propícia à contaminação quando as condições higiênico-sanitárias do ambiente e do manipulador são inadequadas, assim como a temperatura de armazenagem, a higiene e a conservação dos utensílios e equipamentos (COUTINHO et al., 2007). Sendo assim, o nível de contaminação por bactérias é um fator determinante da qualidade da carne.

*Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. são micro-organismos que apresentam a capacidade de multiplicação e sobrevivência em temperaturas de refrigeração, sendo possível, portanto, o seu desenvolvimento e resistência em câmaras frias ou ao longo da cadeia de frio, na qual a carne é comumente armazenada. O crescimento de *Pseudomonas* spp. em carnes pode representar 90% da microbiota total, sendo um importante indicador do processo de deterioração (CHUNG et al., 2000). Além disso, *Pseudomonas* spp. é uma das principais bactérias causadoras de infecção hospitalar em indivíduos imunocomprometidos. *Listeria monocytogenes* é a principal espécie de *Listeria* que pode causar doença em humanos. É um patógeno transmitido por alimentos, de grande importância para a saúde pública, uma vez que pode causar uma das mais severas infecções alimentares, que é a listeriose.

*Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. dentro de matadouros-frigoríficos ou na indústria de alimentos podem colonizar superfícies de equipamentos e utensílios e formar biofilmes, aumentando, dessa forma, a probabilidade de contaminar a linha de produção e os alimentos ali produzidos, e conseqüentemente o consumidor.

Biofilme consiste em um complexo ecossistema microbiológico formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sejam bactérias, fungos e/ou protozoários de modo isolado ou em combinação, associados a seus produtos extracelulares, constituindo uma matriz de polímeros (COSTA, 1999; MACEDO, 2006; JAY, 2005; KYAW, 2008). As bactérias pertencem ao grupo dos micro-organismos mais frequentemente encontrados em biofilmes, pois apresentam elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares (NITSCHKE, 2006). Em um biofilme, as bactérias podem adquirir resistência a antimicrobianos, quando comparadas com células bacterianas livres.

Alguns micro-organismos podem tornar-se resistentes a fármacos antimicrobianos que são comumente usados no tratamento clínico de humanos e animais (TORTORA, 2005; ARIAS e CARRILHO, 2012). A presença de micro-organismos resistentes a antibióticos está diretamente relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças em animais. Cepas de bactérias multirresistentes podem ser responsáveis por diversos surtos e o arsenal terapêutico tem se tornado cada vez mais escasso. Em humanos, geralmente as infecções causadas por essas cepas são mais graves, aumentando os custos e o tempo do tratamento (FRANCO et al., 2010).

O presente estudo sobre a determinação da capacidade de formação de biofilmes e do perfil de resistência a antibióticos de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos, vem com o propósito de contribuir com informações relevantes visando minimizar os riscos microbiológicos na produção da carne de bubalinos da região sul do Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bubalinocultura

Os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) tiveram origem no sul da Ásia e atualmente encontram-se difundidos em todo o mundo. No ano de 2011, o número de búfalos no Brasil foi de 1,277 milhões de cabeças, representando um crescimento de 14,5% em relação a dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2002, o que demonstra que a bubalinocultura tem apresentado expansão significativa pelo país (IBGE, 2011). Neste mesmo período, a região Sul do país foi classificada como a quarta região com maior rebanho bubalino (IBGE, 2011).

A bubalinocultura já tem conquistado espaço na pecuária de corte brasileira, principalmente em função da rusticidade dos animais, bastante adaptados a solos de baixa fertilidade e terrenos alagadiços, onde algumas raças bovinas não apresentam a mesma produtividade (VAZ et al., 2003).

O búfalo é um animal que pode produzir carne de excelente qualidade. Antigamente, a utilização do búfalo estava ligada a trabalho e tração, e com isso os animais se tornavam adultos e somente no final da sua vida produtiva eram levados ao abate, gerando um conceito errôneo em relação à qualidade da carne desse animal. A carne de búfalo obtido de animais abatidos precocemente, com idade inferior a 24 meses e peso vivo em torno de 450 kg, apresenta ótima qualidade sensorial e é uma alternativa para o consumo de carnes vermelhas, que tem boa aceitação no mercado. A garantia da qualidade desse produto permite uma comercialização por preços maiores, com melhor remuneração aos produtores e comerciantes (OLIVEIRA, 2005).



## 2.2 Microbiologia da carne

### 2.2.1 *Pseudomonas* spp.

*Pseudomonas* spp. são bastonetes Gram-negativos, aeróbios, móveis, pertencente à família Pseudomonadaceae. São comumente encontradas em solo e em outros ambientes naturais (TAVARES, 2002; TORTORA, 2005). São micro-organismos psicotróficos que possuem uma melhor capacidade de crescimento em ambiente refrigerado. São considerados bactérias deteriorantes, que crescem na superfície do alimento. Esses micro-organismos psicotróficos se desenvolvem na faixa de 0 a 15°C, sendo a temperatura ótima de 15 a 30°C (SILVA et al., 2002).

O gênero *Pseudomonas* está amplamente difundido na natureza, compreendendo mais de 100 espécies, sendo a de maior importância a *Pseudomonas aeruginosa*, por se tratar de um patógeno secundário e oportunista com grande capacidade invasiva e toxigênica (JAY, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* tem sido responsável pela maioria dos casos de doença infecciosa em humanos, como: infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, nos idosos e nas crianças (TAVARES, 2002).

*Pseudomonas* são os principais responsáveis pelas alterações das carnes refrigeradas e conservadas em condições de aerobiose. Em alimentos com alta atividade de água mantidos em temperatura de refrigeração, estas bactérias são responsáveis por causar alteração no produto (JAY, 2005).

O crescimento de *Pseudomonas* na carne é acompanhado de intensa atividade proteolítica, resultando em acréscimo do nível de nitrogênio não protéico, principalmente sob a forma de peptídeos e amônia. A amônia apresenta toxicidade ao homem e sua formação durante o processo de deterioração da carne, está relacionada a processos enzimáticos (ANTUNEZ et al., 2006).

### 2.2.2 *Listeria* spp.

*Listeria* spp. é uma bactéria Gram-positiva, não esporulada, aeróbia e anaeróbia facultativa. É um micro-organismo móvel e apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase. Apresenta ampla distribuição ambiental, tendo sido isolada em águas de esgoto doméstico, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, solos, insetos, adubo orgânico, e em fezes de animais, inclusive de humanos. Pode também ser isolada em diversos produtos alimentícios, principalmente os de origem animal (FRANCO, 2004, JAY, 2005; TORTORA, 2005).

Sua ampla distribuição ambiental é favorecida pela capacidade de se desenvolver entre 0 e 44°C e sobreviver em alimentos congelados, embora sua faixa ótima de crescimento seja entre 30 e 37°C. Tolerância a pH extremos de 5 a 9, baixa atividade de água e concentrações de NaCl de 10% e até superiores. Este conjunto de características faz com que esta bactéria seja um patógeno considerado de grande importância na indústria de alimentos, devido a dificuldade de sua eliminação nas plantas de processamento de alimentos. Sua resistência pode ser potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica, que aliadas à habilidade do patógeno em produzir biofilmes, podem desencadear a colonização em superfícies de equipamentos e utensílios (UHITIL et al., 2004; MARKKULA et al., 2005).

O gênero *Listeria* possui seis espécies bem reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*; *L. innocua*; *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Destas, somente a *L. monocytogenes* e a *L. ivanovii* são importantes patógenos, a primeira normalmente relacionada com infecções em humanos e a segunda com abortos em animais (FORSYTHE, 2010). Em 2010, mais espécies de *Listeria* foram incluídas no gênero. São elas: *L. marthii* (GRAVES et al. 2010) e a *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al. 2010), conforme List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), 2014.

*L. monocytogenes* é a principal espécie de *Listeria* envolvida em doenças em humanos, capaz de causar listeriose (PETERKIN, 1991). A listeriose é considerada um sério problema de saúde pública devido a severidade dos sintomas e à alta taxa de mortalidade, em torno de 30%

(SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). A principal fonte de transmissão é a ingestão de alimentos contaminados. A doença inclui infecções severas, como septicemias, encefalite, meningite e aborto, com altas taxas de hospitalizações e mortes. Acomete principalmente pessoas idosas, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos, o chamado grupo de risco (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004; PERES et al, 2010; SILVA, 2010).

Segundo dados disponíveis pelo Center for *Disease Control and Prevention* - CDC (2010), *L. monocytogenes* provoca em média, 2.500 casos de listeriose por ano nos Estados Unidos, afetando, normalmente, indivíduos suscetíveis que se encontram no grupo de risco. Na Europa, a incidência de listeriose também tem aumentado desde 2000, sendo indivíduos com mais de 65 anos os maiores envolvidos em casos da doença (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

*L. monocytogenes* apresenta alta capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilmes impermeáveis, estabelece-se dentro de plantas e, no processamento de alimentos, aumenta a probabilidade de contaminações cruzadas e ambientais (JEONG e FRANK, 1994).

### **2.3 Biofilmes Bacterianos**

Biofilme pode ser definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas, dentro de uma matriz polimérica microbiana, aderida a uma superfície, inerte ou biológica, com taxa de crescimento e nível de transcrição diferente das bactérias livres (COSTERTON, 1999). A matriz polimérica é uma estrutura complexa, podendo ser composta por proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e heteropolímeros, tais como glicoproteínas, fosfolipídios, alginatos etc. Ela é responsável pela estrutura do biofilme e a sua composição determina algumas propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes. Uma de suas propriedades é a de tornar-se impermeável a certos agentes antimicrobianos, impedindo a sua difusão (HENTZER et al., 2001; BRANDA et al., 2005; O'TOOLE, 2009; ROHDE et al., 2009).

Do ponto de vista da segurança dos alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada em sua remoção. Se formados em materiais da linha de produção da indústria de alimentos, podem acarretar risco à saúde do consumidor (FLACH et al., 2005; CAIXETA, 2008). Além disso, pode ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida-de-prateleira dos produtos alimentícios (FLACH et al., 2005).

Na indústria de alimentos, os biofilmes podem se acumular em uma variedade de substratos como, por exemplo: aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, poliestileno de baixa densidade, policarbonato, entre outros. Convém ressaltar que o biofilme, quando submetido ao calor, pode cristalizar e formar depósitos ou crostas que são muito aderentes, protegendo novos micro-organismos e dificultando ainda mais os procedimentos de higiene (PARIZZI et al., 2004).

A formação de biofilme nos ambientes de criação e, especialmente, no abatedouro, pode proporcionar um reservatório de micro-organismos, uma vez que a estrutura do biofilme protege as bactérias da ação de agentes químicos empregados na desinfecção de equipamentos e utensílios ao longo da cadeia produtiva (SHI e ZHU, 2009; VESTBY et al., 2009).

## **2.4 Micro-organismos Resistentes a Antibióticos**

A resistência antimicrobiana é o resultado de uma complexa interação entre agentes antimicrobianos, micro-organismos e meio ambiente. A prevalência das infecções humanas e dos rebanhos animais e o consequente consumo dos medicamentos para tratá-las acarretam muitos erros de prescrição, relacionados a incerteza diagnóstica e ao desconhecimento farmacológico. É comum o não reconhecimento de que antimicrobianos são medicamentos específicos e, portanto, são eficazes para determinados agentes infecciosos (WANNMACHER, 2004). A utilização desordenada de antibióticos nas medicinas humana e veterinária tem causado sérios problemas com implicações econômicas, tanto em países desenvolvidos, como nos países em

desenvolvimento, dificultando a terapêutica, sendo atualmente um dos maiores problemas de saúde pública (RODRIGUES; FONSECA, 2006).

A grande disponibilidade de antimicrobianos acentua o uso abusivo desses medicamentos. E acarreta em resistência microbiana, a qual refere-se a cepas de micro-organismos que são capazes de multiplicar-se em presença de concentrações de antimicrobianos mais altas do que doses terapêuticas dadas a humanos e animais. O desenvolvimento de resistência é um fenômeno biológico natural que se seguiu à introdução de agentes antimicrobianos na prática clínica (WANNMACHER, 2004).

Bactérias provenientes de alimentos de origem animal apresentam, frequentemente, resistência a um grande número de agentes antimicrobianos comumente utilizados em seres humanos, sendo possível que essas bactérias resistentes sejam transferidas para humanos, através da cadeia alimentar (GHOSH e LAPARA 2007; HAMMERUM e HEVER, 2009). A ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes pode levar a doenças, requerendo um tratamento mais complexo (ACAR e ROSTEL2001; AUBRY et al., 2004).

A resistência antimicrobiana é uma das maiores preocupações para a saúde pública. *Pseudomonas* spp., principalmente da espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresentam resistência a diferentes classes de agentes antimicrobianos (CHUANCHUEN et al., 2002; ZAVASCKI et al., 2005). *Listeria* spp. são largamente susceptíveis às classes de antibióticos clinicamente relevantes contra as bactérias Gram-positivas. O primeiro registro de resistência de *L. monocytogenes* foi descrito em 1988 (POYART-SALMERON et al., 1990 em CHARPENTIER; COURVALIN, 1999). A partir disso tem se verificado um aumento do número de estudos comprovando a existência de cepas resistentes isoladas de alimentos, animais e humanos (FACINELLI et al., 1993; FRANCO et al., 1994; CHARPENTIER et al., 1995; CHARPENTIER; COURVALIN, 1999).

As cadeias produtivas de alimentos estão cada vez mais relacionadas a presença de isolados microbianos com multirresistência, fato preocupante que necessita de investigações e medidas corretivas urgentes.

### 3 HIPÓTESE

*Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. isolados de um frigorífico-matadouro de bubalinos da região Sul do Rio Grande do Sul apresentam a capacidade de formar biofilmes e são resistentes aos antibióticos de uso comum.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Verificar a capacidade de formação de biofilmes e resistência a antibióticos de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos da região sul do Rio Grande do Sul.

### 4.2 Objetivos específicos

Verificar a capacidade de formação de biofilmes de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos.

Verificar a capacidade de formação de biofilmes separadamente e em conjunto de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. de um frigorífico-matadouro de bubalinos sobre superfícies de aço inoxidável.

Verificar a capacidade de formação de biofilme separadamente e em conjunto de cada espécie, sob a ação de dois sanitizantes, Hipoclorito de Sódio e Quaternário de Amônia.

Identificar o perfil de resistência e sensibilidade a antibióticos de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. isolados de um frigorífico-matadouro de bubalinos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Isolados Bacterianos

Serão utilizados 25 cepas de *Listeria* spp. e 25 cepas de *Pseudomonas* spp., todos provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos, do banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da UFPel. Os isolados bacterianos serão mantidos congelados em meio de conservação, meio de Infusão Cérebro e Coração (BHI) e Glicerol, até o momento de análise. A recuperação das cepas será realizada em Caldo Triptona de Soja suplementado com Extrato de Levedura (TSB-YE).

As análises microbiológicas serão realizadas no Laboratório de Análise Microbiológicas da Faculdade de Nutrição da UFPel.

### 5.2 Delineamento experimental

**Tabela 1:** Delineamento experimental para avaliar resistência/sensibilidade a antimicrobianos e capacidade de formação de biofilmes de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos região sul do Rio Grande do Sul.

Estudos	Variáveis Independentes Isolados	Variáveis dependentes
[(25 isolados x 2 espécies microbianas) + 4 cepas padrão] x 2 análises = 108 determinações	<i>Pseudomonas</i> spp.	Resistência/sensibilidade a antibióticos
	<i>Listeria</i> spp.	Capacidade de formação de biofilme de cada espécie



**Tabela 2:** Delineamento experimental para avaliar a capacidade de formação de biofilmes em duas superfícies de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos da região sul do Rio Grande do Sul.

<b>Estudos</b>	<b>Variáveis Independentes</b>	<b>Variáveis dependentes</b>
[(25 isolados x 2 espécies microbianas) + 4 cepas padrão] x 2 superfícies x 2 análises = 216 determinações	<b>Isolados</b> <i>Pseudomonas</i> spp.  <i>Listeria</i> spp.	Capacidade de formação de biofilme de cada espécie, em superfície de aço inoxidável. Capacidade de formação de biofilme da associação das duas espécies em superfície aço inoxidável.

**Tabela 3:** Delineamento experimental para avaliar a remoção de biofilmes sob a ação de dois sanitizantes.

<b>Estudos</b>	<b>Variáveis Independentes</b>	<b>Variáveis dependentes</b>
[(25 isolados x 2 espécies microbianas) + 4 cepas padrão] x 2 sanitizantes x 2 análises = 216 determinações	<b>Isolados</b> <i>Listeria</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	Avaliar a capacidade de remoção de biofilme de dois sanitizantes. Avaliar capacidade de remoção de biofilme da associação das duas espécies sob ação de cada sanitizante.

**Sanitizantes**

Hipoclorito de Sódio  
Quaternário de Amônia

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes

Para avaliar a capacidade de formação de biofilmes, as cepas previamente isoladas serão recuperadas conforme descrito no item 5.1 deste projeto.

As bactérias serão avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno através do método proposto por Djordjevic et al. (2002), com modificações. Será preparado um inóculo padronizado pela escala de McFarland no valor de 0,5, correspondente a 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Para tanto, as bactérias serão cultivadas em TSA a 37 °C *overnight* e adicionadas a 9 mL de água destilada estéril. Após esta etapa, alíquotas de 20 µL do inóculo serão adicionadas a 180 µL de caldo TSB suplementado com 1 % de glicose e serão transferidas a 3 poços de uma placa de microtitulação de poliestireno. Além disso, no controle negativo serão transferidas alíquotas de 200 µL de caldo TSB suplementado com 1 % de glicose. Após o preenchimento de todos os poços, a suspensão será incubada a 37 °C por 24 horas (h). Decorrido este período, o excesso da suspensão bacteriana será removido e a placa será lavada três vezes com 200 µl de água destilada estéril. Após a lavagem as placas serão colocadas em estufa a 55-60 °C por 35 minutos (min) para fixação do material na placa.

Após a etapa de fixação, as placas serão coradas com 200 µL de cristal violeta a 1 % por 45 min. O excesso do corante será removido por sucessivas lavagens em água destilada por cinco vezes, até que não seja mais possível observar resquícios do corante na lavagem. Na etapa seguinte, após a lavagem do corante colocam-se as placas na estufa para nova fixação a 55-60 °C por 20 min para nova fixação. A análise quantitativa da produção de biofilme será realizada primeiramente pela adição de 200 µL de etanol 95 % durante 20 min para suspender novamente as células aderidas ao fundo da placa, seguida pela leitura da absorbância a 620 nm. A avaliação de formação de biofilme será realizada através da leitura de cada poço, utilizando-se leitor de placas e o valor médio dos poços será calculado, em triplicata.

### **5.3.2 Avaliação da formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável**

A avaliação quanto à capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável será através do método descrito no estudo SILVEIRA, (2010), com modificações. Os corpos de prova de aço inoxidável serão utilizados para a avaliação da formação de biofilme. Os corpos de prova serão imersos em solução de detergente neutro, por 1 h, e esfregados, sendo em seguida enxaguados com água destilada, pulverizados com álcool 70 % e secos a 60 °C. Após a higienização completa, serão autoclavados a 121 °C, por 15 min e mantidos em recipientes hermeticamente fechados até o momento do ensaio (ROSSONI et al., 2000).

As cepas dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp., serão semeados, separadamente e em conjunto, em 2 mL de caldo BHI e incubados a 37 °C, por um período de 24h. Um microlitro de cada cultura será adicionado em 99 mL de água peptonada 0,1 % estéril e então utilizada para a formação de biofilme sobre os corpos de prova. Os corpos de prova de aço inoxidável, esterilizados previamente, serão imersos nessa suspensão bacteriana por 180 min, em temperatura ambiente. A suspensão bacteriana será avaliada através da escala de MacFarland.

Após período de imersão, os corpos de prova serão lavados com 1 mL de água destilada estéril, a fim de remover as células fracamente aderidas. Em seguida será feita fricção com swabs umedecidos seguido da imersão dos mesmos em tubos de ensaio com solução salina 0,1 % seguido homogeneização em Vortex por 3 min. Diluições seriadas decimais serão realizadas para cada amostra, e uma alíquota de 20 µL de cada uma delas serão semeados em meio Ágar BHI, pelo método de gota (Silva, 2007). As placas serão incubadas a 37 °C, por 24 h para a contagem das colônias. Cada semeadura e contagem serão realizadas em duplicata.

### 5.3.3 Avaliação da remoção de biofilmes sob a ação de dois sanitizantes

A avaliação quanto à remoção de biofilme em superfície de aço inoxidável será através do método descrito no estudo de SILVEIRA (2010), com modificações.

O mesmo procedimento citado no item anterior será realizado para obtenção dos corpos de provas contendo biofilme dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp. Após procedimento de formação de biofilme, cada corpo de prova será imerso em solução de cloro orgânico a 200 ppm e quaternário de amônio a 200 ppm separadamente. O tempo de imersão será de 10 min.

Para controle, um corpo de prova do material contaminado com biofilme, será imerso em água peptonada a 0,1 %, não sendo colocada em contato com sanitizante.

As soluções de sanitizantes serão preparadas imediatamente antes da imersão dos corpos de prova contendo biofilme de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp.

Após período de 10 min de imersão, os corpos de prova serão retirados da solução sanitizante e colocados em contato por 3 segundos (s), com uma solução de Tween 2 % para neutralizar a ação do quaternário de amônio. Em seguida será feita fricção com *swabs* umedecidos em cada corpo de prova, seguido da imersão dos mesmos em tubos de ensaio com água salina 0,1 % seguido homogeneização em Vortex por 3 min. Diluições decimais seriadas serão feitas para cada amostra, sendo que 20 µL das mesmas serão semeados em meio Ágar TSA, pelo método de gota (SILVA, 2007), sendo as placas incubadas a 37 °C por 24 h para a contagem das UFC/cm<sup>2</sup>. Cada semeadura e contagem serão realizadas em duplicata.

### 5.3.4 Avaliação do Perfil de Resistência/Sensibilidade a Antibióticos

Para realizar avaliação do perfil de resistência/ sensibilidade a antibióticos, os isolados serão recuperados conforme descrito no item 5.1 deste projeto.

Os testes de resistência/sensibilidade aos antibióticos serão realizados de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI, utilizando-se a técnica de disco-difusão com adaptações. As culturas provenientes do TSA serão diluídas em solução salina estéril, até uma concentração equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Em seguida, com auxílio de swab estéril, as células serão inoculadas de forma homogênea na superfície de placas com Ágar Muller-Hinton (MH).

Após a secagem da superfície do ágar, serão colocados suportes com discos (Multidisco®, Laborclin, PR, Brasil) impregnados com os seguintes antibióticos: clindamicina (CLI, 2mg), cefalotina (CFL, 30mg), sulfazotrim (SUT, 25mg), ampicilina (AMP, 10mg), penicilina G (PEN, 10U), oxacilina (OXA, 1 mg), tetraciclina (TET 30mg), eritromicina (ERI, 15mg), gentamicina (GEN, 10mg), ceftioxina (CFO, 30mg), vancomicina (VAN, 30mg), ciprofloxacina (CIP, 5mg) e cloranfenicol (CLO, 30mg). Logo após, as placas serão incubadas por 18 h e passado esse período, irá se realizar a leitura dos testes, detectando-se a resistência ou sensibilidade a determinado antibiótico, de acordo com o tamanho dos halos formados ao redor do disco.

### 5.4 Avaliação dos resultados

Os resultados serão avaliados através de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de média de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.).



## 7 ORÇAMENTO

Quadro 2: Orçamento final do projeto.

Descrição	Quantidade	Valor Total
Microplacas de poliestireno com 96 cavidades com tampa	15	80,05
Cloreto de Sódio (NaCl)	Frasco de 500g	8,20
Ágar Triptona de Soja (TSA)	Frasco de 500g	207,70
Placas de petri descartável	200 placas	59,60
Extrato de Levedura (YE)	Frasco de 500g	173,25
Infusão Cérebro e Coração (BHI)	Frasco de 500g	218,65
Caldo Triptona de Soja (TSB)	Frasco de 500g	182,75
Dextrose	Frasco de 250g ou 500g	11,55
Filtro milipore	5 filtros	268,35
PBS (para preparação de tampão PBS) em pó, pH 7,2.	Uma caixa com 10	37,90
Metanol P. A.	1L	11,05
Etanol	1L	15,45
Cristal Violeta	1L	10,45
Papel toalha	1 Pacote	14,50
Caixa porta ponteira de 200 microlitros	5	21,00
Ponteiras de 200 microlitros	Pacote com 1000 unidades	6,45
Ponteiras de 300 microlitros	Pacote com 1000 unidades	15,9
Multidisco Gram + com antibióticos para antibiograma	3 Caixas	481,80
Multidisco Gram – com antibióticos para antibiograma	3 Caixas	481,80
<b>TOTAL</b>		<b>2.306,60</b>

## 8 REFERÊNCIAS

ACAR, J.; ROSTEL, B. Antimicrobial resistance: an overview. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 20, n. 3, p. 797-810, 2001.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent food borne infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.16, p.16-23, 2010.

ANTUNEZ, H.C.S.; COSTA, C.S.; SILVA, W.P.; SOARES, G.J.D. Efeito do ácido láctico e da radiação gama na eliminação de *Pseudomonas* spp. e na produção de amônia em peito de frango desossado resfriado. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.17, n.4, p.367-372, 2006.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

AUBRY-DAMON, H. et al. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 5, p. 873-879, May 2004.

BRANDA, S. S., et al. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**. Boston, v.13, n.1, p.20-26, 2005.

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

CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Listeria monocytogenes*. 2010. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens\\_pages/listeria\\_monocytogenes.htm](http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens_pages/listeria_monocytogenes.htm)>. Acesso em: 29 ago 2013.

CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; COURVALIN, P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Journal Infection Disease**, v.172, p.277–281, 1995.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.9, p.2103–2108, 1999.

CHUANCHUEN, R. ; NARASAKI, C.T.; SCHWEIZER, H.P. The Mex JKef-flux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of Triclosan. **J Bacteriol**, 184: 5036-5044, 2002.

CHUNG, M.; KO, Y.; KIM, W. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella Typhimurium* after electron beam and gamma irradiation of refrigerated beef. **J. Food Prot.**, v.63, n.2, p.162-166, 2000.



COUTINHO, E. P.; OLIVEIRA, A. T.; FRANCISCO, M. S.; SILVA, M. J. da; SILVA, J. M. S. S. da; AZEREDO, L. P. M. Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias da Manipulação e Comercialização de Carnes Vermelhas e Aves nas Feiras Livres dos Municípios de Bananeiras e Solânea, PB. II Jornada Nacional da Agroindústria, 2007.

COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. Seropédica, RJ. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiterplate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.6, p.2950. 2002.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, v.58, p.587-610, 2004.

FACINELLI, B.; ROBERTS, M. C.; GIOVANETTI, E.; CASOLARI, C.; FABIO, U.; VARALDO, P. E. Genetic basis of tetracycline resistance in food-borne isolates of *Listeria innocua*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.614-616, 1993.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 2010.

FRANCO, A. C. M.; FERNANDEZ, E. J. Q.; SAMPAYO, C. F.; OTERO, J. L. R.; RODRIGUEZ, L. D.; SAEZ, A. C. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.38, p.1655-1657, 1994.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, Ed. Atheneu - São Paulo, 2004.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, L. A. T. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. **Acta Veterinária Brasilica**, v.4, n.1, p.31-36, 2010.

GRAVES, LM.; HELSEL, LO.; STEIGERWALT, AG.; MOREY, RE.; DANESHVAR, MI.; ROOF, SE.; ORSI, RH.; FORTES, ED.; MILILLO, SR.; DEN BAKKER, HC.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, BD. *Listeria*

*marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 1280-1288. 2010.

GHOSH, S.; LAPARA, T. M. The effect of sub therapeutic antibiotic use in farm Animal son the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, London, v. 1, n. 3, p. 191-203, May 2007.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 48, n. 7, p. 916-921, Apr. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Produção da Pecuária Municipal.  
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm>>. 16 Fev. 2013.

JAY, J. M. Biofilmes. In:\_\_\_\_\_. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 6ed., 2005. p.673-674.

JEONG, D.K.; FRANK.; J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 100C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, p.576-586, 1994.

KYAW, C.M. **Biofilmes Microbianos**. 2008. 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 2013.

LECLERCQ, A. ; CLERMONT, D. ; BIZET, C. ; GRIMONT, PAD. ; LE FLÈCHE-MATÉOS, A. ; ROCHE, SM. ; BUCHRIESER, C. ; CADET-DANIEL, V. ; LE MONNIER, A. ; LECUIT, M. ; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 2210-2214, 2010.

LPSN. List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/listeria.html>. Acesso em: 15 fev 2014.  
MACEDO, J.A.B. **Biofilmes Bacterianos: Uma Preocupação Para a Indústria de Alimentos**. 18 de julho de 2006. Disponível em <[www.milknet.com.br](http://www.milknet.com.br)>. Acesso em 4 de setembro de 2013.

NITSCHKE, M. **Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos**. Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

OLIVEIRA, A.L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Rer Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughter house line demonstrated by the use of epidemiological markers. **J. Appl. Microbiol.**, v.94, p.826–835. 2003.

PARIZZI, S. Q. F., et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. Brazilian Archives of **Biology Technology**. vol.47, n.1, p.77-83. Mar. 2004.

PERES, N. D.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de *Listeriamonocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.973-979, 2010.

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURTIEU, A. L.; COURVALIN, P. Transferable plasmid mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **Lancet**, v.335, p.1422–1426, 1990.

RAMOS, A.A. **Contribuição ao Estudo de Bubalinos** – Palestras. Botucatu, 305 p. 2003.

RODRIGUES, D. P.; FONSECA, E. L. Resistência Antimicrobiana Manual de Procedimento para a Determinação da Suscetibilidade Antimicrobiana em Enterobactérias. **Instituto Oswaldo cruz/FIOCRUZ**- Laboratório de referência Nacional de Cólera e outra Enteroinfecções Bacterianas LRNCEB/LABENT. 2006.

ROHDE, H. et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**. 2009.

ROSSONI, E.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol.* v.1, n.61, p.81-5, 2000.  
SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**. v.20, n.9, p.407–13, 2009.

SILVA, J. A.; AZERÊDO, G. A.; BARROS, C. M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p.97-101, 2002.

SILVA, N.V.C.A.; et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ªEd. São Paulo, Varela. p.552, 2007.

SILVA, A. C. M. **A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeriamonocytogenes***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar) Universidade Tecnica de Lisboa, Lisboa. 2010.

SILVEIRA, J.G. **Investigação de *Listeria* sp. e microrganismos mesófilos totais em carcaças bovinas e em ambiente industrial de abatedouro frigorífico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TAVARES, T. M. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo “trailers” no centro e na periferia de goiânia/GO. **Revista de patologia tropical**. V.32, n.1, p.45-52, jan-jun, 2003.  
TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UHITIL, S., JAKSIC, S., PETRAK, T., MEDIC, H., GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. In cakes in Croatia. **Food Control**, v. 15, n.3, p.213-216, 2004.

VAZ, F. N; RESTLE, J.; BRONDANI I. L.; PACHECO, P. S. Estudo da carcaça e da carne de bubalinos do Mediterrâneo terminados em confinamento com diferentes fontes de volumoso. **Ver. Bras. Zootec**, v.32, p.393-404, 2003.

VESTBY, L. K.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L. L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. **BMC Veterinary Research**. v.5, n.20, 2009.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de Antibióticos e Resistência Microbiana: Uma Guerra Perdida? **Uso Racional de Medicamentos:Temas Selecionados**. V.1 n.4. Brasília, Março de 2004.

ZAVASCKI AP, CRUZ RP, GOLDANI LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. **J Hosp Infect**, 59:96-101, 2005.

### 3 Revisão de literatura

#### 3.1 Carnes de frango e bubalino

O padrão de consumo de alimentos vem mudando nas últimas décadas, com consumidores cada vez mais cientes dos atributos de qualidade dos alimentos, os quais incluem não só aspectos nutricionais e sensoriais, mas também segurança dos alimentos. Neste contexto, a demanda do consumo de carne de frango vem crescendo nos últimos tempos, e sua produção vem assumindo destaque no comércio mundial de carnes (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2007).

No Brasil, a produção de carne sempre foi uma atividade importante para a economia. Hoje o país é destaque em relação a produção de carne de frango, pois é o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Em 2013, a produção de carne de frango chegou a 12,3 milhões de toneladas, sendo destaque na exportação do produto. Além disso, teve um alto consumo *per capita* no ano de 2013 de 41,8% (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2014).

O consumo de carne bubalina vem crescendo de maneira constante e significativa, sendo que a bubalinocultura de corte está conquistando cada vez mais espaço na pecuária brasileira (BRASIL, 2014). A carne bubalina é uma excelente fonte de proteína com alto valor biológico, além de ser macia e suculenta, com baixo teor de gordura e colesterol (ABCB, 2001). Entretanto, estas boas características da carne bubalina, não são ainda conhecidas por boa parte da população (JORGE, 2005), sendo que no Brasil, aproximadamente 90% da carne de búfalo é comercializada como carne bovina (CORRÊA & TRAMOSO, 2004).

Com o aumento da exigência do consumidor em relação a qualidade higiênico-sanitária da carne, a atenção dos produtores de carne está sendo focada na melhoria da qualidade microbiológica e segurança dos alimentos. Produtos cárneos estão frequentemente associados a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), uma vez que a carne é um alimento com ampla variedade de nutrientes e alta atividade de água, o que a torna um

ambiente favorável para o crescimento e propagação de diversos micro-organismos deteriorantes e patogênicos (RIVAS et al., 2003; RANGEL et al., 2005, JAY, 2005). A qualidade microbiológica da carne crua é resultado do estado fisiológico do animal no momento do abate, processamento, transporte, preservação e condições de armazenamento (DOULGERAKI et al., 2012).

Bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, em conjunto com bactérias deteriorantes, como *Pseudomonas* spp., crescem predominantemente em biofilmes de superfícies de processamentos, sendo de difícil remoção, levando a graves problemas de higiene e perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos (SOFOS & GEORNARAS, 2010).

### **3.2 *Pseudomonas* spp.**

O gênero *Pseudomonas* spp. pertence à família *Pseudomonadaceae* e é composto por bastonetes Gram negativos aeróbios, não formadores de esporos, móveis devido à presença de flagelos polares, sendo catalase e oxidase positivos. São bactérias nutricionalmente versáteis, capazes de utilizar ampla variedade de substratos e de se multiplicarem em temperaturas de refrigeração (SILVA et al., 2002; BALASUBRAMANIAN et al., 2013).

O gênero *Pseudomonas* está amplamente difundido na natureza, distribuídos no solo, água, plantas e animais (incluindo os seres humanos). Compreende mais de 100 espécies, sendo a de maior importância *Pseudomonas aeruginosa*, por se tratar de um patógeno secundário e oportunista com grande capacidade invasiva e toxigênica (JAY, 2005; BALASUBRAMANIAN et al., 2013). Essa bactéria tem sido responsável por causar bacteremia em pacientes imunocomprometidos e vítimas de queimadura, além de infecções urinárias, respiratórias, pneumonia e diversos outros tipos de infecções adquiridas em hospitais, principalmente por pacientes de unidade de tratamento intensivo. É uma bactéria considerada mais frequente em infecções hospitalares podendo apresentar inclusive resistência a

diferentes antimicrobianos, o que muitas vezes torna difícil o tratamento destas infecções (SPENCER, 1996; TAVARES, 2003).

Representa o grupo de micro-organismos mais frequente em alimentos frescos, tanto de origem animal quanto vegetal. Possui intensa atividade metabólica, degradando proteínas, gorduras, carboidratos e outros substratos, além de produzir pigmentos, causando alterações nas características químicas e sensoriais. *Pseudomonas* spp. são bactérias de deterioração comumente encontrada na indústria de alimentos. Sua presença em níveis elevados resulta na redução da vida de prateleira dos produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis (MAIA et al., 2009).

Essa bactéria também apresenta resistência a uma ampla variedade de condições físicas como capacidade de se multiplicar mesmo sob temperatura de refrigeração e em elevadas concentrações de corantes e sais. Por isso são consideradas os principais responsáveis pelas alterações das carnes refrigeradas e conservadas em condições de aerobiose (JAY, 2005; PIRNAY et al., 2005).

O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne é acompanhado de intensa atividade proteolítica, resultando em acréscimo do nível de nitrogênio não protéico, principalmente sob a forma de peptídeos e amônia. A amônia apresenta toxicidade ao homem e sua formação durante o processo de deterioração da carne, está relacionada a processos enzimáticos (ANTUNEZ et al., 2006).

O gênero *Pseudomonas*, principalmente da espécie *aeruginosa*, apresenta alta resistência a uma grande número de agentes antimicrobianos, estando associadas a persistentes tratamentos de infecções hospitalares e até mesmo a mortalidade (JAY, 2005; PIRNAY et al., 2005; WANG et al., 2009).

### **3.3 *Listeria* spp.**

O gênero *Listeria* é, atualmente, composto por dez espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii* e *L. weihenstephanensis* (ZHANG et al.,

2007; HALTER, NEUHAUS & SCHERER, 2013). Dentre estas espécies, somente duas, são potencialmente patogênicas: *L. monocytogenes*, associada a infecções em seres humanos e animais, e *L. ivanovii*, que ocasionalmente causa doença em humanos e em animais (GUILLET et al., 2010).

O gênero *Listeria*, pertencente à família *Listeriaceae*, apresentam-se na forma de bastonetes curtos, possuindo aproximadamente 0,4-0,5 µm de diâmetro e 1-2 µm de comprimento. É uma bactéria Gram positiva, não esporulada, aeróbia e anaeróbia facultativa, móvel por flagelos peritríquios e capaz de invadir e replicar-se em fagócitos, células epiteliais intestinais e hepatócitos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; DUSSURGET, PIZARRO-CERDA e COSSART, 2004). Sua ampla distribuição ambiental é favorecida pela capacidade de se desenvolver entre 0 e 44 °C, embora sua faixa ótima de crescimento seja entre 30 e 37 °C. Tolerância a pH extremos de 5 a 9, baixa atividade de água e concentrações de NaCl de 10 % e até superiores (MONTVILLE e MATTHEWS, 2008).

*Listeria* spp. tem a capacidade de se desenvolver em alimentos congelados e de se multiplicar em temperatura de refrigeração. Assim é frequentemente encontrada em alimentos refrigerados como carnes frescas, frango, frutos do mar, frutas, laticínios e vegetais (TODD e NOTERMANS, 2011; LOMONACO et al., 2013).

*L. monocytogenes* é responsável por causar listeriose em humanos, uma doença de grande impacto para a saúde pública. Os principais grupos de riscos para ocorrência dessa doença são indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com câncer, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), transplantados, gestantes, crianças e idosos (TODD et al., 2011; MUHTEREM-UYAR et al., 2015).

Os sintomas causados pela infecção variam desde sintomas leves, como gripe e diarreia, a sintomas mais graves, caracterizados por septicemia e meningoencefalites. Nas mulheres grávidas a infecção pode ser transmitida para o feto, além de causar aborto. As infecções em humanos são raras, mas são de grande importância, uma vez que se encontram associadas a elevadas taxas de mortalidade em grupos de risco (20-30%) (GÓMEZ et al., 2014; MUHTEREM-UYAR et al., 2015).



Existem treze diferentes sorotipos descritos para essa bactéria, sendo os sorotipos 1/2a, 1/2b, e 4b os responsáveis pela maioria dos casos humanos de listeriose (PAN, BREIDT & GORSKI, 2010). O sorotipo 4b é o mais relacionado aos surtos de doenças, principalmente em mulheres grávidas (FORSYTHE, 2010; JAMALI & THONG, 2014).

*L. monocytogenes* tem sido frequentemente encontrada em plantas de processamento de alimentos, sendo de grande importância na indústria de alimentos, devido à dificuldade de sua eliminação. Sua resistência pode ser potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica, que aliadas à habilidade do patógeno em produzir biofilmes, podem desencadear a colonização em superfícies de equipamentos e utensílios (MARTIN et al., 2011; FERREIRA et al., 2014).

Vários estudos comprovaram que *L. monocytogenes*, isoladas de carnes e derivados cárneos, apresentam resistência até mesmo multirresistência a um grande número de antimicrobianos usados no tratamento de humanos, o que pode comprometer a eficácia desses tratamentos clínicos e aumentar a severidade da doença (DAUPHIN et al., 2001; CONTER et al., 2009; GARRIDO et al., 2009; PESAVENTO et al., 2010; DOMÉNECH et al., 2015).

### **3.4 Biofilmes bacterianos**

Biofilme é um conjunto de micro-organismos de vida séssil, caracterizado pela adesão desses a superfícies sólidas, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos micro-organismos em ambientes com condições adversas (HOUDT & MICHIELS, 2010).

A estrutura de um biofilme está diretamente relacionada às condições de crescimento, local de adesão, ambiente de formação, natureza do material, disponibilidade de nutrientes, hidrodinâmica, espécies de micro-organismos presentes, grau de contaminação microbiana, entre outros (LUDENSKY, 2003). A água é de grande significância, podendo chegar a 97 % da matriz do

biofilme. Os micro-organismos correspondem apenas a uma pequena parte, em torno de 2 a 5 %, embora excretam substâncias poliméricas que predominam na matéria orgânica da massa do biofilme. As substâncias de exopolissacarídeos representam de 70 % a 95 % da matéria orgânica da massa seca do biofilme, e essa substância permite a fixação da bactéria a várias superfícies em seu ambiente natural para sobrevivência (FLEMMING & WINDENGER, 1993).

Essa matriz de exopolissacarídeos é a responsável pela estrutura, morfologia, coesão e integridade funcional do biofilme. Além disso, esta matriz de exopolissacarídeo é composta por polissacáridos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (OLIVEIRA, BRUGNERA & PICCOLI, 2010). A matriz contém o conjunto de células que é necessário para manter a comunicação entre as células. Também permite a formação de três dimensões estruturais que dão as bactérias aumento do acesso a nutrientes e vantagens da vida multicelular (FAVRE-BONTÉ et al., 2010; STORZ et al., 2012).

O DNA extracelular liberado de células bacterianas, forma uma importante parte da matriz de exopolissacarídeos, influenciando tanto na estrutura do biofilme, como na adesão inicial (HARMSSEN et al., 2010; THEERTHANKAR et al., 2010). Além disso, no interior de um biofilme, há troca de material genético entre os micro-organismos, disseminando mais facilmente os fatores de virulência como, por exemplo, a resistência a antimicrobianos (JEFFERSON, 2004). A capacidade das bactérias de trocar informação entre as células e de adaptar sua fisiologia quando expostas a mudanças provocadas no ambiente é um mecanismo que ainda não foi totalmente esclarecido. Esse fenômeno de comunicação entre as células denomina-se *quorum-sensing* (QS).

QS desempenha um papel importante na formação de biofilme. É um sistema de sinalização intercelular, em que as bactérias comunicam e regulam a expressão gênica, liberando pequenas compostos chamados autoindutores no ambiente (GARMYN et al., 2009; FAVRE-BONTÉ et al., 2010). Devido ao seu papel em vários processos regulatórios ele pode servir como um alvo importante (GANGULY et al., 2011; STORZ et al., 2012; SHARMA et al., 2014). O conhecimento sobre a formação

de biofilme e QS estão resultando em identificação de novos alvos para a terapêutica contra a infecção causadas por bactérias, como *P. Aeruginosa* (SHARMA et al., 2014).

Na indústria de alimentos, a presença de biofilme é muito favorável pelo fato de ser um ambiente que apresenta acúmulo de material orgânico e inorgânico, sobre o qual comunidades bacterianas podem se desenvolver. Biofilmes pode se tornar fortemente aderido a superfície e parte deles podem se desprenderem e contaminar outras superfícies ou até mesmo alimentos. Células bacterianas em biofilmes são mais resistentes do que as células em seu estado planctônico, podendo sobreviver a processos de sanitização e a alta concentração de antimicrobianos (LEWIS, 2007; CHAVANT et al., 2007).

### 3.4.1 Etapas da formação de biofilme

O processo de formação de biofilme pode ser descrito em cinco etapas (Figura 1): 1) adesão das células bacterianas à superfície; 2) formação da matriz extracelular de exopolissacarídeo; 3) formação de microcolônias e início da maturação do biofilme; 4) formação do biofilme maduro com uma estrutura tridimensional contendo células em grupos cercados por canais que permitem o transporte de água e nutrientes e a remoção de resíduos; e 5) desprendimento e dispersão das células bacterianas do biofilme e início da formação de um novo biofilme (LASA et al., 2006).

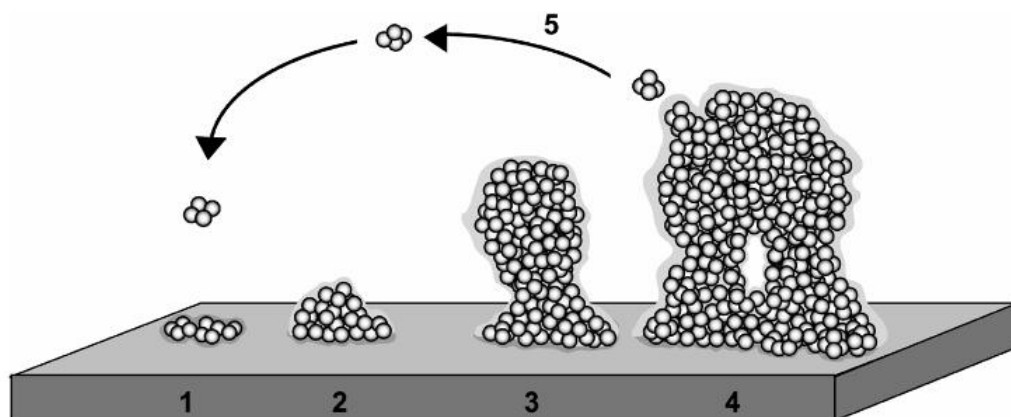


Figura 1: Processo de formação de biofilme.

Fonte: LASA et al., 2006.

A formação de biofilme inicia-se quando micro-organismos, em seu estado de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir às superfícies. Existem vários fatores que são responsáveis por influenciar esse processo, como dito anteriormente, pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum-sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura (OULAHAL et al., 2008).

Após aderir à superfície, as bactérias começam a se multiplicar emitindo sinais químicos que intercomunicam as células bacterianas. Uma vez que a intensidade do sinal exceder um nível determinado, os mecanismos genéticos subjacentes de produção de exopolissacarídeos são ativados (APARNA & YADAV, 2008).

Posterior ao processo de adesão da bactéria à superfície inicia-se o processo de maturação do biofilme. Esse processo pode levar de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias (HEYDORN et al., 2000). O biofilme maduro pode ser constituído por uma única camada de células em exopolissacarídeo poroso ou em multicamadas de microcolônias formadas em conjunto com exopolissacarídeo e intercaladas com canais de água (CHMIELESWSKI & FRANK, 2003).

Na indústria de alimentos, biofilmes bacterianos são considerados um problema, principalmente na área de processamento de alimentos, como de aves e carnes vermelhas. Uma vez estabelecido o biofilme, esse pode desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (UHITIL et al., 2004; CHEN et al., 2007).

Biofilmes são altamente resistentes, podendo chegar de 10-1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos e a sanitizantes. Por isso são difíceis de serem eliminados, tornando-se um grande desafio para a indústria alimentar (DAVIES et al., 2003; OUYANG et al., 2012).

Estudos tem mostrado a capacidade que *L. monocytogenes* e *P. Aeruginosa* têm de aderir e formar biofilmes em várias superfícies, tais como aço inoxidável, borracha, vidro, polietileno e polipropileno usados em fábricas de processamento de alimentos (VANHAECKE et al., 1990; SMOOT & PIERSON, 1998; SILVA et al., 2008; BERRANG et al. 2010; KADAM et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010; GHADAKSAZ et al., 2015).

### 3.4.2 Resistência de biofilme a sanitizantes

Biofilmes apresentam maior resistência à ação de sanitizantes do que às células em seu estado planctônico (CHAVANT et al., 2007). Esta resistência pode ser devido a dificuldade que os agentes sanitizantes têm de aderir a complexa estrutura de expolissacarídeo e também às alterações no meio (pH, presença de matéria orgânica) que afetam a atividade dos sanitizantes. (MORTON et al., 1998).

Sanitizantes ou desinfetantes são definidos como formulações com substâncias que apresentam efeito letal sobre micro-organismos não esporulados. Os sanitizantes mais utilizados em superfícies de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos brasileira são aqueles que possuem princípio ativo dos grupos: quaternário de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, e compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados (MISNITÉRIO DA SAÚDE, 1988).

Os mecanismos de ação do cloro envolvem sua interação com as proteínas da membrana celular, formando compostos N-cloro tóxicos. Estes são responsáveis por danos à membrana citoplasmática bacteriana, dificultando o transporte de carboidratos e aminoácidos; reagem com o DNA, oxidam as bases dos ácidos nucleicos e paralisam a síntese protéica; provocam a descarboxilação oxidativa de aminoácidos formando nitrilas e aldeídos; inibem o consumo de oxigênio e afetam a fosforilação oxidativa (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

Os compostos de amônio quaternário são agentes tensoativos catiônicos amplamente usados como sanitizantes nas indústrias de alimentos. O mecanismo de ação destes compostos está relacionado à inibição enzimática, desnaturação protéica e alteração da permeabilidade celular (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

Os agentes sanitizantes devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes a níveis aceitáveis, como por exemplo, 2 Unidades Formadoras de Colônia por centímetro quadrado

(UFC/cm<sup>2</sup>) de micro-organismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização (APHA, 1992).

Parikh et al. (2009) avaliaram a eficácia de três sanitizantes (a base ácido láctico, hipocloritode sódio e a base de quaternário de amônio) em biofilmes compostos por *L. monocytogenes* e constataram que todos os sanitizantes foram eficazes na redução desse biofilme, sendo que o quaternário de amônio foi o mais eficaz contra os biofilmes desenvolvidos. Outros estudos, que avaliaram o mesmo patógeno, encontram resistência a agentes sanitizantes, como composto por cloro e quaternário de amônio (SOOMERS et al., 2004; PAN et al., 2006; SHI & ZHU, 2009; BELESSI et al., 2011).

Resistência a sanitizantes de biofilmes de *Pseudomonas* spp. também foi encontrada em outros estudos, como por exemplo, no de Taylor et al. (1999) o qual mostram que o tratamento de *P.aeruginosa* com sanitizante a base de cloro resultou em redução de biofilme em período de 5 minutos. Wirtanen et al. (2001) constataram, em seu estudo, que sanitizante a base de cloro não foi eficaz na eliminação de biofilme de *Pseudomonas* spp. em superfícies de aço inoxidável, no entanto, desinfetantes a base de tensoativos mostram-se eficazes na eliminação do biofilme.

### **3.5 Resistência antimicrobiana**

A resistência aos agentes antimicrobianos e suas possíveis implicações para a saúde pública tem levado a uma maior preocupação quanto ao seu uso (DOYLE et al., 2013). O uso intensivo na medicina humana e animal para terapia, e como promotor de crescimento em animais, são considerados uma das principais razões para o desenvolvimento de resistência bacteriana (ARIAS, et al., 2012).

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 26 de 09 de julho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas estão proibidos como aditivos alimentares em rações animais (BRASIL, 2009).

Bactérias provenientes de alimentos de origem animal apresentam frequentemente resistência a um grande número de agentes antimicrobianos comumente utilizados em seres humanos e animais. A ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes pode levar a doenças, requerendo um tratamento mais complexo (GHOSH & LAPARA 2007; HAMMERUM & HEVER, 2009).

Bactérias podem ser classificadas como sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. São classificadas como resistentes, as bactérias que crescem *in vitro*, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral, e são consideradas sensíveis aquelas bactérias que não crescem nestas concentrações (MANTILLA et al., 2008).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, principalmente da espécie *Pseudomonas aeruginosa* vêm adquirindo importância como agente de infecção hospitalar devido à crescente resistência a diferentes classes de antimicrobianos, causando dificuldades no tratamento de suas infecções (ZAVASCKI et al., 2005). Além de expressar resistência natural, a resistência adquirida em isolados pertencentes a este gênero é de grande importância clínica, podendo levar a um aumento do custo do tratamento, maior tempo de internação hospitalar e mortalidade (POOLE et al., 2005).

A primeira cepa resistente a antimicrobianos de *L. monocytogenes* foi isolada em 1988 (CHARPENTIER et al., 1995). Desde então, cepas resistentes foram encontradas em alimentos, superfícies de contato com alimentos na indústria, e também isoladas de humanos (GOMÉZ et al., 2014). *Listeria* spp. são largamente susceptíveis às classes de antimicrobianos clinicamente relevantes contra as bactérias Gram positivas (POYART-SALMERON et al., 1990; CHARPENTIER; COURVALIN, 1999). A partir disso, outros estudos comprovaram a existência de diversas cepas resistentes isoladas de alimentos, animais e humanos (FACINELLI et al., 1993; FRANCO et al., 1994; CHARPENTIER et al., 1995; CHARPENTIER & COURVALIN, 1999).

Lecuit & Leclerq (2012) indicaram que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de humanos são sensíveis para um grande número de antimicrobianos, que incluem penicilina, ampicilina, amoxicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina, o co-trimoxazole, vancomicina e imipenem.

Além disso, a maioria das cepas de *L.monocytogenes* apresentaram resistência natural às fluoroquinolonas e cefalosporinas, especialmente de terceira e quarta geração, tais como cefotaxima e cefepima, e também a fosfomicina, oxacilina e licosamides. Os clínicos utilizam, para o tratamento de infecções invasivas, tipicamente aminopenicilinas (por exemplo, a ampicilina ou amoxicilina) em combinação com aminoglicosídeo, como gentamicina.

Balsalobre & Hernández-Godoy (2004) sugeriram que espécies de *Listeria*, como *L.innocua*, e outras bactérias Gram positivas, frequentemente presentes em carnes e produtos derivados, mostraram resistências antimicrobianas, sugerindo que essa resistência ocorra devido a uma transferência de informação genética a partir de uma espécie para outra, através de vários mecanismos.

Em um biofilme, as bactérias são capazes de tolerar maiores concentrações de antimicrobianos, podendo ser até 1000 vezes mais resistentes, quando comparadas às mesmas células planctônicas, embora os mecanismos envolvidos nesta resistência sejam ainda pouco conhecidos. Dentre os possíveis mecanismos, acredita-se que possa haver a inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares, ou a ineficiência da droga em decorrência de taxas de crescimento muito lentas no interior dos biofilmes, dificultando a ação dos antimicrobianos (LEWIS, 2007).



#### 4 Relatório do trabalho de campo

Inicialmente havia-se optado por analisar somente isolados de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. provenientes de carnes de bubalino de um frigorífico-matadouro de bubalino da região Sul do Rio Grande do Sul. No entanto, surgiu a oportunidade de realizar um estudo mais abrangente e aumentar o número de isolados bacterianos, incluindo micro-organismos provenientes de carcaças e cortes de frango de um frigorífico abatedouro de aves da região Sul do Rio Grande do Sul e do comércio varejista da mesma região.

Optou-se por manter as mesmas análises, que foram: Avaliação da capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno e em corpos de prova de aço inoxidável e avaliação da resistência a sanitizantes e a agentes antimicrobianos. No entanto, optou-se por analisar cada espécie de isolados separadamente e não mais em conjunto em função do material disponível e do ajuste da metodologia.

## ARTIGO

### **Formação de biofilme em poliestireno e em aço inoxidável e resistência a sanitizantes e a antimicrobianos em isolados de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp.**

#### RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a capacidade de isolados de *Pseudomonas* spp. e de *Listeria* spp., provenientes de cortes de carnes de frango e búfalo de frigoríficos e do comércio varejista da região sul do Rio Grande do Sul, de formarem biofilmes em poliestireno e em aço inoxidável e verificar a resistência destes a sanitizantes e a antimicrobianos. Os isolados formadores de biofilme em aço inoxidável foram testados quanto a ação dos sanitizantes cloro orgânico e quaternário de amônio. Os isolados de *L. monocytogenes* formaram biofilme em material de poliestireno e aço inoxidável. Dos isolados de *Pseudomonas* spp., 32 % e 72 % formaram biofilme em poliestireno e aço inoxidável, respectivamente. A ação do sanitizante quaternário de amônio foi mais efetivo do que o cloro orgânico na redução de biofilmes em superfície de aço inoxidável. A multirresistência a agentes antimicrobianos foi elevada para *Listeria* spp. (94,7 %) e para *Pseudomonas* spp (84 %). Desse modo, os isolados provenientes de cortes de carnes de frango e de bubalino foram formadores de biofilme em poliestireno e aço inoxidável e resistentes a antimicrobianos, o que confere riscos a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Adesão bacteriana, quaternário de amônio, cloro orgânico, carne de frango, carne de búfalo.

#### INTRODUÇÃO

Com o aumento da exigência do consumidor em relação a qualidade higiênico-sanitária da carne, a atenção dos produtores está sendo focada na melhoria da qualidade microbiológica e segurança dos alimentos. Produtos cárneos estão frequentemente associados a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), uma vez que a carne é um alimento ideal para o desenvolvimento de bactérias. Bactérias que se

desenvolvem na carne podem estar ligadas aos processos de deterioração ou até mesmo a transmissão de doença (Doulgeraki et al., 2012).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Listeria* apresentam capacidade de multiplicação e sobrevivência em temperaturas de refrigeração, sendo possível, portanto, o seu desenvolvimento em câmaras frias ou ao longo da cadeia do frio, na qual a carne é comumente armazenada (Jay, 2005; Todd e Notermans, 2011). *Pseudomonas* spp. são bactérias potencialmente deteriorantes, sendo responsáveis por grande parte das alterações sensoriais da carne, fazendo com que diminua a sua vida comercial (Arslan et al., 2011). Dentre as bactérias patogênicas, *Listeria monocytogenes* tem grande relevância por ser responsável pela listeriose, doença grave que possui alta taxa de mortalidade em grupo de risco (20-30%) (Gómez et al., 2014; Muhterem-Uyar et al., 2015).

As indústrias de alimentos, principalmente as de carnes, ainda enfrentam vários problemas relacionados aos processos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios, muitas vezes relacionados com a ineficácia destes produtos e dos processos de higienização na remoção de micro-organismos destes ambientes. Essas falhas podem tornar estes locais focos de contaminação cruzada. Isso ocorre, principalmente devido à formação de biofilmes bacterianos nos equipamentos e ambiente da linha de produção. Nesses locais, a formação de biofilme é muito favorável pelo fato de ser um ambiente com acúmulo de material orgânico e inorgânico, o qual é utilizado pelos micro-organismos para sua fixação na superfície e consequente desenvolvimento de biofilmes, onde as comunidades bacterianas podem se estabelecer e resistirem por longos períodos (Uhitil et al., 2004; Oliveira et al., 2010).

Biofilmes são comunidades de micro-organismos sésseis, caracterizados por aderir a superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por matriz extracelular polimérica (Nikolaev et al., 2007; Steenackers et al., 2012). Biofilmes são considerados um problema na indústria de alimentos, principalmente na área de processamento destes, pois são capazes de aderir a vários tipos de superfícies, destacando-se equipamentos em aço inoxidável e utensílios (Marques et al., 2007; Sofos et al., 2010). Além disso, estas bactérias são mais resistentes a ação de antimicrobianos e à sanitizantes, causando deterioração, perda da qualidade ou veiculação de patógenos (Stepanovic et al., 2004; Hamanaka et al., 2012).

Células bacterianas aderidas a biofilme podem ser até 1000 vezes mais resistentes a antimicrobianos do que no seu estado planctônico (Ouyang et al., 2012; Sharma et al., 2014). Nas últimas décadas, a resistência antimicrobiana, particularmente a multirresistência, tem sido considerada um problema de saúde pública mundial. O uso excessivo e inadequado de agentes antimicrobianos pode promover o aparecimento de bactérias resistentes propiciando que genes de resistência a antimicrobianos sejam disseminados no ambiente (Filioussis et al., 2009; Domenech et al., 2015).

Diante desse contexto, cabe salientar a importância de estudos que visam ampliar conhecimentos sobre bactérias patogênicas, destacando *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp., provenientes, principalmente de alimentos de origem animal, como carnes de frango e bubalino. Além disso, é importante conhecer o processo de formação de biofilme dessas bactérias na indústria de alimentos, assim como sua resistência aos agentes antimicrobianos e sanitizantes, possibilitando a tomada de medidas preventivas e corretivas no decorrer da cadeia alimentícia para garantir a saúde do consumidor.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *Pseudomonas* spp. e *Listeria* spp., provenientes de cortes de carnes de frango e de búfalo de frigoríficos e do comércio varejista da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, de formar biofilmes em material de poliestireno e aço inoxidável, bem como verificar a resistência aos sanitizantes utilizados na indústria de alimentos e a antimicrobianos de uso comum em humanos e animais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolados bacterianos**

Foram utilizados neste estudo 69 isolados bacterianos. Dentre os isolados de carne de búfalo, 14 eram de *Listeria* spp. (1 isolado de *L. innocua*, 1 de *L. rocourtiae* e 12 de *L. grayi*) e 25 de *Pseudomonas* spp., provenientes de um frigorífico-matadouro de bubalinos da região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, gentilmente cedidos do banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). E dentre os isolados de carne de frango, 5 eram de *L. monocytogenes* e 25 de *Pseudomonas* spp. provenientes de carcaças e cortes de frango

de um frigorífico abatedouro de aves e do comércio varejista da região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. A origem dos isolados pode ser verificada na Tabela 1.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Pseudomonas* spp. e de *Listeria* spp. provenientes de carnes de frango e bubalino do sul do Brasil.

Isolados (n)	Origem
<i>L. monocytogenes</i> (3)	Carcaça de frango no processamento
<i>L. monocytogenes</i> (2)	Corte de frango do varejo
<i>L. rocourtiae</i> (1)	Carcaça de bubalino no processamento
<i>L. innocua</i> (1)	Corte de bubalino embalado a vácuo
<i>L. grayi</i> (8)	Corte de bubalino embalado a vácuo
<i>L. grayi</i> (4)	Carcaça de bubalino no processamento
<i>Pseudomonas</i> spp (14)	Carcaça de frango no processamento
<i>Pseudomonas</i> spp (11)	Corte de frango do varejo
<i>Pseudomonas</i> spp (16)	Corte de bubalino embalado a vácuo
<i>Pseudomonas</i> spp (9)	Carcaça de bubalino no processamento

Os isolados de *Listeria* spp. de carne bubalina tiveram a espécie confirmada em um estudo prévio através de testes moleculares utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos (dados não mostrados) e os isolados de origem de frango tiveram a espécie confirmada através da identificação sorológica realizada pelo Instituto Osvaldo Cruz (FIOCRUZ). O gênero *Pseudomonas* spp. foi confirmado através de testes fenotípicos bioquímicos. Todos os isolados foram mantidos congelados em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia®) suplementado com glicerol (25 %) até o momento do uso.

Os isolados de *Listeria* spp. foram recuperados em Caldo Triptona de Soja suplementado com 0,6 % de extrato de levedura (TSB-YE, Acumedia®) e os isolados de *Pseudomonas* spp. foram recuperados em Caldo BHI.

### **Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno através do método proposto por Stepanovic et al. (2007), com modificações. Os isolados foram cultivados em Ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia®) a 37 °C durante 18 horas (h) e após, a concentração bacteriana da solução foi padronizada pela escala de McFarland no valor de 0,5, correspondente a 8 Log de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). Em seguida, uma

alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução padronizada foi distribuída em poços da microplaca contendo caldo BHI (180  $\mu\text{L}$ ) e incubada a 35 °C durante 24 h. Como controle negativo, utilizou-se 200  $\mu\text{L}$  de caldo BHI sem inóculo e como controle positivo, utilizou-se 180  $\mu\text{L}$  de caldo BHI e 20  $\mu\text{L}$  da solução padronizada com *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923), previamente testado e classificado como formador de biofilme. As placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), para remover as células não aderidas à placa. As microplacas foram invertidas sobre papel absorvente para a secagem e, posteriormente, as amostras foram fixadas com 150  $\mu\text{L}$  de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) durante 20 minutos (min). Após este período, o metanol foi descartado e as placas foram mantidas invertidas durante 18 h. As células aderentes foram coradas com 150  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (0,5 %) durante 15 min. O corante foi removido sob água corrente e após um período de 3 min de secagem, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) (95 %). As placas foram mantidas em repouso por 30 min, e então, foi realizada a quantificação do biofilme. A densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi quantificada com o auxílio de um leitor de microplacas (ThermoPlate®) a 450 nm.

A interpretação das leituras obtidas foi realizada como descrito por Stepanovic et al. (2007). Primeiramente, foi calculada a média das DO das amostras e do controle negativo, e então o valor de corte (DOc) foi calculado da seguinte forma:

$\text{DOc} = (\text{média da DO controle negativo} + 3 \times \text{desvio padrão do controle negativo})$ . O valor final da DO das amostras testadas (DOf) foi dado por:  $\text{DOf} = (\text{média da DO de cada amostra} - \text{DOc})$ .

As amostras foram divididas em categorias da seguinte forma:

$\text{DOf} \leq \text{DOc} =$  não formadora de biofilme;

$\text{DOc} < \text{DOf} \leq 2 \times \text{DOc} =$  fraca formadora de biofilme;

$2 \times \text{DOc} < \text{DOf} \leq 4 \times \text{DOc} =$  moderada formadora de biofilme;

$4 \times \text{DOc} < \text{DOf} =$  forte formadora de biofilme.

### **Avaliação da formação de biofilme em superfície de aço inoxidável**

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável pelos isolados bacterianos, foi utilizado o método proposto por Rossoni et al. (2000), com modificações. Foram utilizados corpos de prova de aço inoxidável (AISI

316) de tamanho 7 cm x 2 cm x 0,1 cm. Os corpos de prova foram imersos em solução de detergente neutro, por 1 h, e esfregados manualmente com o auxílio de uma esponja, sendo em seguida enxaguados com água destilada, pulverizados com álcool 70 % e secos a 60 °C. Após a higienização completa, foram autoclavados a 121 °C por 15 min.

No preparo das soluções, os isolados bacterianos foram semeados, separadamente, em 2 mL de caldo BHI e incubadas a 37 °C, por um período de 24 h. Um mililitro de cada cultura foi adicionado em 40 mL de água peptonada 0,85 %. A concentração do inóculo adicionado à solução foi padronizado com auxílio da escala de McFarland, de forma que a concentração bacteriana em 40 mL de água peptonada 0,85 % continha aproximadamente  $10^7$  UFC/mL. Os corpos de prova de aço inoxidável estéreis foram imersos na solução bacteriana por 24 h, a temperatura de 25 °C.

Após o período de imersão, os corpos de prova foram lavados com 1 mL de água destilada estéril, a fim de remover as células fracamente aderidas. Na sequência, foi realizada fricção com *swabs* umedecidos, seguida da imersão dos mesmos em tubos de ensaio com solução salina 0,1 % e homogeneização em agitador de tubos (Phoenix Lufenco<sup>®</sup>) por 3 min (Asséré et al., 2008). Diluições seriadas decimais de até  $10^{-5}$  foram realizadas para cada amostra, e uma alíquota de 10 µL de cada uma foram semeados em meio TSA (Acumedia<sup>®</sup>), pelo método de gota (Silva et al., 2007). As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h para a contagem de UFC. Como controle positivo foi utilizado o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923). A formação de biofilme nos corpos de prova de aço inoxidável foi considerada quando as contagens indicaram número maior ou igual a  $10^3$  UFC aderidos por cm<sup>2</sup>, de acordo com Wirtanen et al. (1996).

### **Avaliação da remoção de biofilme sob a ação de sanitizante**

Para avaliar a capacidade de remoção do biofilme formado em placas de aço inoxidável foi utilizado o método proposto por Rossoni et al. (2000), com modificações. Foram utilizados os sanitizantes cloro orgânico e quaternário de amônio, ambos na concentração de 200 partes por milhão (ppm). A escolha destes sanitizantes e da concentração utilizada se deu em função da ampla utilização dos mesmos, nesta concentração, em processos de higienização das indústrias de alimentos.

A indução à formação de biofilme em corpos de prova de aço inoxidável se deu da mesma forma como descrito no item anterior. Contudo, após a última lavagem, os corpos de prova foram imersos, separadamente, em frascos contendo cloro orgânico e quaternário de amônio por um período de 10 min. Uma vez que o tempo de contato foi atingido, os corpos de prova foram retirados da solução sanitizante e colocados em contato, por 3 segundos (s), com uma solução de Tween 2 % para neutralizar a ação do quaternário de amônio. Em seguida realizou-se fricção com *swabs* umedecidos em cada corpo de prova, seguido da imersão dos mesmos em tubos de ensaio com solução salina 0,1 % seguido de homogeneização em agitador de tubos (Phoenix Lufenco<sup>®</sup>) por 3 min. Diluições decimais seriadas foram feitas para cada amostra, 10 µL das mesmas foram semeadas em Ágar TSA, pelo método de gota (Silva et al. 2007), e as placas incubadas a 37 °C por 24 h para a contagem das UFC/cm<sup>2</sup>. Como controle, um corpo de prova do material com biofilme foi imerso em água peptonada a 0,1 %, não sendo colocada em contato com sanitizante.

A remoção de biofilme nos corpos de prova de aço inoxidável foi considerada quando as contagens indicaram número menor ou igual a 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> (APHA, 1992).

### **Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**

A susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados foi testada pelo método de disco-difusão de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI 2005a). Foram testados antimicrobianos específicos para micro-organismos Gram positivos para os isolados de *Listeria* spp.: ceftifime 10 µg; rifampicina 30 µg; cloranfenicol 30 µg; vancomicina 30 µg; tetraciclina 30 µg; gentamicina 10 µg; oxacilina 1 µg; penicilina 10 U; eritromicina 15 µg; clindamicina 2 µg; ciproflaxacin 5 µg; sulfametaxazol-trimetropim 25 µg. Para os isolados de *Pseudomonas* spp. foram testados antimicrobianos específicos para micro-organismos Gram negativos: gentamicina 10 µg; amicacina 30 µg; sulfametaxazol-trimetropim 25 µg; cipofloxacina 5 µg; meropenen 10 µg; ampicilina 10 µg; cefalotina 30 µg; cefuroxima 30 µg; amixilina 20 µg + clavulanato 10 µg; cefoxitina 30 µg; cefepime 30 µg; ceftazidima 30 µg.

Culturas padronizadas na concentração 0,5 da escala de McFarland foram semeadas com *swab* estéril em Ágar Muller-Hinton (Himedia<sup>®</sup>) e discos (Multidisco,



Laborclin®) impregnados com antimicrobianos supracitados foram aplicados sob a superfície do meio. Após incubação a 35 °C por 24 h, os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com as normas do CLSI (2005b).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Capacidade de formar biofilme em microplaca de poliestireno

Na Tabela 2 podem ser visualizados os resultados referentes a classificação dos isolados quanto a formação de biofilmes em placas de poliestireno, segundo os critérios de Stepanovic et al. (2007). Dos isolados de *Listeria* spp. e de *Pseudomonas* spp., 73,7 % e 32 %, respectivamente, foram formadores de biofilme. 100 % dos isolados de *L. monocytogenes* foram classificados como fraco formador de biofilme. Dentre os isolados de *L. grayi* três foram classificados como moderado e quatro como fraco formador de biofilme.

Tabela 2: Classificação da formação de biofilme dos isolados de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. provenientes de carnes de frango e bubalino do sul do Brasil.

Isolados (n <sup>1</sup> )	Classificação			
	Forte	Moderado	Fraco	Não formador
<i>L. monocytogenes</i> <sup>2</sup> (5)	0	0	5	0
<i>L. grayi</i> <sup>2</sup> (12)	0	3	4	5
<i>L. innocua</i> <sup>3</sup> (1)	0	0	1	0
<i>L. rocourtia</i> <sup>3</sup> (1)	0	0	1	0
<i>Pseudomonas</i> spp. <sup>2</sup> (25)	0	1	9	15
<i>Pseudomonas</i> spp. <sup>3</sup> (25)	0	1	5	19

<sup>1</sup>: número de isolados; <sup>2</sup>: frango; <sup>3</sup>: bubalino.

Por possuir flagelos, a adesão de *Listeria* spp. a superfícies é facilitada, principalmente nas fases iniciais da formação do biofilme (van Houdt e Michiels., 2010). A presença de um número elevado de *Listeria* spp. formadora de biofilme, provenientes de carcaças de frango e bubalina no processamento, comprovam possíveis falhas de higiene na manipulação, na sanitização dos equipamentos e utensílios e até mesmo na conservação do produto.

Outros estudos também encontram elevada capacidade de formação de biofilme de *L. monocytogenes* em material de poliestireno (Rodrigues et al., 2010; Kadam et al.,

2013), o que mostra que este tipo de material, utilizado na indústria de alimentos, é favorável a colonização por biofilmes de *L. monocytogenes*.

Dos 50 isolados de *Pseudomonas* spp. avaliados, apenas um proveniente de carne de frango e um de carne de bubalino foram classificados como moderado formador de biofilme. Foram classificados como fraco formador de biofilme 9 isolados provenientes de carne de frango e 5 de carne bubalina. Resultados semelhantes foram encontrados por Ghadaksaz et al. (2015) em que 47,1 % dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram formadores de biofilme em poliestireno. A baixa adesão de isolados de *Pseudomonas* spp. observada no presente estudo em material de poliestireno ocorreu por *Pseudomonas* spp. ser uma bactéria hidrofóbica e, conseqüentemente, tender a se aderir melhor a superfícies hidrofóbicas do que a superfícies hidrofílicas (Freitas et al., 2010).

Os resultados encontrados neste estudo denotam uma situação preocupante já que bactérias patogênicas como espécies de *Listeria* e deteriorantes como *Pseudomonas* spp. formadoras de biofilme representam sérios desafios para a indústria da carne, uma vez que estas podem levar acontaminação cruzada dos produtos, resultando em uma redução da vida de prateleira do alimento e em transmissão de doenças (Maia et al., 2009; Giaouris et al., 2014).

### **Capacidade de formação de biofilme em aço inoxidável**

No presente estudo, 100 % dos isolados de *Listeria* spp. e 72 % dos isolados de *Pseudomonas* spp. formaram biofilme em corpos de prova de aço inoxidável. Dos isolados de *Pseudomonas* spp. provenientes de carnes de bubalino e de frango, 48 % e 96 %, respectivamente, mostraram-se formadores de biofilme em aço inoxidável. Considerando a concentração microbiana verificada, mesmo que o número de células bacterianas aderidas seja menor que  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, já existe o risco de contaminação microbiológica (Wirtanen et al., 1996; Oliveira et al., 2010).

Assim como verificado no presente estudo, outros pesquisadores têm mostrado que bactérias do gênero *Listeria* têm capacidade de aderir e formar biofilme em superfícies de aço inoxidável, comprovando ser uma bactéria de potencial risco para a indústria de alimentos (Moltz et al., 2005; Silva et al., 2008; Berrang et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Bonsaglia et al., 2013).

A formação de biofilme por *Pseudomonas* spp. também foi relatada em estudos anteriores. Vanhaecke et al. (1990) demonstraram que isolados de *P. aeruginosa* tiveram capacidade de aderir e formar biofilme em superfícies de aço inoxidável em 30 s de contato. Hood et al. (1997) mostram a capacidade de formação de biofilme de *P. fluorescens* em aço inoxidável com diferentes meios de cultivo. Rossoni et al. (2000) e Rosado et al. (2006) também demonstraram a capacidade de *P. fluorescens* em formar biofilme em superfície de mesmo material. Considerando estas pesquisas citadas anteriormente realizadas em diferentes ambientes, geograficamente distantes, e os resultados encontrados neste estudo, podemos considerar que independente da origem, *Pseudomonas* spp. tem a capacidade de formar biofilme em superfícies de aço inoxidável. A adesão de *Pseudomonas* spp. a superfície é explicada pela presença de flagelos, pois estas estruturas conferem mobilidade à bactéria, aproximando-a de seu substrato na superfície e conseqüentemente levando a aderência (O'Toole et al., 1998).

A partir dos resultados obtidos, considerando a elevada utilização do aço inoxidável em equipamentos e superfícies de processamento de alimentos, podemos denotar que, tanto *Listeria* spp. como *Pseudomonas* spp., podem representar riscos de contaminação aos alimentos que entram em contato com essas superfícies, caso não sejam utilizados métodos adequados de higienização, com escolhas de sanitizantes adequados, dentro das plantas de processamento de alimentos.

### Remoção de biofilme sob a ação de sanitizante

Os 19 isolados de *Listeria* spp. e 36 isolados de *Pseudomonas* spp. formadores de biofilme nos corpos de prova de aço inoxidável, avaliados no presente estudo, foram submetidos a avaliação da remoção de biofilme pelo uso de dois sanitizantes comumente utilizados na indústria de alimentos, cloro orgânico e quaternário de amônio (Tabela 3) (Ministério da Saúde, 1988).

Tabela 3: Eficiência dos sanitizantes, cloro orgânico e quaternário de amônio, na remoção de biofilmes em corpos de prova de aço inoxidável, formados por *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. provenientes de carnes de frango e bubalino do sul do Brasil.

Isolados de <i>Listeria</i>	Células bacterianas aderidas em aço inoxidável (UFC/cm <sup>2</sup> )	Cloro Orgânico (UFC/cm <sup>2</sup> )	Quaternário de Amônio (UFC/cm <sup>2</sup> )
--------------------------------	--	---	--

<i>L. monocytogenes</i>	2,7x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	-
<i>L. monocytogenes</i>	5,7x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	1,2x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup>	-
<i>L. monocytogenes</i>	1x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	5,1x10 <sup>6</sup>	8,5x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. innocua</i>	4,2x10 <sup>2</sup>	-	-
<i>L. rocourtiae</i>	5,1x10 <sup>5</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. grayi</i>	6,4x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	-
<i>L. grayi</i>	2,1x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. grayi</i>	3,8x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. grayi</i>	6,4x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. grayi</i>	1,9x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>L. grayi</i>	2,1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	-
<i>L. grayi</i>	8,1x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. grayi</i>	4,2x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>L. grayi</i>	3,8x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>L. grayi</i>	1,2x10 <sup>5</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	-
<i>L. grayi</i>	2,3x10 <sup>4</sup>	6,4x10 <sup>3</sup>	-
<i>L. grayi</i>	1,9x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>3</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,4x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	4,8x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,4x10 <sup>5</sup>	6,4x10 <sup>2</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,5x10 <sup>7</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,1x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,1x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,6x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,3x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>2</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,8x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,4x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>2</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,2x10 <sup>7</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,8x10 <sup>3</sup>	-	2x10 <sup>3</sup>
<i>Pseudomonas spp.</i>	6,4x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	4,5x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>2</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	6,4x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,2 x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	4,8 x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,3 x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	4,8x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,6x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,6 x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,1x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	2,9 x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,6 x10 <sup>6</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,6x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	8,3x10 <sup>4</sup>	-	8,5x10 <sup>3</sup>
<i>Pseudomonas spp.</i>	8,3x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,8x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	8,2x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,8x10 <sup>5</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,4x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	5,3x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	5,3 x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,4 x10 <sup>4</sup>	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,4x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,4x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>

-: sem crescimento bacteriano.

Os agentes sanitizantes devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes em níveis aceitáveis, como por exemplo, 2 UFC/cm<sup>2</sup> de micro-organismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização (APHA, 1992). Considerando o padrão da APHA, 36,8

% dos isolados de *Listeria* spp. e 77,7 % dos isolados de *Pseudomonas* spp., aderidos em aço inoxidável, reduziram com a ação do cloro orgânico. O quaternário de amônio foi eficaz na redução de todos os isolados de *Listeria* spp. e de 91,6 % dos isolados de *Pseudomonas* spp., aderidos nos corpos de prova de aço inoxidável, mostrando ser mais eficaz em comparação com o cloro orgânico. Sanitizantes compostos de quaternário de amônio tem amplo espectro de ação, pois quando em contato com membrana celular dos micro-organismos, alteram sua permeabilidade estimulando a glicólise, provocando assim o esgotamento celular (Andrade et al. 1996).

Estudos para avaliar a ação de sanitizantes na eliminação de biofilmes de *Listeria* spp. já foram realizados anteriormente, porém em relação a isolados de cortes cárneos e de plantas de processamento de carnes do sul do Brasil, raros são os relatos. Estudos como de Aarnisalo et al. (2007) e Somers et al. (2004) verificaram que sanitizantes a base de cloro mostraram ser mais eficientes do que quaternário de amônio na eliminação de *L. monocytogenes* aderidas a aço inoxidável porém, Pan et al. (2006), também estudaram formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e verificaram resistências dos isolados de *L. monocytogenes* aos dois sanitizantes cloro e quaternário de amônio. Parikh et al. (2009) avaliaram a eficácia de três sanitizantes (a base ácido láctico, hipoclorito de sódio e à base de quaternário de amônio) em biofilmes compostos por *L. monocytogenes* e constataram que todos os sanitizantes foram eficazes na redução desse biofilme, sendo que o quaternário de amônio foi o mais eficaz contra os biofilmes desenvolvidos.

Biofilmes de *L. monocytogenes* podem sobreviver por muito tempo contra tratamento térmico e sanitizantes, dependendo da temperatura, concentração e tempo de aplicação do sanitizantes, bem como o estado fisiológico das células (Naitali et al., 2009).

A ação de sanitizantes na remoção de biofilmes de *Pseudomonas* spp. também foi verificado em outros estudos. Taylor et al. (1999) mostram que o tratamento de *P.aeruginosa* com sanitizante a base de cloro resultou em redução de biofilme em período de 5 minutos. Wirtanen et al. (2001) constataram, em seu estudo, que sanitizante a base de cloro não foi eficaz na eliminação de biofilme de *Pseudomonas* spp. em superfícies de aço inoxidável no entanto, sanitizantes a base de tensoativos foram eficientes na eliminação do biofilme. *Pseudomonas* spp. são bactérias importantes na indústria de alimentos, pois causam deterioração de produtos alimentares

e podem formar biofilmes em equipamentos de processamento de alimentos, dificultando assim sua remoção devido à sua resistência a sanitizantes (Zhu et al., 2014).

### Susceptibilidade a antimicrobianos

Em 1988 foi isolada a primeira cepa de *L. monocytogenes* resistente a antimicrobianos. A partir de então, cepas resistentes foram encontradas em alimentos, em superfícies de manipulação de alimentos e em amostras clínicas (Gómez et al., 2014). No presente estudo, os isolados pertencentes ao gênero *Listeria* mostram elevada resistência à penicilina (94,7 %), seguida de clindamicina (84,2 %), oxacilina (73,7 %) e cefepime (57,9 %). Na Tabela 4 é possível verificar o perfil de resistência de isolados de *Listeria* spp. a 12 antimicrobianos que podem ser utilizados no tratamento de listeriose (Jay 2005; Arsalan et al., 2011; Allen et al., 2014; Gómez et al., 2014).

Tabela 4: Resistência a antimicrobianos de isolados de *Listeria* spp. provenientes de carne de frango e bubalino do sul do Brasil.

Isolados (n)	Número de isolados de espécies de <i>Listeria</i> spp.											
	CPM (R/I)	RIF (R/I)	CLO (R/I)	VAN (R/I)	TET (R/I)	GEN (R/I)	OXA (R/I)	PEN (R/I)	ERI (R/I)	CLI (R/I)	CIP (R/I)	SUT (R/I)
<b>Frango</b>												
<i>L. monocytogenes</i> (5)	1/2	-	-	-	-	1/0	3/1	4/0	0/3	3/1	1/0	-
<b>Bubalino</b>												
<i>L. grayi</i> (12)	8/3	0/1	-	-	2/3	0/6	10/1	12/0	2/4	11/1	0/1	-
<i>L. innocua</i> (1)	1/0	0/1	-	1/0	1/0	-	0/1	1/0	0/1	1/0	-	-
<i>L. rocourtiae</i> (1)	1/0	-	-	-	1/0	0/1	1/0	1/0	0/1	1/0	-	-
<b>Total</b>	<b>11/5</b>	<b>0/2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4/3</b>	<b>1/7</b>	<b>14/3</b>	<b>18</b>	<b>2/9</b>	<b>16/2</b>	<b>1/1</b>	<b>0</b>

CPM: cepefime 10 µg; RFI: rifampicina 30 µg; CLO: cloranfenicol 30 µg; VAN: vancomicina 30 µg; TET: tetraciclina 30 µg; GEN: gentamicina 10 µg; OXA: oxacilina 1 µg; PEN: penicilina 10 U; ERI: eritromicina 15 µg; CLI: clindamicina 2 µg; CIP: ciproflaxacin 5 µg; SUT: sulfametoxazol-trimetoprim 25 µg; (R/I) em que R representa Resistência e I representa Resistência Intermediária.

Alguns pesquisadores também encontraram elevados níveis de resistência à penicilina em cepas de *L. monocytogenes* (Harakeh et al., 2009; Fallah et al., 2012). A preocupação é ainda maior quando se observa que isolados de *L. monocytogenes* foram resistentes a antimicrobianos importantes no tratamento de listeriose. A ampicilina ou penicilina combinados com gentamicina é considerada a primeira escolha para o tratamento da listeriose (Charpentier et al., 1999; Conter et al., 2009).

Como no presente estudo, resistência a clindamicina também foi encontrada por Kovacevic et al. (2013) em que 33 % de *Listeria* spp. provenientes de peixes, carnes e

plantas de processamento, foram resistentes a clindamicina. Gómez et al. (2014) também encontraram isolados resistentes a clindamicina, sendo 35 % de *L. monocytogenes* e 46,2 % de *L. innocua*, provenientes de produtos cárneos e ambiente de processamento. Segundo Harakeh et al. (2009) a resistência de *L. monocytogenes* a penicilina e clindamicina pode ser causada pelo uso excessivo dessas drogas na medicina veterinária.

Todos os isolados testados no presente estudo, apresentaram sensibilidade a cloranfenicol e apenas um foi resistente a gentamicina e ciprofloxacina. Resultados semelhantes foram encontrados por Doménech et al. (2015) em que 100 % dos isolados de *L. monocytogenes* de alimentos prontos para o consumo foram sensíveis a esses três antimicrobianos. Gómez et al. (2014) também encontraram sensibilidade a cloranfenicol em todos os isolados de *L. monocytogenes* e em 99,2 % de *L. innocua*. Kovacevic et al. (2013) encontraram sensibilidade em todos os isolados de *Listeria* spp. a gentamicina. A alta sensibilidade de isolados a gentamicina pode ser devido ao fato de que este não é um antimicrobiano muito utilizado para fins terapêuticos em medicina veterinária nem como promotor de crescimento de animais de corte (Harakeh et al., 2009).

Sensibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina ocorreram em 100 % dos isolados no presente estudo. Yan et al. (2010) encontraram poucos isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de alimentos, resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim (Sulfazotrim) e a vancomicina. No entanto, Kovacevic et al. (2013) e Korsak et al. (2012) encontraram todos os isolados sensíveis a vancomicina. Doménech et al. (2015) encontraram todos os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de salsichas de porco resistente à sulfametoxazol-trimetoprim. Estes resultados são de grande relevância, uma vez que esse antimicrobiano é a segunda escolha para o tratamento da listeriose, especialmente em pacientes alérgicos à penicilina (Pesavento et al., 2010). Segundo Harakeh et al. (2009), a vancomicina é considerada a última opção de tratamento para infecção por listeriose em humanos.

Em parâmetros gerais, apenas um dos isolados foi sensível a todos os antimicrobianos testados, sendo esse um isolado de *L. monocytogenes* proveniente de cortes de carne de frango do comércio varejista. Vinte e um por cento dos isolados testados foram resistentes a dois antimicrobianos e 73,7 % apresentaram resistência de três a cinco antimicrobianos. Isolados resistentes a dois ou mais antimicrobianos foram classificados como multirresistentes e totalizaram 94,7 %. A multirresistência não é um

fato restrito a esses isolados do sul do Brasil, pois vários estudos encontraram isolados de *Listeria* spp. multirresistentes a antimicrobianos, podendo ser considerado um problema amplamente verificado em nível mundial (Conter et al., 2009; Yan et al., 2010; Pesavento et al., 2010; Fallah et al., 2012; Gómez et al., 2014). A existência de isolados de *Listeria* spp. multirresistentes aos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de listeriose humana representa um sério problema para a saúde pública devido a aumento da dificuldade terapêutica, principalmente para os indivíduos que fazem parte do grupo de risco, que incluem idosos, crianças, mulheres grávidas e imunodeprimidos (Gómez et al., 2014).

A Tabela 5 mostra a susceptibilidade de isolados de *Pseudomonas* spp. aos 12 antimicrobianos testados, utilizados para tratar infecções provocadas principalmente por *P. aeruginosa* (Tassios et al., 1998; Jeukens et al., 2014). A maior taxa de resistência foi verificada para meropenem, ocorrendo em 100 % dos isolados provenientes de carnes de frango e 96 % de bubalino. Entre as cepas de *P. aeruginosas* avaliadas por Maia et al. (2009) (isoladas de frango e peixe) não foi observada resistência aos antimicrobianos pertencentes à classe das carbapenemas (imipenem e meropenem), as quais são empregados como opções para isolados multirresistentes. Os resultados encontrados no presente estudo é bastante preocupante, pois meropenem é considerado um antimicrobiano efetivo no tratamento de infecções caudas por bactérias Gram negativas (Gales et al., 2002).

Tabela 5: Resistência a antimicrobianos de isolados de *Pseudomonas* spp. provenientes de carne de frango e bubalino do sul do Brasil.

Isolados (n)	Número de isolados de espécies de <i>Pseudomonas</i> spp.											
	GEM (R/I)	AMI (R/I)	SUT (R/I)	CIP (R/I)	MER (R/I)	AMP (R/I)	CFL (R/I)	CRX (R/I)	AMC (R/I)	CFO (R/I)	CPM (R/I)	CAZ (R/I)
<b>Frango</b>												
<i>Pseudomonas</i> spp. (50)	0/1	-	-	-	25/0	1/5	0/13	13/7	10/11	13/8	-	-
<b>Bubalino</b>												
<i>Pseudomonas</i> spp. (50)	-	-	1/2	0/2	24/1	6/1	1/4	12/2	3/15	11/0	-	-
<b>Total</b>	<b>0/1</b>	<b>0</b>	<b>1/2</b>	<b>0/2</b>	<b>49/1</b>	<b>7/6</b>	<b>1/13</b>	<b>25/9</b>	<b>13/26</b>	<b>24/8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

GEM: gentamicina 10 µg; AMI: amicacina 30 µg; SUT: sulfazotrim 25 µg; CIP: ciprofloxacina 5 µg; MER: meropenem 10 µg; AMP: ampicilina 10 µg; CFL: cefalotina 30 µg; CRX: cefuroxima 30 µg; AMC: amixilina+clavulanato 30 µg; CFO: cefoxitina 30 µg; CPM: cefepime 30 µg; CAZ: ceftazidima 30 µg; (R/I) em que R representa Resistência e I representa Resistência Intermediária.

Quanto a ocorrência de multirresistência, 92 % dos isolados provenientes de carne frango e 76 % dos provenientes de carne bubalina foram resistentes a mais de dois



antimicrobianos testados. O aumento da multirresistência aos antimicrobianos em bactérias Gram negativas e particularmente em *P. aeruginosa* aponta reduzida disponibilidade de agentes efetivos para o tratamento de infecções causadas por essa bactéria. O aumento da resistência a antimicrobianos e a potencial propagação global de genes de resistência a bactérias patogênicas tem se tornado um problema mundial, tanto para a medicina humana como veterinária (Arslan et al., 2011; Sharma et al., 2014). O uso excessivo de antimicrobianos na medicina veterinária, pode estar relacionado a patógenos provenientes da cadeia alimentar, resistentes a antimicrobianos de uso em humanos (Wang et al., 2007). Sendo assim, para controlar esta resistência e a multirresistência a antimicrobianos, é de fundamental importância que tenham controle e uma fiscalização em relação ao uso correto destes antimicrobianos no tratamento humano e na medicina veterinária, a fim de diminuir a transmissão da resistência na cadeia alimentar.

## CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, fica evidente a importância do controle de biofilmes microbianos na indústria de carnes, uma vez que no presente estudo pode-se constatar que isolados de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp., provenientes de carne de frango e búfalo, apresentaram capacidade de formação de biofilme nos materiais de poliestireno e aço inoxidável.

Pode-se concluir também que a ação dos dois sanitizantes testados, cloro orgânico e quaternário de amônio, foram eficazes na eliminação do biofilmes de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. em corpos de prova de aço inoxidável, sendo o segundo mais eficiente. A fim de minimizar o risco de biofilme, é fundamental que a indústria utilize estratégias de controle, como um processo de higienização eficiente, que abranja corretamente as etapas de limpeza e sanitização, utilizando produtos recomendados e em concentrações ideais para a eliminação dos micro-organismos.

A resistência a antimicrobianos foi identificada em vários isolados, tanto de *Listeria* spp. quanto *Pseudomonas* spp., além de a multirresistência. Para isso, é de fundamental importância que se tenha um uso correto destes antimicrobianos no tratamento humano e na medicina veterinária, para diminuir essa transmissão da resistência na cadeia alimentar.

## REFERÊNCIAS

- Aarnisalo K, Lundén J, Korkeala H, Wirtanen G (2007). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT - Food Science and Technology*. 40: 1041–1048.
- Allen RC, Popat R, Diggle, SP, Brown SP (2014). Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs?. *Nat Rev Microbiol*. 12 (4): 300-8. doi: 10.1038/nrmicro3232.
- American Public Health Association (APHA) (1992). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*. Hanover: EPS Group Inc.
- Andrade NJ, Macêdo JAB (1996). *Higienização na indústria de alimentos*. São Paulo (SP): Varela.
- Arslan S, Eyi A, Özdemir F (2011). Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *J. Dairy Sci*. 94: 5851-5856.
- Asséré A, Oulahal N, Carpentier B (2008). Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. *J. Appl Microbiol*. 104: 1692-702.
- Berrang ME, Frank J, Meinersmann RJ (2010). *Listeria monocytogenes* biofilm formation on silver ion impregnated cutting boards. *Food Prot. Trends*. 30: 168–171.
- Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernandes Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, RALL VLM (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*. 35: 386–39. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.023.
- Charpentier E, Courvalin P (1999). Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43 (9): 2103–2108.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2005a. *Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana*. Sexta edição. CLSI documento M07-A06. 23, 2.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2005b. *Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias*. 15th suplemento informativo. CLSI documento M100-S15. 25, 1.
- Conter M, PALUDI D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A (2009). Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*. 128: 497-500.
- Domenéch E, Jimenez-Belenguer A, Amoros JA, Ferrus MA, Escriche I (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control*. 47: 120-125.

- Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani, F, Nychas, GJE (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157: 130-14.
- Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, Rahnama M, Tahmasby H, Mahzounieh M (2012). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran. *Food Control.* 28: 2327–332.
- Filiousis G, Johansson A, Frey J, Perreten V (2009). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. Short Communication. *Food Control.* 20 (3): 314-317.
- Freitas VR, Sand ST, Simonetti AB (2010). Formação *in vitro* de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. *Rev. Odontol. UNESP.* 39 (4): 193-200.
- Gales AC, Mendes RE, Rodrigues J, Sade HS (2002). Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos?. *J. Bras. Pat. Med. Lab.* 38 (1): 13-20.
- Ghadaksaz A, Fooladi AAI, Hosseini HM, Amin M (2015). The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *J. Appl. Biomed.* 13: 61–68.
- Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Moretro T, Habimana O, Desvaux M, Renier S, Nychas GJ (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* 97 (3): 298-309.
- Gómez D, Azón E, Marco N, Carramiñana JJ, Rota C, Ariño A, Yanguela J (2014). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* 42: 61-65.
- Hamanaka D, Onishi M, Genkawa T, Tanaka F, Uchino T (2012). Effects of temperature and nutrient concentration on the structural characteristics and removal of vegetable-associated *Pseudomonas* biofilm. *Food Control.* 24: 165-170.
- Harakeh S, Saleh I, Zouhairi O, Baydoun E, Barbour E, Alwan N (2009). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Sci. Total Environ.* 407: 4022-4027.
- Hood SK, Zottola EA (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Food Microbiol.* 22: 145-153.
- Jay JM (2005). *Microbiologia de Alimentos.* 6 ed. Porto Alegre: Artmed.

Jeukens J, Boyle B, Kukavica-Ibrulj I, Ouellet MM, Aaron SD, Charette SJ, Fothergill JL, Tucker NP, Winstanley C, Levesque RC (2014). Comparative Genomics of Isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic Strain Associated with Chronic Lung Infections of Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One*. 9 (2): 87611. doi: 10.1371/journal.pone.0087611.

Kadam SR, Den Besten HMW, Van Der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin Sachin. *Int. J. Food Microbiol.* 165: 259–264.

Korsak D, Borek A, Daniluk S, Grabowska A, Pappelbaum K (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* 158: 203–208.

Kovacevic J, Sagert J, Wozniak A, Gilmour MW, Allen KJ (2013). Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. *Food Microbiol.* 34: 319-327.

Maia AA, Cantisani ML, Esposto EM, Silva WCP, Rodrigues ECP, Rodrigues DP, Lázaro NS (2009). Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 29 (1): 114-119.

Marques SC, Rezende JGOS, Alves LAF, Silva BC, Alves E, Abreu LR, Piccoli RH (2007). Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 38 (3): 538-543.

Ministério da Saúde. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentadas. *Diário Oficial da União, Brasília*, 05 de setembro de 1988.

Moltz AG, Martin SE (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *J. Food Prot.* 68: 92–97.

Muhterem-Uyar M, Dalmasso M, Bolocan AS, Hernandez M, Kapetanakou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovičová J, Nicolau AI, Rovira J, Skandamis PN, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D, Stessl B, Wagner M (2015). Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control.* 51: 94-107.

Naitali M, Dubois-Brissonnet F, Cuvelier G, Bellon-Fontaine MN (2009). Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* 130: 101-107.

Nikolaev YA, Plakunov VK (2007). Biofilm: “City of Microbes” or na analogue of multicellular organisms?. *Microbiol.* 76 (2): 125-138.

Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH (2010). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransferpotential. *Braz. J. Microbiol.* 41: 97-106.

O’Toole G, KOLTER R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295-304.

Ouyang Y, Li J, Dong Y, Blakely LV, Cao M (2012). Genome-wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J. Biot. Res.* 4: 13-25.

Pan Y, Breidt JR, Kathariou S (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated foodprocessing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12): 7711–7717.

Parikh S, Kendall PA, Yang H, Geornaras I, Sofos JN (2009). Survival and inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms on food contact surfaces using commercially available and homemade sanitizers. 69th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists. P: 123-38.

Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Lo Nostro A (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control.* 21: 708-713.

Rodrigues BL, Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, et al. (2010). Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughter house. *Braz. J. Microbiol.* 41: 1082-1085.

Rosado MS, et al. (2006). Modelagem do processo de formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável, granito e mármore e avaliação das microtopografias dessas superfícies por microscopia eletrônica de varredura. *Hig. Aliment.* 21(150): 119-120.

Rossoni EM, Gaylarde CC (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol.* 1(61): 81-85.

Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals.* 42: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>.

Silva NVCA, et al. (2007). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ªEd. São Paulo, Varela. 552.

Silva S, Teixeira P, Oliveira R, Azeredo J (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J. Food Prot.* 71: 1379–1358.

Sofos JN, Geornaras I (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia Coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready to eat, meat products. *Meat Sci.* 86: 2-14.

Somers EB, Wong AC (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *J. Food Prot.* 67(10): 2218-29.

Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45(2) 502–31.

Stepanovic S, Irkovic IC, Ranin L, et al. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 428- 432.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115(8): 891-9.

Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AN, Fock C, Legakis NJ (1998) Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. *J. Clinical Microbiol.* 36 (4): 897-901.

Taylor JH, Rogers SJ, Holah JT (1999). A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 °C. *J. Appl. Microbiol.* 87: 718–725.

Todd E, Notermans S (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 22: 1484-1490.

Uhital S, Jaksic S, Petrak T, Medic H, Gumhalter-Karolyi L (2004). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. In cakes in Croatia. *Food Control.* 15 (3): 213-216.

Vanhaecke E, Remon JP, Moors M, Raes F, De Rudder D, Van Peteghem A (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: Role of cell surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 788–795.

Van Houdt R, MICHIELS CW (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1117-1131.

Yan H, Neogi SB, Mo Z, Guan W, Shen Z, Zhang S, Li L, Yamasaki S, Shi L, Zhong N (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 310–316.

Zhu N, Chirase S (2014). Use of fulvic acid or sodium silicate-based sanitizers to inactivate *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* on food contact surfaces. *J. Food Safety*. 34: 132–140.

Wang HH, Manuzon M, Lehman M, Wan K, Luo H, Wittum TE, Bakaletz LO (2007). Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett*, 254: 226-231.

Wirtanen G, Husmark U, Mattila-Sandholm T (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food processing systems. *J. Food Protect.* 59(7): 727-733.

Wirtanen G, et al. (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces*. 20(1): 37-50. [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765\(00\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(00)00173-9).

## 5 Conclusões

Com os resultados obtidos, fica evidente a importância do controle de biofilmes microbianos na indústria de carnes, uma vez que no presente estudo pode-se constatar que todos os isolados de *Listeria* spp. tiveram capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno e aço inoxidável. Alguns isolados de *Pseudomonas* spp. também formaram biofilme nas duas superfícies testadas.

Pode-se concluir também que a ação dos dois sanitizantes testados, cloro orgânico e quaternário de amônio, foram eficazes na eliminação do biofilmes de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. em corpos de prova de aço inoxidável sendo o quaternário de amônio mais eficaz. A fim de minimizar o risco de biofilme, é fundamental que a indústria utilize estratégias de controle, como um processo de higienização eficiente, que abranja corretamente as etapas de limpeza e sanitização, utilizando produtos recomendados e em concentrações ideais para a eliminação dos micro-organismos.

A resistência a antimicrobianos foi identificada em vários isolados, tanto de *Listeria* spp. quanto *Pseudomonas* spp., além de ter um número elevado de isolados multirresistentes. Para isso, é de fundamental importância que se tenha um controle e uma fiscalização em relação ao uso controlado e correto destes antimicrobianos no tratamento humano e na medicina veterinária, para diminuir essa transmissão da resistência na cadeia alimentar.



## 6 Referências

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Carne de búfalo: um caso a parte. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/not00090.html>>. Publicado em: 8 de outubro de 2001. Acesso em: janeiro, 2015.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Hanover: EPS Group Inc.

ACAR, J.; ROSTEL, B. Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique*. Paris, v. 20, n. 3, p. 797-810, 2001.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. Higienização na indústria de alimentos. São Paulo (SP): Varela, p.182, 1996.

ANTUNEZ, H.E.S.; COSTA, C.S.; SILVA, W.P.; SOARES, G.J.D. Efeito do ácido láctico e da radiação gama na eliminação de *Pseudomonas* spp. e na produção de amônia em peito de frango desossado resfriado. *Alimentos e Nutrição*, v.17, n.4, p.367-372, 2006.

APARNA, M.S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v.12, n.6, p.526-30, 2008.

ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. *Ciências Agrárias*, Londrina, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

ARSLAN, S.; EYI, A.; ÖZDEMİR, F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal Dairy Science*. v.94, p.5851–5856, 2011.

BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*. V.41, p.11-20, 2013.

BALSALOBRE, B.; HERNÁNDEZ-GODOY, J. Antibiotic resistances in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella entérica* isolated from foods with animal origin. *Revista de Salud Ambiental*. v.4, p.42-46, 2004.

BELESSI, C., GOUNADAKI, A.S.; PSOMAS, A.N. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. v.145, p.46-52, 2011.

BERRANG, M.E.; FRANK, J.; MEINERSMANN, R.J. *Listeria monocytogenes* biofilm formation on silver ion impregnated cutting boards. *Food Protection*. v.30, p.168–171, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO Instrução Normativa Nº26, de 9 de Julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 Jul., 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2014. Bovinos e bubalinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: janeiro, 2015.

BOARI, C.A.; ALVES, M.P.; TEBALDI, V.M.R.; SAVIAN, T.V.; PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.29, n.4, p.886-895, 2009.

CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; COURVALIN, P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *Journal of Infectious Diseases*. v.172 p.277-281, 1995.

CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.43, n.9, p.2103–2108, 1999.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HEBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal Microbiology Methods*. v.68,n.3, p.605-12, 2007.

CHEN, J.; ROSMAN, M.L.; PAWAR, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Eschechia coli* to the surface of beef and a culture médium. *LWT. Food Science and Technology*, Oxford. v.40, p.249-254, 2007.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *International Journal of Food Science Technology*. v.2,n.1, p.22-32, 2003.

CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; IANIERI, A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. v.128, p.497-500, 2009.

CONTRERAS-CASTILLO, C.; PINTO, A.A.; SOUZA, G.L.; BERAQUET, N.J.; AGUIAR, A.P.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; MENDES, C.M.I.; ORTEGA, E.M. Effect of feed withdrawal periods on carcass yield and breast meat quality of chickens reared using an alternative system. *Poultry Science*, Champaign. v.16, p.613-22, 2007.

CORRÊA, A.; TRAMOSO, E. Búfalos. *Revista Produz*, Goiânia. v.1, n.6, p.36-43, 2004.

DAUPHIN, G.; RAGIMBEAU, C.; MALLE, P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *International Journal of Food Microbiology*. v.64, p.51-61, 2001.

DAVIES, et al. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.2, p.114-122, 2003.

DOYLE, M.P.; LONERAGAN, G.H.; SCOTT, H.M.; SINGER, R.S. Antimicrobial resistance: challenges and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. v.12, p.234- 248, 2013.

DOMENÉCH, E.; JIMENEZ -BELENGUER, A.; AMOROS, J.A.; FERRUS, M.A.; ESCRICHE, I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control*. v.47, p.120-125, 2015.

DOULGERAKI, A.I.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F.; NYCHAS, G.J.E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*. V.157, p.130-14, 2012.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 58: 587-610, 2004.

FACINELLI, B.; ROBERTS, M. C.; GIOVANETTI, E.; CASOLARI, C.; FABIO, U.; VARALDO, P. E. Genetic basis of tetracycline resistance in food-borne isolates of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.614–616, 1993.

FAVRE-BONTÉ S.; CHAMOT E.; KÖHLER T.; ROMAND J.Á.; VAN DELDEN C. Auto inducer production and *quorum-sensing* dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of incubated patients. *Journal Science BMC Microbiology*. v.8. p.623e33, 2010.

FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*. v.77, p.150-170, 2014.

FLEMMING, H.C.; WINDENGER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilm construction material. In: WEBER, J.; SAND, W. (Ed.). *Biofouling and materials: COST 520 workshop*. Bern: EDMZ, p. 2-18, 1999.

FORSYTHE, S.J. *The microbiology of safe food*. Ed. 2. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496 p.

FRANCO, A.C.M.; FERNANDEZ, E.J.Q.; SAMPAYO, C.F.; OTERO, J.L.R.; RODRIGUEZ, L.D.; SAEZ, A.C. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.38, p.1655–1657, 1994.

GARMYN, D. et al. Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: A central role for the *agr* system. *Communicative and Integrative Biology*, Austin. v.2, n.4, p.371-374, 2009.

GANGULY, K.; WU, R.; OLLIVAUULT-SHIFLETT, M.; GOODWIN, P.M.; SILKS, L.A.; IYER, R. Design, synthesis, and a novel application of quorum-sensing agonists as potential drug delivery vehicles. *Journal Drug Target*. v.19, p.528-39, 2011.

GARRIDO, V.; VITAS, A.I.; GARCÍA-JALON, I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern. *Food Control*. v.20, p.986-991, 2009.

GHADAKSAZ, A.; FOOLADI, A.A.I.; HOSSEINI, H.M.; AMIN, M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *Journal Applied Biomedicine*. v.13, p.61–68, 2015.

GHOSH, S.; LAPARA, T. M. The effect of sub therapeutic antibiotic use in farm Animal son the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, London, v.1, n.3, p.191-203, 2007.

GÓMEZ, D.; AZÓN, E.; MARCO, N.; CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; ARIÑO, A.; et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiology*. v.42, p.61-65, 2014.

GUILLET, C.; JOIN-LAMBERT, O.; LE MONNIER, A.; LECLERCQ, A.; MECHAÏ, F.; MAMZER-BRUNEEL, M.F.; BIELECKA, M.K.; SCORTTI, M.; DISSON, O.; BERCHE, P. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*. v.16, p.136, 2010.

HALTER, E.L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* in a fresh water pond. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. v.63, p.641–647, 2013.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v.48, n.7, p.916-921, 2009.

HARMSSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S.J.; TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. FEMS Immunol Medical Microbiology. v.59, n.3, p.253-68, 2010.

HEYDORN A, NIELSEN AT, HENTZER M, STERNBERG C, GIVSKOV M, ERSBOLL BK. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology. v.146, n.10, p.2395-407, 2000.

HOUDT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology. v.109, p.1117–1131, 2010.

JAMALI, H.; THONG, K. L. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. Food Control, v.44, p.1-6, 2014.

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre:Artmed, 2005.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v.236, p.163-173, 2004.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C. Características de carcaças de bubalinos. Anais do ZOOTEC. Campo Grande: p.29, 2005.

KADAM, S.R.; DEN BESTEN, H.M.W.; VAN DER VEEN, S.; ZWIETERING, M.H.; MOEZELAAR, R.; ABEE, T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin Sachin. International Journal of Food Microbiology. v.165, p.259–264, 2013.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. International Microbiology, Barcelona, v.9, p.21-28, 2006.

LEWIS K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nature Rev Microbiology. v.5,p.48-56, 2007.

LECUIT, M.; LECLERCQ, A. 2012. Rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des Listeria e Année. 2011. Institut Pasteur, Paris, France. <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004j-03q/ra-cnr-listeria-2011.pdf>. 2012.

LOMONACO, S.; VERGHESE, B.; GERNER-SMIDT, P.; TARR, C., GLADNEY, L.; JOSEPH, L.; et al. Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. Emerging Infectious Diseases. v.19, p.147-150, 2013.

LUDENSKY, M. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. International Biodeterioration Biodegradation, Barking, v.51, p.255-263, 2003.

MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. v.29, n.1, p.114-119, 2009.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, É.B.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. *Brazilian Journal Veterinary Res. and Animal Science*, São Paulo, v.45, n.2, p.116-121, 2008.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*. v.74, p.812-815, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentadas. *Diário Oficial da União, Brasília*, 05 de setembro de 1988.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R. *Food Microbiology: An Introduction*. 2nd. Ed. Washington, D.C.: ASM Press. 2008. 428p.

MORTON, L.H.G.; GREENWAY, D.I.A.; GAYLARDE, C.C.; SURMAN, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration Biodegradation*. v.41, p.247-259, 1998.

MUHTEREM-UYAR, M.; DALMASSO, M.; BOLOCAN, A.S.; HERNANDEZ, M.; et al. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, v.51, p.94-107, 2015.

NEIDELL, M.J.; et al. Costs of healthcare and community associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial susceptible organisms. *Clinical Infectious Disease* v.55, p.807-815, 2012.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransferpotential. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.41, p.97-106, 2010.

OUYANG, Y.; LI, J.; DONG, Y.; BLAKELY, L.V.; CAO, M. Genome-wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal Biological Research*. v.4, p.13-25, 2012.

OULAHAL, N.; et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control, Oxford*. v.19, n.2, p.178-185, 2008.

PAN, Y.; BREIDT JR., F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated foodprocessing environment. *Applied and Environmental Microbiology*. v.72, n.12, p.7711–7717, 2006.

PAN, Y.; BREIDT, F.Jr.; GORSKI, L. Synergistic effect of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2<sup>a</sup> and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, D.C; v.76, n.5, p.1433-1441, 2010.

PARIKH, S.; KENDALL, P.A.; YANG, H.; GEORNARAS, I.; SOFOS, J. N. Survival and inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms on food contact surfaces using commercially available and homemade sanitizers. 69th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, p. 123-38, 2009.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; NIERI, D.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*. v.21, p.708-713, 2010.

PIRNAY, J. P.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environmental Microbiology*, v.7, n.7, p.969–980, 2005.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. 2005. *Journal Antimicrobial Chemother*. v.56, n.1, p.20-51.

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURTIEU, A. L.; COURVALIN, P. Transferable plasmid mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, v.335, p.1422–1426, 1990.

RANGEL, J.M.; Sparling, P.H.; Crowe, C.; Griffin, P.M.; Swerdlow, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*.v.11, p.603-609, 2005.

RIVAS. M.; CALETTI, M.G.; CHINEN, I.; REFI, S.M.; ROLDÁN, C.D.; CHILLEMI, G.; FIORILLI, G.; BERTOLOTTI, A.; AGUERRE, L.; ESTANIS, S.S. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic syndrome, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. v.9, p.1184-1186, 2003.

SHARMA, G.; RAO, S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, v.42, p.1-7, 2014.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Food Science & Technology*. P.1-7, 2009.

SILVA, J.A.; AZERÊDO, G.A.; BARROS, C.M.R.; COSTA, E.L.; FALCÃO, M.M.S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. *Revista Higiene Alimentar*, v.16, n.100, p.97-101, 2002.

SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*. v.71, p.1379–1358, 2008.

SMOOT, L.M.; PIERSON, M.D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection*. v.61, p.1293–1298, 1998.

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

SOMERS, E.B.; WONG, A.C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *Journal of Food Protection*. v.67, n.10, p.2218-29, 2004.

SPENCER, R.C. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. v.15, p.281–285, 1996.

STORZ, M.P.; MAURER, C.K.; ZIMMER, C.; WAGNER, N.; BRENGEL, C.; DE JONG, J.C.; et al. Validation of PqsD as an anti-biofilm target in *Pseudomonas aeruginosa* by development of small-molecule inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. v.134, p.16143e-6, 2012.

TAYLOR, J.H.; ROGERS, S.J.; HOLAH, J.T. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20°C. *Journal of Applied Microbiology*. v.87, p.718–725, 1999.

TAVARES, T. M. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo “trailers” no centro e na periferia de goiânia/GO. *Revista de Patologia Tropical*. v.32, n.1, p.45-52, 2003.

THEERTHANKAR, D.; PRASHANT, K.S.; HENK, J.B.; HENNY, C.M.; BASTIAAN, P.K. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied Environmental Microbiology*. v.76, n.10, p.3405-8, 2010.

TOOD, E.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. v.22, 1484-1490, 2011.

UHITIL, S., JAKSIC, S., PETRAK, T., MEDIC, H., GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. In cakes in Croatia. *Food Control*, v. 15, n.3, p.213-216, 2004.



UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA – UBABEF. Realetório Anual, 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. Acesso em: janeiro, 2015.

VANHAECKE, E.; REMON, J.P.; MOORS, M.; RAES, F.; DE RUDDER, D.; VAN PETEGHEM, A. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: Role of cell surface hydrophobicity. *Applied Environmental Microbiology*. v.56, p.788–795, 1990.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. ET AL. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, Washington, D.C., v.14, n.3, p. 584-640, 2001.

ZAVASCKI A.P.; CRUZ R.P.; GOLDANI, L.Z. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. *Journal of Hospital Infection*, v.59, p.96-101, 2005.

WANG, Z.; RONG, X.Z.; ZHANG, T.; LIU, L.Z. Distribution and drug resistance analysis of bacteria in different wound infections. *Journal of Southern Medical University*. v.29, p.82–89, 2009.

WIRTANEN, G.; et al. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces*. v.20, n.1, p.37-50, 2001..