

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

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUPERFÍCIES DE COBRE FRENTE À
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS E SUA
POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Dissertação de Mestrado

Karine Patrin Pontin

PORTO ALEGRE

2020

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

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUPERFÍCIES DE COBRE FRENTE À
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS E SUA
POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Autora: Karine Patrin Pontin

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na Área de Sanidade
Avícola**

**Orientador: Dr. Vladimir Pinheiro do
Nascimento**

Coorientadora: Dra. Karen Apellanis Borges

PORTO ALEGRE

2020

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

CIP - Catalogação na Publicação

PONTIN, KARINE PATRIN

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUPERFÍCIES DE COBRE
FRENTE À FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR SALMONELLA
ENTERITIDIS E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA
AVÍCOLA / KARINE PATRIN PONTIN. -- 2020.

98 f.

Orientador: VLADIMIR PINHEIRO DO NASCIMENTO.

Coorientadora: KAREN APELLANIS BORGES.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. SALMONELLA. 2. BIOFILME. 3. COBRE. 4. PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS. I. DO NASCIMENTO, VLADIMIR PINHEIRO, orient. II. BORGES, KAREN APELLANIS, coorient. III. Título.

Karine Patrin Pontin

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUPERFÍCIES DE COBRE FRENTE À
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *SALMONELLA* ENTERITIDIS E SUA
POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Aprovado em 14 FEV 2020.

APROVADO POR:

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

Dr. Thales Quedi Furian
Membro da comissão

Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo
Membro da comissão

Profª. Dra. Maristela Lovato
Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ouvir e me abençoar todos os dias de minha vida.

Aos meus pais Antonio e Marinez, meu mais sincero amor e agradecimento pelo amparo e pela força, por me ensinarem sonhar, ter fé, acreditar e lutar pela minha felicidade.

Ao meu irmão Cesar, pelo carinho em todos os momentos, jamais deixando sentir-me sozinha.

Ao meu amigo e companheiro Rodrigo, pelo incentivo e, acima de tudo, pelo respeito. A vocês dedico minha vida e todas as minhas conquistas.

Ao meu Orientador Vladimir Pinheiro do Nascimento e coorientadora Karen Borges Furian por acreditarem e confiarem em mim além disporem tempo e conhecimento, aparando-me quando precisei.

À toda a equipe do CDPA e do LACOR pela força, ajuda e aprendizado. Meu muito obrigada pelas maratonas de experimentos!

À empresa Procobre, pelo apoio financeiro deste projeto e fornecimento dos materiais e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Salmonella é considerada um dos patógenos de maior relevância para o setor avícola, uma vez que a carne de frango representa a principal fonte de infecção desta bactéria para o homem. O sorovar *S. Enteritidis* é identificado como o mais frequentemente envolvido nas salmoneloses alimentares. Na indústria, o controle de biofilmes é rotineiramente realizado através da higienização com a utilização de desinfetantes, os quais apresentam toxicidade conhecida e eficácia variável, devido à evolução da resistência antimicrobiana. O cobre vem sendo aplicado como superfície de contato com poder antimicrobiano em diversos países e pode ser utilizado como um complemento das práticas padrão de limpeza e desinfecção das superfícies industriais, conferindo redução da formação de biofilmes, diminuição da carga bacteriana persistente e aumentando a segurança dos alimentos. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades antimicrobianas de superfícies de cobre e suas ligas na prevenção da formação do biofilme por *S. Enteritidis* e avaliar o potencial de corrosão das superfícies, quando em contato com desinfetante. Para avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizados cupons com área de 1 cm², compostos de cobre 99,9% (C11000), latão (C26000), cobre revestido com estanho e, como controle, aço inoxidável (AISI 316). O método utilizado foi o de diluição, com teste de suspensão de células planctônicas e contagem bacteriana realizada através do método de *Drop plate*, com posterior incubação em temperaturas que simulam ambientes de processamento avícola (4°C, 12°C e 25°C). Para a avaliação do potencial de corrosão, foram realizados ensaios de polarização potencioestática com as mesmas superfícies. Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) na produção de biofilme foram observadas nas superfícies de cobre e latão, quando comparadas ao aço inoxidável e às superfícies revestidas com estanho nas três temperaturas avaliadas. Não foram observadas diferenças no potencial de corrosão das superfícies quando em contato com o desinfetante cloreto de benzalcônio, nas concentrações de 100, 200 e 400ppm, em relação ao controle. Estes resultados demonstraram efetividade na redução de *S. Enteritidis*, sugerindo que superfícies de cobre e suas ligas podem ser utilizadas como um método antimicrobiano complementar no setor avícola para controle deste patógeno importante para a saúde pública.

Palavras-chave: *Salmonella*; biofilme; cobre; propriedades antimicrobianas.

ABSTRACT

Salmonella is considered one of the most relevant pathogens for the poultry production chain, since poultry meat represents the main source of salmonellosis for humans. Serotype *S. Enteritidis* is identified as the most frequently involved in food salmonellosis. In the industry, biofilm control is routinely carried out through sanitization using disinfectants, which have known toxicity and variable efficacy, due to the evolution of antimicrobial resistance. Copper has been applied as a contact surface with antimicrobial power in several countries and can be used as a complement to standard practices of cleaning and disinfection of industrial surfaces, conferring reduction of biofilm formation, reduction of persistent bacterial load and increasing food safety. In this context, this study aimed at evaluating the antimicrobial properties of copper surfaces and their alloys in preventing biofilm formation by *S. Enteritidis* and to evaluate the corrosion potential of surfaces when in contact with disinfectant. To evaluate the antimicrobial activity, coupons with an area of 1 cm², composed of 99.9% copper (C11000), brass (C26000), tin-coated copper and, as a control, stainless steel (AISI 316) were used. The method used was dilution, with planktonic cell suspension testing and bacterial counting using the Drop plate method, with subsequent incubation at temperatures that simulate poultry processing environments (4 °C, 12 °C and 25 °C). Potentiostatic polarization tests, with the same surfaces were performed to evaluate the corrosion potential. Significant statistical differences ($p < 0,05$) in the production of biofilm were observed on copper and brass surfaces when compared to stainless steel and tin-coated surfaces at the three temperatures evaluated. There were no differences in the potential for surface corrosion when in contact with the benzalkonium chloride disinfectant, at concentrations of 100, 200 and 400 ppm, compared to the control. These results demonstrated effectiveness in reducing *S. Enteritidis*, suggesting that copper surfaces and their alloys can be used as a complementary antimicrobial method in the poultry sector to control this important pathogen for public health.

Keywords: *Salmonella*; biofilm; copper; antimicrobial properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ensaio de polarização potencioestática realizado em superfície de cobre 99,9% (C11000).....	39
Figura 2 -	Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de aço inoxidável (AISI 316) submetidos a diferentes formas de esterilização (aumento focal de mag=5.000X).....	40
Figura 3 -	Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de aço inoxidável (AISI 316) submetidos à esterilização por autoclave (aumento focal de mag=5.000X).....	41
Figura 4 -	Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de cobre 99,9% (C11000) submetidos à esterilização por autoclave (aumento focal de mag=5.000X).....	43
Figura 5 -	Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de latão 70%Cu (C26000) submetidos à esterilização por autoclave (aumento focal de mag=5.000X).....	44
Figura 6 -	Micrografias geradas por CLSM da formação de biofilmes por <i>Salmonella</i> Enteritidis nas quatro superfícies avaliadas, quando incubadas a 25°C.....	51
Figura 7 -	Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do cloreto de benzalcônio.....	54
Figura 8 -	Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do cloreto de benzalcônio, analisadas individualmente.....	56
Figura 9 -	Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do hipoclorito de sódio.....	58
Figura 10 -	Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do hipoclorito de sódio, analisadas individualmente.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição metálica das quatro superfícies avaliadas no experimento.....	33
Tabela 2 -	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) obtidas no ensaio de anti-formação de biofilmes por <i>S. Enteritidis</i> para cada superfície a 4°C, 12°C e 25°C.....	45
Tabela 3 -	Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm ⁻²) obtidas no ensaio de anti-formação de biofilmes por <i>S. Enteritidis</i> para cada superfície de acordo com a temperaturas de incubação.....	49
Tabela 4 -	Valores correspondentes às médias das repetições das densidades de corrente de corrosão causada pelo cloreto de benzalcônio nas diferentes superfícies.....	54
Tabela 5 -	Valores correspondentes às médias das repetições das densidades de corrente de corrosão causada pelo hipoclorito de sódio nas diferentes superfícies.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
Ag	Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Água Peptonada Tamponada
BHI	<i>Brain-heart Infusion</i> (caldo cérebro-coração)
C	Carbono
$C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$	Cloreto de Benzalcônio
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (Microscopia confocal)
CMM	Centro de Microscopia e Microanálise
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i> (Contraste de interferência diferencial)
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
Ecor	Potencial de corrosão
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)

Fe	Ferro
FITC	Isômero de isotociato de fluoresceína
GFN	<i>Global Foodborne Infections Network</i> (Rede Global de Infecções Transmitidas por Alimentos)
KCl	Cloreto de Potássio
LACOR	Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais
M	Molaridade
MCVL	Microscópio Confocal de Varredura Laser
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
NaClO	Hipoclorito de Sódio
Ni	Níquel
PPM	Partes por Milhão
PROCOBRE	Instituto Brasileiro de Cobre
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécie Reativa de Oxigênio)
RS	Rio Grande do Sul
Si	Silício
Sn	Estanho
SVS	Serviço de Vigilância em Saúde
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> (Agar Triptona de Soja)
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Soja Tripticaseína)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/cm ²	Unidade Formadora de Colônia por centímetro quadrado
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UTI	Unidades de Terapia Intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
XLD	<i>Deoxycholate Lysine Xylose Agar</i> (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose)
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	<i>Salmonella</i> Enteritidis	18
3.2	Biofilmes na indústria de alimentos	20
3.3	Propriedade antimicrobiana do cobre	21
3.3.1	Aspectos gerais da atividade antimicrobiana	23
3.3.2	Mecanismo de ação do cobre	23
3.3.3	Aplicação do cobre na indústria de alimentos	24
3.3.4	Resistência antimicrobiana ao cobre	25
3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
3.5	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	28
3.6	Ensaio de polarização potencioestática	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Local de estudo	32
4.2	Experimento 1: Avaliação da anti-formação de biofilme por <i>Salmonella</i> Enteritidis	32
4.2.1	Cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis	32
4.2.2	Preparação das superfícies	32
4.2.3	Preparação do inóculo	34
4.2.4	Ensaio de adesão	35
4.2.5	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	36
4.3	Experimento 2: Avaliação da densidade de corrente de corrosão estimada em ensaios de polarização potencioestática	37
4.3.1	Preparação das superfícies	37
4.3.2	Ensaio de Polarização Potencioestática	38
4.4	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1	Experimento 1 - Avaliação da anti-formação de biofilme por <i>Salmonella Enteritidis</i>	40
5.1.1	Efeitos dos métodos de esterilização na superfície dos cupons	40
5.1.2	Efeito das superfícies nas diferentes temperaturas de incubação	45
5.1.3	Efeito das temperaturas na anti-formação do biofilme por <i>Salmonella Enteritidis</i>	49
5.1.4	Microscopia confocal de varredura a laser	50
5.2	Experimento 2 - Avaliação da densidade de corrente de corrosão estimada em ensaios de polarização potencioestática	53
5.2.1	Ensaio de Polarização Potencioestática	53
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A – Lista das cepas utilizadas no estudo	74
	ARTIGO	75

1 INTRODUÇÃO

O mercado avícola é um importante componente econômico de diversos países. Nesse cenário, o Brasil destaca-se como o maior exportador mundial de carne de frango, sendo responsável por mais de 35% da exportação mundial. Além disso, o país ocupa a posição de segundo maior produtor, somente atrás dos Estados Unidos, totalizando cerca de 13 milhões de toneladas de carne produzidas no ano de 2017 (ABPA, 2018). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, em 2017, a região Sul do Brasil foi responsável por 64,35% da produção total de carne de frango. Desse total, o Rio Grande do Sul representou 13,82% da produção (ABPA, 2018). O consumo per capita no Brasil aumentou de 2016 a 2017, atingindo 42,07 Kg/habitante/ano. Essa demanda, no entanto, precisa atender às exigências do mercado, preocupando-se com a sanidade dos planteis e, conseqüentemente, com a inocuidade dos produtos destinados ao consumidor.

Entre os microrganismos de maior preocupação na avicultura, está *Salmonella* spp., responsável por enfermidades tanto em aves como em humanos (FORSYTHE, 2013). Os produtos de origem avícola estão entre as principais fontes de transmissão deste patógeno ao homem. *S. Enteritidis* está entre os cinco sorovares mais comumente isolados de produtos avícolas, representando elevado risco à segurança dos alimentos, sendo responsável nos últimos anos por grande parte dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil e em outros países do mundo (ROBINSOM, 2013).

S. Enteritidis também possui a habilidade de formar biofilmes em diversas superfícies utilizadas na indústria de alimentos, principalmente nos abatedouros-frigoríficos. Diversos estudos comprovam o potencial de *Salmonella* para a formação de biofilmes em diferentes materiais, tais como vidro, polipropileno, poliestireno e aço inoxidável (REUTER *et al.*, 2010; SCHONEWILLE *et al.*, 2012). A formação de biofilmes nas plantas processadoras de alimento aumenta a chance de contaminação dos alimentos e representa um grande risco à saúde do consumidor (ABDALLAH *et al.*, 2014; COLAGIORGI *et al.*, 2017). A adesão de bactérias ao alimento e às superfícies de contato pode aumentar a deterioração do produto, levando a sérias perdas econômicas, além de gerar um maior uso de produtos químicos, o que pode resultar na resistência aos desinfetantes (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Com o objetivo de reduzir o uso de desinfetantes e de antimicrobianos, em 2008 a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) aprovou o uso de ligas de

cobre como superfícies de contato clínico, devido às propriedades antimicrobianas confirmadas. Desde então, as ligas de cobre foram testadas para múltiplos usos. Seu mecanismo de ação, chamado de "morte por contato", pode ser modificado por diferentes fatores, incluindo temperatura, características da liga de cobre, umidade, espécies bacterianas, tipo de contato entre as bactérias e a superfície, estado de oxidação do cobre, entre outros (BLEICHERT *et al.*, 2014; VINCENT *et al.*, 2016). Em relação aos mecanismos que explicam o efeito antimicrobiano do cobre, foi proposto que os íons de cobre liberados das superfícies induzam danos na membrana da bactéria, gerando uma perda do potencial da membrana e do conteúdo citoplasmático. Além disso, espécies reativas de oxigênio produzidas por íons de cobre induzem maiores danos às estruturas celulares e até a degradação do DNA (GRASS *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2017). As superfícies de cobre demonstraram atividade antimicrobiana a uma série de microrganismos de interesse na saúde pública (O’GORMAN; HUMPHREY, 2012) e podem ser utilizadas como um complemento das práticas padrão de limpeza e desinfecção das superfícies para diminuir a carga bacteriana persistente, sem apresentar riscos à saúde pública (EPA, 2008). As superfícies de cobre também podem reduzir a formação de biofilmes e o risco de contaminação cruzada dos alimentos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de superfícies de cobre frente a anti-formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis como uma alternativa ao aço inoxidável para superfícies de contato com alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica de formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis frente à ação antimicrobiana de superfícies de cobre como potencial complemento ao aço inoxidável para superfícies de contato com alimentos e ambientes processadores de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

1. Aplicar a técnica de microscopia eletrônica de varredura a fim de padronizar a qualidade das superfícies por três métodos de esterilização: autoclave (121°C por 30 minutos), forno de Pasteur, (180°C por duas horas) e luz ultravioleta (duas horas para cada lado da superfície).
2. Avaliar a eficácia antimicrobiana de superfícies com diferentes concentrações de cobre (C11000, 99.9% Cu; C26000, 70% Cu) e superfícies de cobre revestido com estanho, na inibição ou na redução da formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis a 25°C, 12°C e 4°C, comparando-as ao aço inoxidável.
3. Aplicar a técnica de microscopia confocal de varredura a laser a fim de se obter informações *in situ* de um biofilme constituído por *Salmonella* Enteritidis em superfícies de cobre.
4. Realizar ensaios de polarização potencioestática, simulando procedimentos de higienização operacional e pré-operacional em abatedouros-frigoríficos, com superfícies de cobre imersas em hipoclorito de sódio e cloreto benzalcônio comparando-as ao aço inoxidável.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Salmonella* Enteritidis

As salmonelas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e móveis, com exceção dos sorovares *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum que não apresentam flagelos peritríquios (TORTORA *et al.*, 2012). Apresentam crescimento em temperaturas de 4°C a 45°C, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C e podem desenvolver-se em pH variando de 4,4 a 9,4 (THRELFALL; FROST, 1990). O habitat natural das salmonelas pode ser dividido em três categorias, com base na especificidade do hospedeiro e no padrão clínico por ele determinado: altamente adaptadas ao homem, incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, agentes da febre entérica; altamente adaptadas aos animais, como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, adaptadas às aves; e a terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem o homem e os animais, designadas salmonelas zoonóticas, as quais são responsáveis por quadros de gastroenterite ou por doenças transmitidas por alimentos (DTA), representadas principalmente por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 2011).

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle. Os padrões diferem de uma região para a outra, devido às diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento (OMS, 1988). Tendo em vista a emergência de novos sorovares e reemergência de outros em determinadas áreas do mundo, o controle torna-se um desafio para a saúde pública, muitas vezes dificultado pela diversidade de sorovares existentes (SILVA, 2015). Infecções por *Salmonella* em humanos são consideradas um grave problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* – WHO) afirma que *Salmonella* é responsável por um em cada quatro casos de diarreia no mundo. Neste ano, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA) reportou a *Salmonella* como principal causa de DTA, sendo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* os sorovares mais comumente associadas com infecções humanas. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Protection* - CDC) dos Estados Unidos estima que todos os anos, um milhão das DTAs nos EUA sejam causadas por *Salmonella*, levando a 19.000 hospitalizações e 380 mortes (CDC, 2017). Conforme

dados de Autoridades em Segurança de Alimentos da Europa (*European Food Safety Authority* – EFSA), em 2017 foram reportados mais de 91.000 casos de salmoneloses em humanos no continente, ocasionando custos de mais de três bilhões de euros. Na China, *Salmonella* é o agente mais comum de doenças bacterianas de origem alimentar, com um número estimado de três milhões de casos anualmente (*China Food and Drug Administration*, 2015).

Salmonella Enteritidis pertence ao grupo de salmonelas paratíficas. Um dos fatores que mais contribuem para a alta incidência de salmonelas paratíficas é a diversidade antigênica que o gênero possui, facilitando sua adaptação a diversos hospedeiros e, conseqüentemente, dificultando o controle (BERCHIERI, 2009). Das salmonelas paratíficas, *S. Enteritidis* é considerada uma das mais patogênicas para o homem, além de ter o potencial de causar doença e mortalidade em aves jovens (BACK; ISHIZUKA, 2010). O consumo de carne e de ovos contaminados por *S. Enteritidis* é a principal fonte de infecção humana (THOMAS *et al.*, 2009).

Nas duas últimas décadas, diversos países têm relatado aumento no número de surtos epidêmicos ocasionados por *S. Enteritidis*, constituindo-se na maior causa de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos nos EUA, Reino Unido e Europa Central (TESSARI *et al.*, 2012). De acordo com informações da Rede Global de Infecções por Alimentos (*Global Foodborne Infections Network* – GFN), o sorovar *S. Enteritidis* esteve em primeiro lugar no ranking dos 15 sorotipos mais frequentemente isolados no homem, animais e alimentos em 2014 na Europa. *S. Enteritidis* representa 85% dos casos de salmonelose na Europa, 38% na Ásia e 31% na América Latina e no Caribe (GALANIS *et al.*, 2006). No Brasil, a partir da década de 90, surgiram diversos relatos de surtos de infecção alimentar em humanos devido, principalmente, à ingestão de produtos de origem avícola (SILVA; DUARTE, 2002).

Em janeiro de 2018, um levantamento do Serviço de Vigilância em Saúde (SVS) apontou *Salmonella* spp. como sendo o principal patógeno envolvido com surtos de DTA no Brasil entre os anos de 2000 a 2017, sendo responsável por mais de 30% dos surtos ocorridos durante este período. *S. Enteritidis* foi designada como o sorovar causador da maior parte das salmoneloses alimentares investigadas pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) do Rio Grande do Sul, entre os períodos de 2007 a 2014 (BRASIL, 2014). O Brasil ainda apresenta problemas de subnotificações em surtos de DTA, o que pode ser explicado pela falta de conhecimento para notificação ou então por um sistema falho (FROTA, 2015).

3.2 Biofilmes na indústria de alimentos

Biofilmes são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), aderidas a um substrato biótico ou abiótico, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (COSTERTON *et al.*, 1999; HOFFMAN *et al.*, 2005; ROSCHE *et al.*, 2009). Há uma variedade de substâncias proteicas, glicoproteicas e glicolipídicas que conferem estabilidade mecânica ao biofilme, facilitam a adesão e formação de uma rede coesa e tridimensional, a qual interconecta e imobiliza o biofilme (FLEMING, 2010).

A formação dos biofilmes nas indústrias processadoras de alimentos é uma grande preocupação, pois estes podem aderir-se fortemente à superfície e, posteriormente, as bactérias desprendem-se da estrutura sésseis e retornam ao seu estado planctônico, podendo contaminar outras superfícies ou até mesmo produtos alimentícios (JOSEPH *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias toxigênicas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* são capazes de formar biofilmes (GALIÉ *et al.*, 2018). Biofilmes formados por cepas de *Salmonella* representam um importante fator de risco, visto que cerca de 50% dos isolados provenientes de ambientes avícolas têm capacidade de formar biofilmes (MARIN; LAINEZ, 2009). Diversas superfícies utilizadas no processamento de alimentos são suscetíveis à adesão ou à formação de biofilme de origem bacteriana. O aço inoxidável é amplamente utilizado em equipamentos e utensílios na indústria de alimentos, devido à superfície lisa e pouco porosa, elevada vida útil e alta resistência à corrosão. Porém, superfícies de aço inoxidável são frequentemente reconhecidas como importantes fontes de contaminação microbiológica (CHMIELEWLKI, 2003).

Os biofilmes são responsáveis pela persistência de bactérias patogênicas em ambientes de processamento de alimentos, assim como pela contaminação dos alimentos processados (COUGHLAN *et al.*, 2016). Além disto, as bactérias que estão aderidas e fazem parte de um biofilme tendem a apresentar uma maior resistência aos desinfetantes e aos antimicrobianos, e se tornam uma fonte de contaminação constante (YIN *et al.*, 2018). Também já foi demonstrado que microrganismos em biofilmes são mais protegidos contra estresses ambientais e até mesmo ao sistema imune do

hospedeiro, conseqüentemente, a sua eliminação é muito mais complexa (STEENACKERS *et al.*, 2012; OGLESBY-SHERROUSE *et al.*, 2014).

Embora os desinfetantes na indústria de alimentos sejam amplamente utilizados para controlar e eliminar a contaminação microbiológica, eles apresentam desvantagens, tais como a toxicidade dos resíduos e, principalmente, a resistência antimicrobiana (LANGSRUD *et al.*, 2003). Para tanto, surge a necessidade de novas alternativas de controle que não sofram a indução de resistência e que sejam seguras à saúde pública. Faúndez *et al.* (2004) sugerem que superfícies de cobre poderiam ser utilizadas para diminuir a carga bacteriana persistente após a limpeza diária de matadouros avícolas, bem como para evitar a formação de biofilme, reduzir a viabilidade de bactérias patogênicas e diminuir a contaminação em áreas onde a carga bacteriana é continuamente renovada.

3.3 Propriedade antimicrobiana do cobre

O estudo das propriedades antimicrobianas das superfícies metálicas de cobre recebeu maior destaque a partir de 2008, quando a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency - EPA*) registrou aproximadamente 300 ligas de cobre com reconhecido potencial antimicrobiano. O registro permite a comercialização do material, baseando-se no fato de o cobre ser capaz de eliminar praticamente toda a contaminação bacteriana em até duas horas (EPA, 2008). Estudos realizados anteriormente já demonstraram o efeito bactericida do cobre e de suas ligas frente a cinco microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* metilina-resistente - MRSA, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*), testadas de acordo com os protocolos da EPA (MICHELS *et al.*, 2009; GRASS *et al.*, 2011; O’GORMAN; HUMPHREY, 2012). A utilização do cobre foi autorizada nos Estados Unidos para a fabricação de produtos para ambientes comerciais, residenciais e de saúde. As superfícies de cobre podem ajudar a evitar a formação de biofilme. Contudo, os patógenos não são eliminados do ambiente (PARRA *et al.*, 2018). A agência norte-americana esclarece que as ligas de cobre devem ser utilizadas como um complemento e não para a substituição das práticas padrão de limpeza e desinfecção das superfícies (EPA, 2008).

A eficiência do cobre como material antimicrobiano tem sido observada tanto em estudos laboratoriais quanto no ambiente hospitalar. Inkinen *et al.* (2016)

demonstraram efeito antimicrobiano em diferentes instalações, incluindo hospitais, creches e lares para idosos. De acordo com estes pesquisadores, o cobre pode servir como uma ferramenta para diminuir a incidência de transmissão de agentes infecciosos de superfícies inanimadas com funções cotidianas. Testes realizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) demonstraram uma redução na taxa de infecção hospitalar e/ou colonização dos pacientes por MRSA de 58% em unidades que utilizam superfícies de cobre quando comparado aos hospitais controle com superfícies convencionais (SALGADO *et al.*, 2013). Michels *et al.* (2015) realizaram ensaios *in vitro* com ligas de cobre, zinco e níquel e observaram uma redução de 99,9% da contaminação. Nos testes *in vivo*, a redução foi de 83%, quando comparados às superfícies de materiais padrão nas salas controle do hospital avaliado. Os autores também sugerem que ligas de cobre apresentam potencial de reduzir não apenas as infecções hospitalares, mas também os custos de tratamento dos pacientes. Outros estudos também já demonstraram que a baixa concentração microbiológica das superfícies de cobre em hospitais ajuda a combater a disseminação de patógenos através da contaminação de superfícies inanimadas no ambiente da saúde (MICHELS *et al.*, 2015; SIFRI *et al.*, 2016; VINCENT; HARTMANN; DEUTSCH, 2016).

Na área de produção animal, a Associação Internacional do Cobre (*International Copper Association - ICA*) do Brasil já demonstrou que a implantação de redes de aquicultura de malha de cobre melhora as condições de sanidade e de produtividade dos aquicultores e, conseqüentemente, há uma redução na necessidade de uso de antimicrobianos e produtos químicos anti-incrustantes (ICA, 2016). Faúndez *et al.* (2004) afirmaram que o cobre metálico pode ser aplicado à área avícola com alta exposição à contaminação bacteriana. Estudos realizados por Depner *et al.* (2016) demonstraram a eficácia das superfícies de cobre frente a bactérias, fungos e leveduras isolados de incubatórios comerciais de aves em menos de uma hora. Parra *et al.* (2018) demonstraram efeito bactericida do cobre contra microrganismos isolados de origem avícola, sendo responsável por significativa redução de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*.

3.3.1 Aspectos gerais da atividade antimicrobiana

Com relação à atividade antimicrobiana do cobre e de suas ligas, estudos concluíram que o efeito antimicrobiano aumenta à medida que a temperatura passa da refrigeração para a temperatura ambiente (FAÚNDEZ *et al.*, 2004; MICHELS *et al.*, 2005; MEHTAR *et al.*, 2008) e à medida que o teor de cobre das ligas aumenta (MICHELS *et al.*, 2005; MIKOLAY *et al.*, 2010, ZHU *et al.*, 2012). De acordo com Zhu *et al.* (2012), as superfícies secas de cobre metálico apresentam maior poder antimicrobiano em relação às mesmas superfícies úmidas. Células expostas a superfícies secas de cobre acumulam grandes quantidades de íons mais rapidamente, quando comparadas às úmidas, pois sofrem extensos danos nas membranas e perdem a integridade celular em poucos minutos (ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2011). As superfícies de cobre manchadas liberam íons cúpricos (Cu^{2+}) mais facilmente, exibindo atividade inibitória mais rapidamente do que as superfícies brilhantes (MICHELS *et al.*, 2005). Entretanto, uma espessa camada de óxido de cobre reduz a atividade antimicrobiana das superfícies de contato (GRASS *et al.*, 2011).

3.3.2 Mecanismo de ação do cobre

O cobre é um micronutriente essencial requerido em quantidades muito pequenas para sobrevivência da maioria dos organismos aeróbicos, contribuindo com numerosos processos metabólicos (ZHU *et al.*, 2012). Em altas concentrações, pode se tornar tóxico e inibir o crescimento microbiano. Por esta razão, é essencial que as células mantenham um sistema intracelular adequado das concentrações de cobre. Os mecanismos de inibição do crescimento celular mediado pelo cobre incluem substituição de íons essenciais, bloqueio de grupos funcionais de proteínas, inativação de enzimas, produção de radicais livres e ruptura da integridade da membrana (OHSUMI *et al.*, 1988; NIES, 1999; MACOMBER; IMLAY, 2009; GRASS *et al.*, 2011).

A toxicidade do cobre ocorre devido a sua tendência em alternar seu estado de oxidação entre cuproso (Cu^{1+}) e cúprico (Cu^{2+}). Em condições aeróbicas, esse ciclo redox leva à geração de radicais hidroxila altamente reativos que danificam as biomoléculas, tais como DNA, proteínas e lipídeos (ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2008; GRASS *et al.*, 2011; SOULI *et al.*, 2013). Fatores que aumentam as espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentam a taxa de morte bacteriana. Assim, a produção de radical hidroxila pela reação de Fenton contribui para a inativação (LEWIS, 2005; MIKOLAY

et al., 2010). Warnes *et al.* (2010) descrevem que o DNA é um dos principais alvos da toxicidade do cobre, levando a sua rápida fragmentação e, conseqüentemente, à morte celular. Além disso, as análises do genoma e dos plasmídeos das células bacterianas recuperadas das superfícies metálicas indicam substancial degradação de DNA após a exposição ao cobre. No entanto, diversos autores afirmam que os danos ao DNA são secundários, ocasionados pela morte celular (GRASS *et al.*, 2011; ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2012; SOULI *et al.*, 2013). A degradação das células se efetua pelos sucessivos danos na membrana, influxo de cobre para as células, danos oxidativos, morte celular e degradação do DNA (SOULI *et al.*, 2013).

A ação de íons de cobre também foi avaliada em vírus e fungos. Noyce *et al.* (2007), estudando a inativação do vírus da Influenza A (H1N1), concluíram que os íons de cobre podem danificar o RNA genômico do vírus, inibindo sua replicação. De acordo com Warnes e Keevil (2013), um dos alvos de toxicidade do cobre é o genoma viral e que um reduzido número de cópias do gene que codifica a proteína viral VPg (*viral protein genome linked*), essencial para a sua infectividade, foi observado após o contato com superfícies secas de cobre e de latão. O mecanismo de ação nas leveduras é semelhante àquele observado para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2012). Já foi demonstrado que células de *Candida albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* absorvem grandes quantidades de íons de cobre quando entram em contato com a superfície antimicrobiana através da despolarização da membrana citoplasmática.

3.3.3 Aplicação do cobre na indústria de alimentos

A manipulação incorreta dos alimentos e a contaminação cruzada durante os processos industriais podem contribuir para a disseminação de diversos microrganismos. Neste contexto, a utilização de materiais que possam diminuir o risco de contaminação das plantas processadoras de alimentos torna-se de extrema importância. Atividade bactericida significativa foi verificada quando isolados de *Salmonella enterica* e de *Campylobacter jejuni* foram colocadas em contato com o cobre (FAÚNDEZ *et al.*, 2004). Noyce *et al.* (2006) avaliaram a capacidade de inativação de *Escherichia coli* em ligas de cobre, com teor cúprico variando entre 61% e 95%, com e sem adição de extrato de carne. Nos dados sem extrato de carne, três ligas foram capazes de inativar completamente as bactérias em até seis horas a 22°C (95%,

93% e 85% Cu). Já com o extrato, apenas uma liga obteve o mesmo resultado (93% Cu).

Faúndez *et al.* (2004) avaliaram a capacidade residual do cobre em alimentos expostos por duas horas às superfícies metálicas de cobre 99,9%, utilizando fragmentos de carne suína e de frango. Em ambas as carnes expostas ao cobre, observou-se cobre residual. Essa absorção teve um pequeno aumento depois dos primeiros 50 minutos e, após esse tempo, os teores tendem a atingir um máximo de 2.5 mg/100 g. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a ingestão diária recomendada de cobre é de 0,9 a 1,6 mg, e o limite máximo é de 10 mg para adultos de 19 a 50 anos. Em condições normais de processamento, o tempo de exposição dos produtos alimentícios às superfícies é de poucos minutos, devendo a aquisição de cobre permanecer muito baixa. Gonçalves *et al.* (2007) afirmaram que somente 40% a 50% do total de cobre são absorvidos e os processamentos como cocção, congelamento *in natura* e congelamento de carnes processadas termicamente reduzem a disponibilidade do metal em 50%, 38% e 26%, respectivamente.

No Brasil, conforme a Resolução RDC nº 20 de março de 2007 da ANVISA que aprova o Regulamento Técnico sobre disposições para embalagens, revestimentos, utensílios, tampas e equipamentos metálicos em contato com alimentos, prevê-se que o cobre, o latão e o bronze não apresentam nenhuma proibição relativa ao seu uso, desde que obedeça à exigência da legislação de que os materiais sejam revestidos com ouro, prata, níquel ou estanho (BRASIL, 2007). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos autoriza a fabricação de produtos destinados à utilização em serviços de saúde e afirma também que tais produtos não representam nenhum risco à saúde pública (EPA, 2008).

3.3.4 Resistência antimicrobiana ao cobre

A resistência ao cobre em superfícies secas ainda é muito discutida. O surgimento e a difusão de bactérias resistentes ao cobre parecem improváveis devido à completa degradação do DNA dos plasmídeos após a morte celular, prevenindo a transferência de resistência entre organismos (GRASS *et al.*, 2011). Pesquisadores verificaram que o DNA de cepas de *Enterococcus* expostas às superfícies de contato de cobre foi rapidamente destruído sem a ocorrência de mutações ou transferência de material genético carreando genes de resistência, o que significa que existem poucas

possibilidades de desenvolvimento de resistência a altos níveis de cobre (WARNES *et al.*, 2010). Entretanto, diferentemente das superfícies secas, já foram isolados microrganismos resistentes na forma de biofilme a partir de tubulações de cobre e de outras superfícies de cobre expostas à água. Bactérias heterotróficas como *Acidovorax delafieldii*, *Pseudomonas* sp. e *Stenotrophomonas maltophilia* já foram isoladas de biofilmes em encanamentos de cobre. Segundo Espírito Santo *et al.* (2008), nesses casos as bactérias são resistentes aos íons liberados pela superfície, o que não ocorreria em superfícies sem a formação de biofilmes. O estresse e as condições de sobrevivência bacteriano estão diretamente relacionados ao cobre nas condições a seco, uma vez que tem sido demonstrado que as células expostas a outras superfícies metálicas, tais como o aço inoxidável, não foram inativadas. Desta forma, o cobre parece ter potencial para destruir a função celular de várias formas, e a ação simultânea de muitos desses mecanismos pode reduzir a possibilidade de os microrganismos desenvolverem resistência (MICHELS *et al.*, 2005).

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise micro estrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de fácil interpretação (DEDAVID *et al.*, 2007). A MEV iniciou com o trabalho de M. Knoll (1935), descrevendo a concepção deste tipo de microscópio. O primeiro microscópio eletrônico de varredura para observação de amostras espessas foi construído em 1942, usando o detector de elétrons secundários para obter a imagem. Em 1965, obteve-se o primeiro modelo comercial e, desde então, muitos avanços têm sido feitos, principalmente em relação às fontes de elétrons, e à parte eletrônica e computacional (SKOOG *et al.*, 2007).

O princípio básico deste tipo de microscópio consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície amostral, transmitindo o sinal do detector por linhas sucessivas a uma tela catódica, cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. O sinal de imagem resulta na interação do feixe incidente com a superfície da amostra, e a observação é permitida a partir do sinal recolhido pelo detector (DEDAVID *et al.*, 2007). A principal razão de sua utilização é a alta resolução que pode ser obtida das amostras, uma vez que é capaz de alcançar uma

resolução de 1 nm (NAGATANI *et al.*, 1987). Outra característica importante da MEV é a aparência tridimensional da imagem obtida das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite também a análise em pequenos aumentos, o que complementa a informação dada pela imagem óptica (MANNHEIMER, 2002).

A preparação das amostras é mais demorada, quando comparado a Microscopia Confocal de Varredura a Laser, visto que inclui processos de desidratação e fixação do material (NEUT *et al.*, 2005). Quando a amostra não contém material orgânico para avaliação, é necessário verificar se a espécie é composta por material condutor. Se não for, deve-se recobri-la com ouro ou carbono, caracterizados por terem uma boa condutibilidade. Materiais biológicos, após passar pelos processos de fixação e desidratação, são transferidos para o equipamento de secagem ao ponto crítico no CO₂ (*Critical Point Drying* - CPD) até remoção total do etanol ou da acetona utilizados na fixação do material. A amostra é removida da câmera quando a tensão superficial for igual a zero e todo líquido for convertido em gás. A amostra pode então ser montada em um suporte metálico e metalizada com ouro ou carbono para ser observada na MEV (DEDAVID *et al.*, 2007).

Diversas técnicas de microscopia podem ser utilizadas para a visualização dos processos de aderência, crescimento e formação do biofilme. Com o surgimento de novas tecnologias, incluindo a MEV, a Microscopia Confocal de Varredura a Laser (*Confocal Laser Scanning Microscopy* - CLSM), a Microscopia de Contraste Diferencial (*Differential Interference Contrast* - DIC) e outras técnicas, foram descritas diversas informações sobre a estrutura dos biofilmes. A visualização da microtopografia dos biofilmes é muito importante, pois fornece a possibilidade de análise desde o início dos agregados celulares até a formação praticamente consolidada das substâncias poliméricas extracelulares, além da observação de rugosidade dos materiais (SOUZA *et al.*, 2016).

Dalla Costa *et al.* (2017) constataram uma maior adesão de *Pseudomonas aeruginosa*, através da MEV, quando comparada aos métodos de quantificação de biofilmes não visuais (quantificação de células viáveis em biofilme e biomassa). Arnold e Bailey (2000) utilizaram a MEV para identificar os fatores que tornam os acabamentos de superfícies utilizadas em matadouros-frigoríficos suscetíveis ou resistentes à fixação bacteriana e à formação de biofilme. Através da técnica, foi possível identificar quais superfícies e materiais facilitam a adesão de biofilme, contribuindo na escolha dos equipamentos e na segurança do alimento. De acordo com

Wimpenny *et al.* (2000), a MEV pode oferecer informações úteis sobre a superfície estrutural de um biofilme, apresentando mais um dado para o trabalho e enriquecendo a pesquisa sobre estas estruturas.

3.5 Microscopia confocal de varredura a laser

O desenvolvimento da Microscopia Confocal de Varredura a Laser (*Confocal Laser Scanning Microscopy - CLSM*) iniciou no século XIX, em meados dos anos 80, impulsionado pela necessidade de se visualizar imagens biológicas da mesma forma que seria visto *in vivo*. O princípio básico dos microscópios confocais consiste na utilização de laser com fonte de luz. Um feixe de laser expandido e alinhado ao eixo óptico da objetiva focaliza um volume limitado pela difração da luz dentro da amostra, levando a uma iluminação pontual desejada. A luz refletida ou a fluorescência emitida pela amostra é captada pela mesma objetiva, passando por um espelho dicróico para formar a imagem. A imagem formada estará em um plano focal conjugado (confocal) ao ponto iluminado e será projetada sobre um detector (GOMES; SOUZA JR, 2010).

A preparação das amostras na CLSM quando comparada com à MEV é de fácil execução, visto que não requer as etapas de fixação, lavagem e desidratação (NEUT *et al.*, 2005). Entretanto, para as análises de CLSM é importante possuir parâmetros de interpretação da técnica, além de fundamental calibragem do avaliador e padronização do foco a ser avaliado em todas as imagens. Uma grande variedade de corantes pode ser empregada para diversas finalidades em associação com a CLSM. Dentre eles, destaca-se o grupo SYTO9, utilizado para estudos de composição e de morfologia de biofilmes (STRATHMANN; WINGERNDER; FLEMMING, 2002). Os corantes fluorogênicos do grupo Syto são responsáveis por corar ácidos nucleicos, o qual se difunde passivamente através das membranas celulares e fitas de DNA de células vivas e mortas. Considerando-se que o DNA é um constituinte importante da matriz extracelular dos biofilmes, esta coloração fornece informações relevantes a respeito da biomassa total, emitindo fluorescência vermelha (PEETERS, NELIS, COENYE, 2007). O corante DAPI (4',6-diamino-2-fenilindo) também é um marcador fluorescente muito útil, assim como compostos com iodeto de propídio que permitem a diferenciação de células vivas e mortas (MOREIRA; LINS, 2010). Além desses, existe o isômero de isotiociano de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate - FITC*), responsável por conjugar proteínas através do grupamento amina (GOLIN *et al.*, 2007). A CLSM, em combinação com a

microscopia Raman (RM), para a caracterização de biofilmes multiespécies, permite uma visão mais profunda da estrutura química das substâncias poliméricas extracelulares da matriz de biofilme (WAGNER *et al.*, 2009).

O uso de CLSM no estudo de biofilmes vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, principalmente com foco em microrganismos de importância na indústria de alimentos e, conseqüentemente, na saúde pública. Esta técnica possibilita avaliações *in situ*, diferenciando-se da MEV, a qual apresenta limitações já descritas anteriormente. A habilidade de avaliar a matriz do biofilme é vista como outra vantagem que a técnica apresenta, tendo em vista que a matriz permanece intacta durante o processo de preparação da amostra (PADDOCK, 1999; DONLAN, COSTERTONE, 2002). Como método de análise em pesquisas, a CLSM é muito utilizada para estudos com biofilmes devido à natureza não invasiva, estrutura tridimensional (3D) e, conseqüentemente, observação e determinação da localização exata da distribuição espacial de células bacterianas com a identidade de diferentes componentes (MCLEAN *et al.*, 2008). Wang *et al.* (2013) realizaram um estudo visando caracterizar a formação de biofilmes de *Salmonella* em aço inoxidável nos ambientes de processamento de carne. Através do uso do corante Syto, pode-se analisar o comportamento morfológico da *Salmonella* ao longo de sete dias na superfície testada. Bronnec *et al.* (2016) utilizou esta técnica a fim de avaliar a estrutura do biofilme de *Campylobacter jejuni* em poliestireno, utilizando a coloração Syto. A partir dos resultados, os autores puderam afirmar que este microrganismo é capaz de formar biofilme tanto em condições de aerobiose quanto de microaerofilia. O uso da CLSM é uma importante ferramenta para a pesquisa com amostras biológicas. Contudo, ainda há uma carência de trabalhos com bactérias importantes para a saúde pública e não existem relatos na literatura sobre o efeito antimicrobiano das superfícies de cobre comparadas e visualizadas através da CLSM.

3.6 Ensaio de polarização potencioestática

A corrosão é definida como um desgaste ou alteração gradual por um processo de oxidação química ou eletroquímica. A rápida corrosão pode ser desencadeada por diversos fatores como umidade, velocidade ou acidez da água, movimento do metal, aumento da temperatura, aeração, presença de certas bactérias ou por outros fatores menos prevalentes (SILVA *et al.*, 2015). Todos os metais estruturais possuem algum grau de corrosão em ambientes naturais. Cobre, bronze, latão, aço inoxidável, zinco e

alumínio corroem lentamente, dependendo das condições em que são colocados, e espera-se que eles resistam por longos períodos sem proteção. A corrosão de ferro e aço, no entanto, ocorre rapidamente, a menos que o metal esteja amplamente protegido (HUANG *et al.*, 2013).

A indústria está constantemente procurando respostas rápidas e seguras para a avaliação dos produtos e dos serviços oferecidos pelo mercado de análises, a fim de combater a corrosão. São vários os ensaios de corrosão que podem ser realizados, sendo alguns normalizados. Todas visam o modo mais seguro de prever como a corrosão acontece nas condições reais de operação. Segundo a Associação Brasileira de Corrosão, a corrosão acelerada pode ser avaliada através de ensaios de imersão, câmara úmida e névoa salina (ABRACO, 2019). Como ensaios eletroquímicos, destacam-se as análises estimadas por curvas de polarização, tais como o potencial de corrosão, densidade de corrente de corrosão, impedância eletroquímica e como ensaios complementares a MEV, Microscopia de Força Atômica, Microscopia de elétrons Auger (ABRACO, 2019; PORPINO *et al.*, 2011). Todos com o objetivo de controle de qualidade de produtos, caracterização do meio de exposição e verificação de desempenho.

Ensaio eletroquímicos em corrente contínua são realizados para análise dos potenciais dos eletrodos, devido à passagem de corrente por eles (método galvanostático) ou para análise da corrente, devido à aplicação de potencial (método potencioestático, mais comum). Suas representações gráficas chamam-se curvas de polarização. A polarização é o fenômeno que gera a alteração do potencial de equilíbrio de um eletrodo, quando há a passagem de uma corrente elétrica por ele (EBRAHIMI *et al.*, 2012). O ensaio de polarização potencioestática é um procedimento que visa demonstrar o comportamento eletroquímico da amostra com o tempo, quando submetida a potenciais constantes onde se tem variação contínua do potencial de eletrodo, modificando-se ponto a ponto e medindo-se a corrente correspondente, após sua estabilização. Após realização da polarização, uma das análises que pode ser feita é a avaliação da densidade de corrente de corrosão, através da curva de aproximação da equação de Butler-Volmer. Esta análise, na literatura, considera somente a comparação logarítmica dos resultados, pois a comparação entre superfícies é realizada pelo número de vezes em que uma superfície é melhor do que a outra (FLEXER, 2015; GAN, 2016; LIU, 2014; ZHANG, 2015a).

Apesar dos diversos estudos realizados para avaliar o potencial de corrosão de cobre e de suas ligas e, principalmente de aços inoxidáveis, ainda são poucos os trabalhos que avaliam esse potencial quando a superfície está em contato com desinfetantes utilizados na higienização pré-operacional e operacional na indústria avícola, além de avaliar a possível interação deles com os microrganismos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

O experimento 1 foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), exceto as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, que foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS. O experimento 2 foi realizado no Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais (LACOR), localizado na Faculdade de Engenharia de Materiais da UFRGS.

4.2 Experimento 1 - Avaliação da anti-formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis

4.2.1 Cepas de *Salmonella* Enteritidis

Para a realização deste experimento foram utilizadas dez cepas de *S. Enteritidis* previamente avaliadas quanto ao potencial de formação de biofilme a $4\pm 1^\circ\text{C}$, $12\pm 1^\circ\text{C}$ e $25\pm 1^\circ\text{C}$ (CARVALHO, 2019; BORGES *et al.*, 2018). As informações referentes à origem e ao ano de isolamento dos isolados estão descritas no APÊNDICE A. Todas as cepas pertencem à bacterioteca do CDPA e se encontram estocadas a -80°C em caldo infusão cérebro-coração (*Brain Heart Infusion Both* - BHI) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) com 25% de glicerol (Synth; Diadema, Brasil). As cepas foram reativadas em caldo BHI e posteriormente cultivadas em ágar de desoxicolato lisina xilose (*Xylose Lysine Desoxycholate Agar* – XLD) (Merck; Darmstadt, Alemanha) e confirmadas quanto à pureza.

4.2.2 Preparação das superfícies

Os cupons foram fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Cobre (PROCOBRE) (São Paulo, Brasil) e foram confeccionados nas dimensões de 1 cm (largura) x 1 cm (comprimento) x 0,1 cm (espessura). A Tabela 1 descreve a composição das ligas testadas neste estudo.

Tabela 1 – Composição metálica das quatro superfícies avaliadas no experimento.

Metal	SNU ^a n°	Composição (%)						
		Cu	Zn	Sn	Ni	Mn	Fe	Cr
Cobre eletrolítico	C11000	99,9						
Latão	C26000	70	30					
Cobre Estanhado	Cu + Sn	*		*				
Aço inoxidável ^b	AISI 316				10	2	68,92	16

Legenda:

Cobre (Cu), zinco (Zn), estanho (Sn), níquel (Ni) manganês (Mn), ferro (Fe) e cromo (Cr).

^a Sistema de Numeração Unificado

^b Aço inoxidável também contém 0,08% C, 1% Si e 2% Mo.

* Cobre estanhado não é considerado uma liga, somente revestimento do cobre integralmente com estanho.

O aço inoxidável (AISI 316) foi utilizado como superfície controle, visto que este material é amplamente encontrado em abatedouros-frigoríficos de aves e não apresenta potencial antimicrobiano. O cobre eletrolítico (C11000, 99.9% Cu) representa o teor máximo de cobre a ser encontrado, e o latão (C26000, 70% Cu/30% Zn) é uma liga metálica de cobre e zinco. As superfícies de cobre foram revestidas integralmente por estanho (Sn) para seguir a Resolução RDC n° 20, de 22 de março de 2007 que aprova o "Regulamento Técnico sobre Disposições para Embalagens, Revestimentos, Utensílios, Tampas e Equipamentos Metálicos em Contato com Alimentos" e prevê no item 3.1.6 que cobre, latão ou bronze revestidos integralmente por uma capa de ouro, prata, níquel ou estanho tecnicamente puros podem ser empregados na elaboração de equipamentos e embalagens metálicos em contato com alimentos. O revestimento foi realizado pela empresa Magnum Metalúrgica Ltda, localizada em Cachoeirinha (RS).

4.2.2.1 Avaliação da qualidade das superfícies

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada com o intuito de padronizar a qualidade das superfícies e do método de esterilização a ser utilizado na sequência experimental. Desta forma, minimiza-se a possibilidade de variáveis que poderiam interferir no processo de adesão do biofilme.

Inicialmente, um único cupom de cada superfície (aço inoxidável - AISI 316, cobre - C11000, latão - C26000) e cobre revestido com estanho) foi submetido aos procedimentos de limpeza manual com auxílio de esponja não abrasiva, água e detergente neutro líquido. Em seguida foi feito o enxague com água destilada, imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de um novo enxague com água destilada. Por fim, as superfícies foram submetidas a três diferentes métodos de esterilização: autoclave a 121°C por 30 minutos, forno de Pasteur a 180°C por duas horas e luz ultravioleta por duas horas para cada lado da superfície. Desta forma, foi possível avaliar as interferências de temperatura e de pressão na qualidade dos cupons, tendo em vista que altas temperaturas e pressão podem causar a destruição estrutural das superfícies metálicas. Para cada superfície foi avaliado um cupom controle, sem passar por nenhum método de esterilização. A visualização das imagens foi realizada em microscópio eletrônico Zeiss EVO MA 10 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operando a 8 kV.

4.2.3 Preparação do inóculo

O preparo dos inóculos para os ensaios com biofilmes foi realizado de acordo com Stepanovik *et al.* (2007), com adaptações. Inicialmente, as cepas de *S. Enteritidis* foram enriquecidas em tubos contendo 3 mL de caldo BHI e incubadas durante 18-24 horas a 37±1°C em estufa bacteriológica. A partir deste cultivo, os isolados foram plaqueados em ágar tripticase de soja (*Tryptone Soy Agar* – TSA) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) a 37±1°C por 18-24 horas. Posteriormente, uma colônia do TSA foi inoculada em caldo tripton de soja sem glicose (*Tryptone Soy Both Without Dextrose* – TSB) (Difco Laboratories; Detroit, Estados Unidos), seguido de incubação por ±18 horas a 37±1°C. As turvações do TSB foram ajustadas até a escala 1 de McFarland (3×10^8 UFC/mL), correspondendo a um intervalo de 0,224 a 0,300 em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm (SP-22 – Biospectro; São Paulo, Brasil).

4.2.4 Ensaio de adesão

Para a avaliação da anti-formação de biofilme, cada superfície foi testada em triplicatas biológicas em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços de fundo plano (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). Em cada poço foi adicionado um cupom e 3 mL do inóculo, e as placas foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ (simulando a temperatura ambiente de processamento de matadouros-frigoríficos), $12\pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura máxima da sala de cortes permitida pela legislação brasileira) e $4\pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura da sala refrigeração) (BRASIL, 1998), durante 24 horas.

Após a incubação, os cupons de cada material foram retirados dos meios de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e lavados com 5 mL de água peptonada 0,1% (APT) (Merck; Darmstadt, Alemanha) para a remoção de células planctônicas. Em seguida, os cupons foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de APT 0,1% e homogeneizados com esferas de vidro em agitador vórtex (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) durante um minuto para a desadesão das células sésseis.

A contagem bacteriana de cada cupom foi realizada através de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) em tubos contendo solução salina a 0,85%. Como alternativa para o método de espalhamento em superfície para inoculação de microrganismos em placa, foi utilizado o método de contagem em gota (*Drop Plate*). Nesse método, a placa contendo ágar XLD foi dividida em quatro quadrantes e em cada um foram inoculadas cinco gotas de 10 μL de cada diluição da amostra. As placas foram incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas em condições de aerobiose para posterior contagem das colônias (UFC). Para determinar a contagem microbiológica no cupom (UFC/ cm^2), foi considerada a área de superfície dos dois lados do cupom, assim como a área lateral, conforme ilustrado na fórmula a seguir (GEHLEN, 2016):

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

Sendo:

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

Va: volume da alíquota utilizada no plaqueamento (0,01 mL)

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

D: diluição utilizada na contagem

A: área do cupom (2,4 cm²)

4.2.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A Microscopia Confocal de Varredura a Laser foi realizada para visualização *in situ* das células bacterianas e comparação da adesão de biofilmes nas diferentes superfícies. A preparação do material para execução dos ensaios foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido pelo Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Duas cepas de *S. Enteritidis* (n° 217 e n° 233) foram selecionadas para avaliação, sendo elas formadoras de biofilme a 25±1°C, 12±1°C e 4±1°C. O teste foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços contendo um cupom de cada superfície em cada poço. Primeiramente, foram adicionados 3 mL do inóculo padronizado a 10⁸UFC/mL em cada poço, seguido de incubação da placa a 25°C, 12°C e 4°C, durante 24 horas. Após, foi realizada a lavagem dos cupons com 5 mL de água destilada estéril para remoção das células planctônicas não aderidas.

Um volume de 2 µL de uma mistura 1:1 de corantes fluorescentes SYTO9 (estoque 3,34 mM em DMSO) e iodeto de propídio (IP; estoque 20 mM em DMSO) do *LIVE/DEAD*[®] *BacLight*TM *Viability Kit* (Invitrogen; Carlsbad, Estados Unidos) foi adicionado a 497,5 µL de solução salina 0,85% estéril. Um total de 50 µL desta solução foi depositado sobre os cupons. A placa contendo os cupons foi então incubada em temperatura ambiente e protegida da luz por 15 minutos para permitir a marcação fluorescente das bactérias. Durante a captação da imagem pela microscopia confocal, o corante SYTO9 emite uma fluorescência verde, indicando a membrana intacta das células bacterianas vivas, enquanto que o iodeto de propídio emite fluorescência vermelha e marca as células bacterianas mortas com membranas danificadas. Desta forma, diferenciam-se as células vivas das células mortas.

As análises foram realizadas no CMM – UFRGS em microscópio confocal modelo *FluoView*TM FV10000 (Olympus® Inc. Tóquio, Japão), onde se reconstruiu tridimensionalmente as seções no eixo Z. A análise e o processamento das imagens foram feitos utilizando-se o *software Olympus FluoView v.4*.

4.3 Experimento 2 - Avaliação da densidade de corrente de corrosão estimada em ensaios de polarização potencioestática

Foram realizadas análises eletroquímicas de polarização potencioestática para a avaliação das diferentes superfícies contra a corrosão quando em contato com dois desinfetantes, cloreto de benzalcônio ($C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$) e hipoclorito de sódio (NaClO), simulando produtos comumente utilizados na higienização pré-operacional e operacional em matadouros-frigoríficos de aves. Foram utilizadas concentrações de 100, 200 e 400 ppm dos dois desinfetantes. Em ambos desinfetantes, a concentração de 200 ppm corresponde ao limite máximo liberado pelo Código de Regulamentações Federais do *Food and Drug Administration* (FDA, 2018). Também foram avaliadas a metade e o dobro do permitido para se determinar possíveis variações de atividade corrosiva em diferentes concentrações.

4.3.1 Preparação das superfícies

A preparação do material para execução dos ensaios e as avaliações foram realizadas de acordo com o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Corrosão, Proteção e Reciclagem de Materiais (LACOR) da UFRGS.

Para a realização dos ensaios de polarização potencioestática, foram confeccionados corpos de prova nas dimensões de 10 cm (comprimento) x 5 cm (largura) x 0,1 cm (espessura) dos mesmos materiais avaliados no Experimento 1: cobre 99,9% (C11000), latão 70% Cu (C26000), cobre revestido com estanho e aço inoxidável (AISI 316) como controle. Primeiramente, foi realizado o processo de jateamento abrasivo nas superfícies para verificar o efeito da rugosidade no ângulo de contato. Para esta modificação, foram utilizadas partículas de 50 μm de óxido de alumínio. Em seguida, todas as amostras foram lavadas com detergente comercial e água. Após, as superfícies foram imersas em solução diluída em 1:10 partes de água com desengraxante alcalino por 10 minutos a uma temperatura de $\pm 65^\circ C$. As amostras foram

lavadas sucessivamente com água corrente e água deionizada e verificadas quanto à efetividade do desengraxe através do teste de quebra d'água para posterior secagem com jato de ar quente.

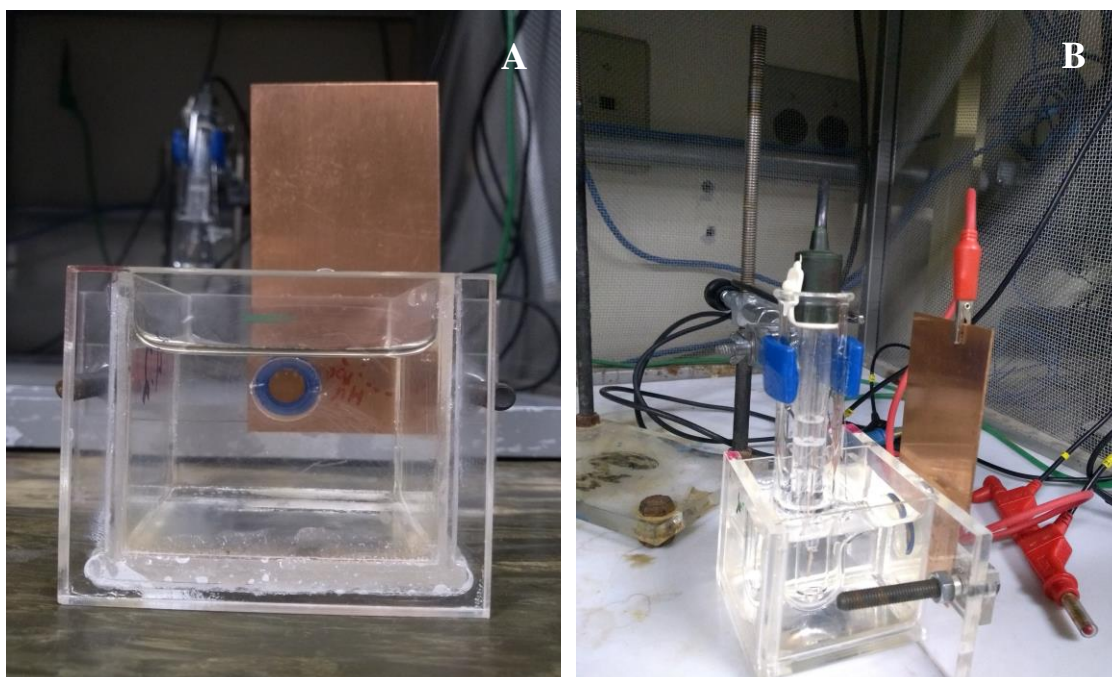
4.3.2 Ensaio de Polarização Potenciostática

O ensaio de polarização potenciostática foi realizado após 5 minutos de potencial de circuito aberto (OCP) para a estabilização do potencial após imersão na solução. No ensaio, a solução de 0,1 mol/L de NaCl, o eletrodo de platina e o eletrodo de Ag/AgCl de KCl saturado foram utilizados como eletrólito, contra eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente. Os ensaios de cada amostra foram realizados em duplicata.

Para todas as medidas foram utilizadas soluções de NaCl 0,1 mol/L (pH 6,0) com área exposta de 0,6 cm² do eletrodo de trabalho. Os potenciais apresentados nos resultados estão expressos em relação ao potencial do eletrodo de referência utilizado. Uma gaiola de Faraday foi utilizada para evitar interferências eletromagnéticas externas no sinal. O equipamento utilizado para as análises eletroquímicas foi o Autolab PGSTAT 302 (Ecochemie®, Holanda) com a interface Nova. A polarização potenciostática foi configurada para iniciar em -500 mV_{OCP} e terminar em +800 mV_{OCP} com uma velocidade constante de 10 mV/s e um passo de 1 mV. Após realização da polarização, as curvas foram analisadas pela densidade de corrente de corrosão através da curva de aproximação da equação de Butler-Volmer.

A Figura 1 demonstra a realização dos ensaios de polarização potenciostática realizados pelo equipamento Autolab PGSTAT 302.

Figura 1 – Ensaio de polarização potencioestática realizado em superfície de cobre 99,9% (C11000).



Legenda: (A) Superfície de cobre (área de 0,6 cm²) exposta ao eletrodo de trabalho, fixada à célula de poliestireno e imersa em solução de desinfetante diluído. (B) Circuito montado para iniciar o ensaio de polarização potencioestática.

4.4 Análise estatística

O programa GraphPad Prism (GraphPad Software; San Diego, EUA) foi utilizado para a análise estatística dos dados. Foi adotado como referencial para as análises um nível de significância de 5%. Os resultados obtidos na adesão do biofilme bacteriano nas diferentes temperaturas e superfícies foram analisados por meio da análise de variância com comparação das médias realizadas com o teste de Bonferroni.

Após realização da polarização, as curvas obtidas no experimento 2 foram analisadas pela densidade de corrente de corrosão através da curva de aproximação não-linear da equação de Butler-Volmer realizadas com a interface Nova, com posterior comparação gráfica das médias (log A/cm²) pelo programa Origin® (OriginLab Corporation; Washington, EUA).

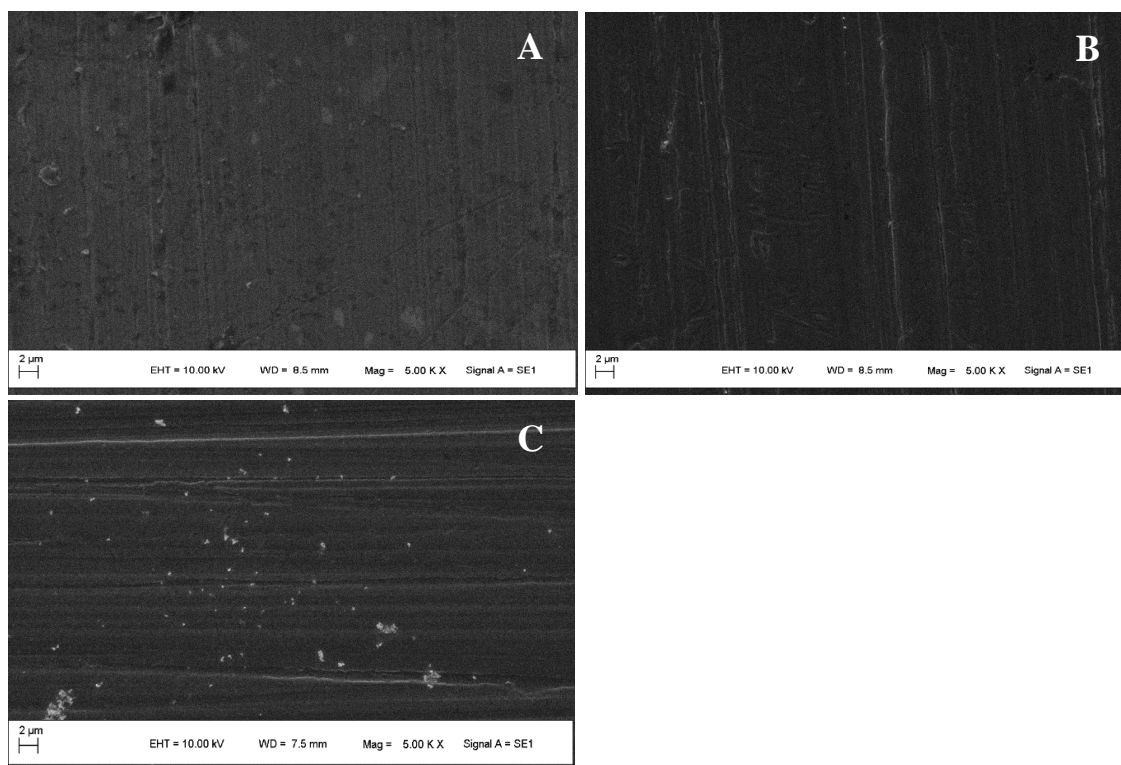
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1 - Avaliação da anti-formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis

5.1.1 Efeitos dos métodos de esterilização na superfície dos cupons

A análise das superfícies através da MEV demonstrou que a esterilização dos cupons de aço inoxidável (AISI 316) através do forno de Pasteur (180°C) e com a luz ultravioleta não acarretou em alterações estruturais na superfície, quando comparada ao controle (cupom sem tratamento de esterilização) (Figura 2).

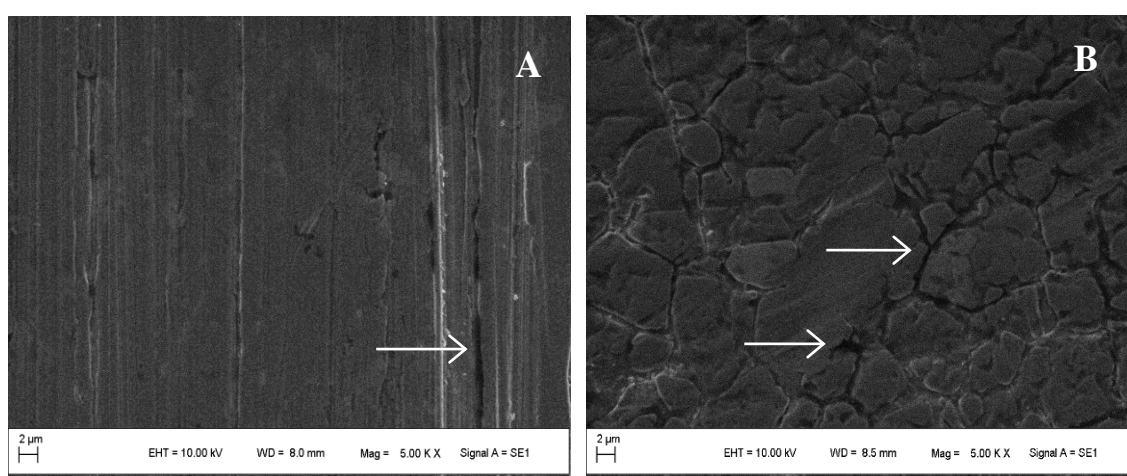
Figura 2 - Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de aço inoxidável submetidos a diferentes formas de esterilização (aumento focal de mag=5.000X).



Legenda: (A) Superfície sem métodos de esterilização (controle). (B) Superfície com esterilização através do forno de Pasteur, não apresentando alterações na estrutura. (C) Superfície com esterilização através de luz ultravioleta, não apresentando alterações na estrutura.

Ao contrário da esterilização dos cupons por forno de Pasteur e por luz ultravioleta, a utilização de autoclave (121°C por 30 minutos) provocou interferência na estrutura metálica. A alteração da estrutura do aço inoxidável foi devida ao efeito sinérgico de alta temperatura e de alta pressão presentes no processo de autoclavagem (Figura 3).

Figura 3 - Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de aço inoxidável (AISI 316) submetidos à esterilização por autoclave (aumento focal de mag=5.000X).



Legenda: (A) Superfície esterilizada através de um único uso de autoclave. (B) Superfície esterilizada através de três usos consecutivos de autoclave. As setas indicam as porosidades formadas após a esterilização.

Apesar de apresentar uma resistência à corrosão superior à maioria dos metais em meios muito agressivos, o aço inoxidável pode sofrer corrosão, prejudicando a sua durabilidade (MEYLHEUC *et al.*, 2006). Segundo o Instituto Americano do Ferro e do Aço (*American Iron and Steel Institute – AISI*), o aço inoxidável corresponde a uma liga composta por ferro e cromo. O aço inoxidável AISI 316 contém de 18 a 20% de cromo, 8 a 10,5% de níquel, além de ferro e outros componentes em concentrações menores. É um dos aços inoxidáveis mais utilizados na indústria de alimentos. O cromo é o elemento de liga mais importante, pois é o mais eficiente contra a corrosão quando empregado em teores acima de 10%. Entretanto, na presença do calor, o cromo só será eficiente se o seu teor for superior a 20% (BRESSAN *et al.*, 2008). O uso da autoclave e, conseqüentemente, de altas temperaturas e pressão, remove a película protetora do cromo, levando a uma menor resistência à corrosão e na formação de pites, que podem influenciar nos resultados (MOAYED *et al.*, 2003). A corrosão por pite, também

chamada de puntiforme, gera cavidades em pontos ou em pequenas áreas localizadas na superfície metálica (Figura 3B) (HONG; NAGUMO, 1997). A corrosão por pites ocorre devido à remoção da película passivadora formada a partir da alta afinidade do cromo com o oxigênio, constituindo uma fina camada de óxido de cromo. Esta camada passiva é a responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável (LAYCOCK *et al.*, 1998). Os cupons testados neste experimento foram esterilizados em autoclave por três vezes consecutivas. Ressalta-se que quanto mais vezes os cupons passarem pelo uso da autoclave, maior será o processo de corrosão e destruição metálica (SCHALCH *et al.*, 2004).

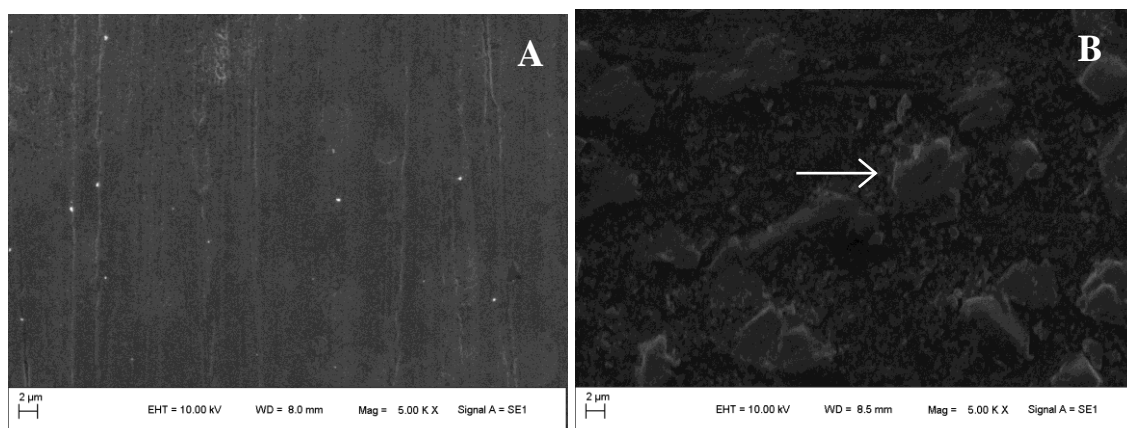
Ciuccio *et al.* (2010) avaliaram a resistência de instrumental cirúrgico de aço inoxidável (M340) à esterilização em autoclave, à corrosão e à exposição térmica. Os autores não observaram corrosão em sua estrutura, mas destacaram que outras ligas podem não ter o mesmo resultado. Apesar de os instrumentais cirúrgicos avaliados por estes autores serem de aço inoxidável, as ligas utilizadas são diferentes daquelas presentes em matadouros-frigoríficos, que usualmente não sofrem processos de esterilização pela autoclave e, conseqüentemente, sem interferência de pressão. Entretanto, é importante ressaltar que estas superfícies estão expostas a altas temperaturas. Conforme o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (BRASIL, 2017), os dispositivos ou mecanismos que promovam a sanitização com água renovável devem estar à temperatura mínima de 82,2°C. A diferença na composição das ligas é uma possível justificativa para a diferença entre os resultados encontrados no experimento em relação ao estudo de Ciuccio *et al.* (2010).

A literatura demonstra divergências sobre a influência da rugosidade da superfície na maior ou menor adesão microbiana. Casarin *et al.* (2014) não encontraram influência da rugosidade das superfícies de aço inoxidável na adesão de *Salmonella* Enteritidis e de *Listeria monocytogenes*. Resultados semelhantes foram encontrados por Tide *et al.* (1999) e Chia *et al.* (2009), os quais também não observaram correlação entre a rugosidade da superfície e a adesão bacteriana. Por outro lado, Walsh *et al.* (1993) concluíram que os microrganismos têm predileção para se fixar em áreas susceptíveis e com destruição metálica em decorrência de corrosão, acelerando ainda mais este processo. Siqueira e Araújo (2012) observaram que qualidade do material e o pH do ambiente facilitam a proliferação de bactérias indutoras de corrosão (*Corrosion Inducing Bacteria* - CIB), ocorrendo a formação de pites, onde as bactérias terão uma maior chance de colonização. Resultados semelhantes já foram observados,

demonstrado que há uma maior adesão de biofilme por CIBs ao longo do tempo em áreas influenciadas pela corrosão (VIDELA, 1995; JIA *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2018). Sugere-se em trabalhos futuros o estudo da influência da corrosão por pites gerada pela autoclave na adesão e na formação de biofilme por *S. Enteritidis* e outros microrganismos de interesse.

A análise das superfícies de cobre 99,9% através da MEV demonstrou que a esterilização através do forno de Pasteur (180°C) e com a luz ultravioleta não acarretou em alterações estruturais na superfície, quando comparada ao controle. Diferentemente das superfícies de aço inoxidável, não houve alterações estruturais quando as superfícies de cobre foram esterilizadas em autoclave por uma única vez. Contudo, o uso da autoclave por três vezes consecutivas resultou na formação de óxido de cobre (CuO) na superfície (Figura 4).

Figura 4 - Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de cobre 99,9% (C11000) submetidos à esterilização por autoclave (aumento focal de mag=5.000X).



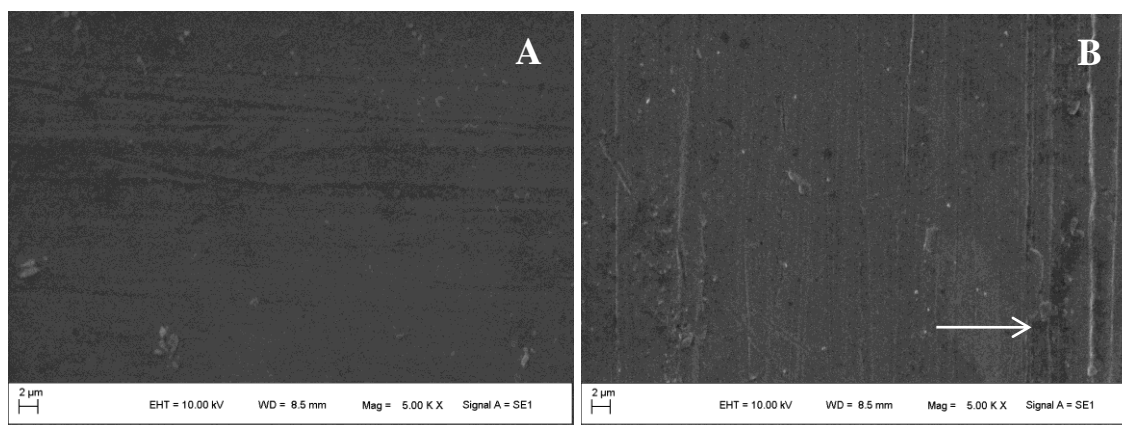
Legenda: (A) Superfície esterilizada através de um único uso de autoclave. (B) Superfície esterilizada através de três usos consecutivos de autoclave. A seta indica a formação de CuO após a esterilização.

Uma pesquisa feita por Elguindi *et al.* (2011) avaliou a atividade antimicrobiana das superfícies de cobre com e sem inibidores de corrosão aplicados à superfície frente a cepas de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*. Nas superfícies sem inibidores de corrosão, formou-se uma espessa camada de óxido de cobre quando expostas a altas temperaturas. Essa camada mostrou significativa redução da ação antimicrobiana em mais de 30% para os dois microrganismos, quando comparada às superfícies sem a formação de óxido de cobre. Por outro lado, Grass *et al.* (2011) afirmam que as propriedades antimicrobianas são duradouras e não diminuem com limpezas

intermitentes ou com a formação de óxido na superfície. Sabe-se que a formação do óxido de cobre ocorre quando o material é exposto a altas temperaturas e à umidade por longos períodos (LI; MAYER; COLGAN, 1991). Entretanto, os procedimentos operacionais padrão de higienização de instalações e equipamentos conseguem remover esta camada. Desta forma, a ausência de óxido de cobre é mais um indicativo de correta realização dos procedimentos de higienização.

A análise das superfícies de latão através da MEV demonstrou que a esterilização através do forno de Pasteur (180°C) e com a luz ultravioleta também não acarretaram em alterações estruturais na superfície, quando comparada ao controle. Após três usos da autoclave não foi observada a formação de óxido de cobre. Porém, assim como no aço inoxidável e no cobre, resultou em alterações na superfície, com significativas fissuras (Figura 5).

Figura 5 - Micrografias obtidas através de MEV nos cupons de latão 70%Cu (C26000) submetidos à esterilização por autoclave (aumento focal de mag=5.000X).



Legenda: (A) Superfície esterilizada através de um único uso de autoclave. (B) Superfície esterilizada através de três usos consecutivos de autoclave. A seta indica as porosidades formadas após a esterilização.

Embora não tenha ocorrido a formação de CuO capaz de interferir na atividade antimicrobiana, as fissuras presentes na superfície podem influenciar no resultado microbiológico, devido a uma possível maior adesão de biofilmes nesses locais. A ausência de CuO nas superfícies de latão, está de acordo com os resultados obtidos por Page *et al.* (2009), os quais demonstraram que quanto maior o teor de cobre, maior é a formação de CuO. Sendo assim, o latão pode conferir menor oxidação, tendo em vista que possui 30% de cobre a menos na sua composição.

A análise das superfícies de cobre revestido com estanho através da MEV demonstrou que a esterilização através do forno de Pasteur (180°C), luz ultravioleta e uso da autoclave (121°C por 30 minutos) com um único uso e com três usos consecutivos não acarretou em alterações estruturais na superfície, quando comparada ao controle. Muitos estudos avaliam os métodos de esterilização dos metais e buscam novas alternativas. Com os resultados deste trabalho, pode-se observar a importância na padronização de um método, principalmente quando as técnicas utilizadas podem interferir nos resultados de futuras pesquisas. Com base nas alterações estruturais observadas através da MEV com o uso da esterilização pela autoclave, o método foi excluído para padronização da metodologia. Não se observaram diferenças estruturais em nenhum dos quatro metais avaliados quando a esterilização foi feita através de luz ultravioleta e pelo forno de Pasteur. Porém, observaram-se alterações na coloração dos cupons após a utilização do forno de Pasteur, possivelmente devido à alta temperatura empregada. Com base nestes resultados, optou-se por padronizar a esterilização por luz ultravioleta com duas horas para cada lado da superfície.

5.1.2 Efeito das superfícies na anti-formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis

Na Tabela 2 estão descritas as contagens bacterianas obtidas nos ensaios de anti-formação de biofilme por *S. Enteritidis* nas quatro superfícies avaliadas e em três temperaturas de incubação, durante 24 horas.

Tabela 2 – Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas no ensaio de anti-formação de biofilmes por *S. Enteritidis* para cada superfície a 4°C, 12°C e 25°C após 24 horas.

Superfície	Temperatura		
	4°C	12°C	25°C
Aço Inoxidável	5,688±0,64 ^a	5,895±0,28 ^a	6,012±0,35 ^a
Cobre	2,641±2,02 ^b	4,208±0,74 ^b	4,561±1,77 ^b
Latão	2,797±1,85 ^b	3,497±1,10 ^b	4,557±1,29 ^b
Estanho	5,692±0,19 ^a	5,862±0,21 ^a	6,083±0,34 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (DP) das contagens das colônias das dez cepas de *S. Enteritidis*.

Observou-se um expressivo desvio padrão das médias das contagens em todas as superfícies antimicrobianas e em todas as temperaturas, representando a variabilidade entre as cepas. Trabalhos anteriores já demonstraram que mesmo dentro de um mesmo sorovar existem variações importantes quanto à habilidade em produzir biofilme. Estas diferenças podem estar relacionadas com características intrínsecas das cepas, como a presença de genes associados à produção de biofilme (BORGES *et al.*, 2018).

O cobre eletrolítico e o latão apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na contagem bacteriana, quando comparados ao aço inoxidável. De acordo com a literatura, as propriedades antimicrobianas da superfície são superiores à medida que o teor de cobre das ligas aumenta (MICHELS *et al.*, 2005; MIKOLAY *et al.*, 2010). Uma vez que o latão e o cobre eletrolítico apresentam diferentes concentrações de cobre na sua composição, poderia existir diferença na atividade antimicrobiana entre as duas superfícies. Porém, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre elas, independentemente da temperatura avaliada. Estes resultados indicam que mesmo uma liga com menor teor cúprico apresenta atividade antimicrobiana semelhante a uma superfície de cobre 99,9%, demonstrando o potencial de aplicação de ligas na indústria avícola em virtude de custos reduzidos para implantação de cobre.

Noyce *et al.* (2006) demonstraram que as superfícies de latão (80% Cu) também demonstraram boa capacidade bactericida frente a três cepas de MRSA (MRSA, MRSA-1 e MRSA-16), quando comparadas às superfícies de cobre eletrolítico, apesar de levarem mais tempo para obter reduções significativas das contagens bacterianas. Mehtar *et al.* (2008) também observaram que ligas de cobre (90% Cu 10% Ni; 70% Cu 30% Zn) apresentaram ação antimicrobiana frente a isolados de *Candida albicans* entre 60 (90% Cu) e 90 minutos (70% Cu). Resultados semelhantes foram observados para *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA e *Klebsiella pneumoniae*. Pesquisadores do Reino Unido avaliaram a atividade antimicrobiana de ligas de cobre (60% e 70% Cu) em superfícies hospitalares e observaram que o número médio de bactérias recuperadas foi entre 90% e 100% menor do que aquele encontrado nas superfícies controle (superfícies plásticas, cromadas e de alumínio) (CASEY *et al.*, 2010). Ensaio semelhante realizados em postos de saúde e hospitais também obtiveram significativa redução na carga bacteriana das superfícies (MARAIS *et al.*, 2010; MICHELS *et al.*, 2015; SCHMIDT *et al.*, 2016). Porém, o cobre 99,9% pode não ser um substituto apropriado para o aço inoxidável em ambientes hospitalares, pois ele se oxida mais facilmente em contato com o ar. Por outro lado, ligas como o latão, além de exibirem atividade

antimicrobiana, melhoram as propriedades mecânicas e estéticas das superfícies (PAGE *et al.*, 2009). Em 2013, foi publicado o primeiro estudo avaliando o custo-benefício na aplicação de superfícies de contato com ligas de cobre através da utilização de 20 camas em quartos hospitalares, e concluiu-se que o investimento seria recuperado em menos de dois meses (TAYLOR; CHAPLIN, 2013).

É importante ressaltar que o cobre também apresenta limitações. Critchley *et al.* (2008) constataram em seus estudos o isolamento de microrganismos resistentes a partir de tubulações de cobre. Kielemoes e Verstraete (2001) observaram outras superfícies de cobre expostas à água, identificando o desenvolvimento de biofilmes estáveis. Segundo os autores, a atuação dos íons liberados pelo cobre é distinta em superfícies úmidas e secas. Em superfícies de toque secas, as bactérias não têm tempo para desenvolver biofilmes, e o estresse e as condições de sobrevivência são diferentes daquelas dos sistemas aquosos. O estresse está diretamente relacionado ao cobre nas condições a seco, uma vez que tem sido demonstrado que as células expostas a outras superfícies metálicas, tais como o aço inoxidável, não são inativadas. Kielemoes e Verstraete (2001) descrevem que há um potencial uso e aplicação prática de ligas de cobre para evitar a adesão de bactérias e os efeitos deletérios do biofilme. Entretanto, em condições naturais, provavelmente só serão possíveis para exposições de curto prazo de 1 a 2 dias. Desta forma, nos casos em que a superfície é completamente limpa em intervalos regulares, essa liberação lenta de cobre biocida pode ser interessante. Van der Kooij *et al.* (2005) observaram que as concentrações de *Legionella* sp. na água e nos biofilmes estavam iguais nas tubulações de cobre e de aço inoxidável após 2 anos, demonstrando a limitação temporária do cobre para remoção de biofilme sem processos de higienização. Contudo, a indústria avícola possui processos de higienização pré-operacional e operacional realizados rotineiramente, corroborando com os resultados encontrados.

A legislação brasileira permite o uso de cobre em contato com alimento, desde que as superfícies sejam revestidas com ouro, prata, níquel ou estanho (BRASIL, 2007). Para este trabalho, optou-se por avaliar o cobre revestido com estanho, devido ao menor custo deste metal. Porém, observou-se que as superfícies de cobre revestidas integralmente por estanho não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle em nenhuma temperatura avaliada, possivelmente devido ao mecanismo de ação dos íons de cobre, que ocorre comprovadamente por contato direto (GRASS *et al.*, 2011). Desta forma, o revestimento das superfícies de cobre exigido pela legislação

brasileira impede as propriedades antimicrobianas expostas a partir do contato e da liberação de íons.

Faúndez *et al.* (2004) sugerem que as folhas de cobre poderiam ser utilizadas para diminuir a carga bacteriana persistente após a limpeza diária, evitar a formação de biofilmes, reduzir a viabilidade de bactérias patogênicas, reduzir a contaminação cruzada e/ou para atuar como autodesinfetantes em áreas onde a carga bacteriana é continuamente renovada, como em matadouros-frigoríficos, por exemplo. Até o presente momento, ainda são poucos os trabalhos que avaliam a implantação de superfícies de cobre na indústria avícola. Os dois únicos estabelecimentos que utilizam superfícies de cobre na sua estrutura localizam-se no Chile, sendo estes, plantas processadoras de carne avícola e suína. De acordo com os responsáveis pelos estabelecimentos, desde a implantação das superfícies de cobre em 2018, observou-se uma redução de praticamente 100% no crescimento de microrganismos patogênicos, reduzindo a contaminação da superfície de contato direto em 20% e em 34% em pisos e ralos (AVINEWS, 2019). No Brasil, ainda não há nenhum estudo realizado em plantas de matadouros-frigoríficos, devido à limitação imposta pela legislação. Alguns pesquisadores acreditam que o cobre é proibido no Brasil, devido a uma possível toxicidade que poderia ocorrer nos alimentos (ANDRADE *et al.*, 2004; FAÚNDES *et al.*, 2004). Porém, já foi demonstrado que os alimentos em contato com superfícies de cobre e, conseqüentemente, expostas aos íons cúpricos, tendem a atingir teores máximos de 2,5mg/100g após alguns minutos (FAÚNDEZ *et al.*, 2004). Embora a toxicidade humana possa ocorrer, a exposição ao cobre é considerada segura, evidenciada também pelo uso disseminado de dispositivos intrauterinos de cobre e pelo baixo risco de reações adversas devido ao contato dérmico com o metal. A baixa sensibilidade do tecido humano ao cobre pode ser contrastada com a dos microrganismos que são extremamente sensíveis aos seus efeitos tóxicos (O’GORMAN; HUMPHREY, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado que nanopartículas de cobre também apresentam atividade antimicrobiana e são capazes de erradicar os biofilmes formados por patógenos importantes na saúde pública (RAGHUNATH; PERUMAL, 2017; SENGAN *et al.*, 2019; JOSHI *et al.*, 2019). A aplicação destas partículas em embalagens também aumenta a vida útil dos alimentos e auxilia no controle de microrganismos patogênicos (HIMANSHU; AWASTHY; SARETHY, 2018). Sugere-se, futuramente, o estudo de nanopartículas de cobre aplicadas à avicultura.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam os dados obtidos em outros trabalhos a respeito da atividade antimicrobiana do cobre e demonstram o potencial de utilização deste metal na indústria avícola. Este é um trabalho inicial que visa demonstrar os benefícios que o cobre pode trazer para a medicina veterinária, não somente na segurança dos alimentos como também na produção animal e na saúde pública.

5.1.3 Efeito das temperaturas na anti-formação do biofilme por *Salmonella* Enteritidis

Na Tabela 3 estão descritas as contagens bacterianas obtidas nos ensaios de anti-formação de biofilme por *S. Enteritidis* para cada superfície avaliada, de acordo com a temperatura de incubação.

Tabela 3 - Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas no ensaio de anti-formação de biofilmes por *S. Enteritidis* para cada superfície de acordo com a temperaturas de incubação.

Temperatura	Superfície			
	Aço Inoxidável	Cobre	Latão	Estanho
4°C	5,688±0,64 ^a	2,641±2,02 ^a	2,797±1,85 ^a	5,692±0,19 ^a
12°C	5,895±0,28 ^a	4,208±0,74 ^{ab}	3,497±1,10 ^{ab}	5,862±0,21 ^a
25°C	6,012±0,35 ^a	4,561±1,77 ^{bc}	4,557±1,29 ^{bc}	6,083±0,34 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (DP) das contagens das colônias das dez cepas de *S. Enteritidis*.

Diversos trabalhos já demonstraram que a temperatura é um dos fatores mais importantes na formação do biofilme (RODRIGUES *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014; CABARKAPA *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2018). Ao comparar o efeito da temperatura na anti-formação de biofilme em cada superfície, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as três temperaturas para o aço inoxidável e o estanho, indicando que possivelmente a temperatura não é o fator mais importante na adesão bacteriana para estas superfícies. Giaouris *et al.* (2005) também não encontraram diferenças estatísticas significativas na adesão de biofilme de *S. Enteritidis* em cupons de aço inoxidável incubados durante 7 dias a 5°C, 20°C e 37°C. Entretanto, é importante destacar que estas superfícies não apresentaram atividade antimicrobiana significativa.

Logo, a contagem bacteriana é mais elevada nestas superfícies do que nas demais, o que possivelmente interferiu na análise estatística.

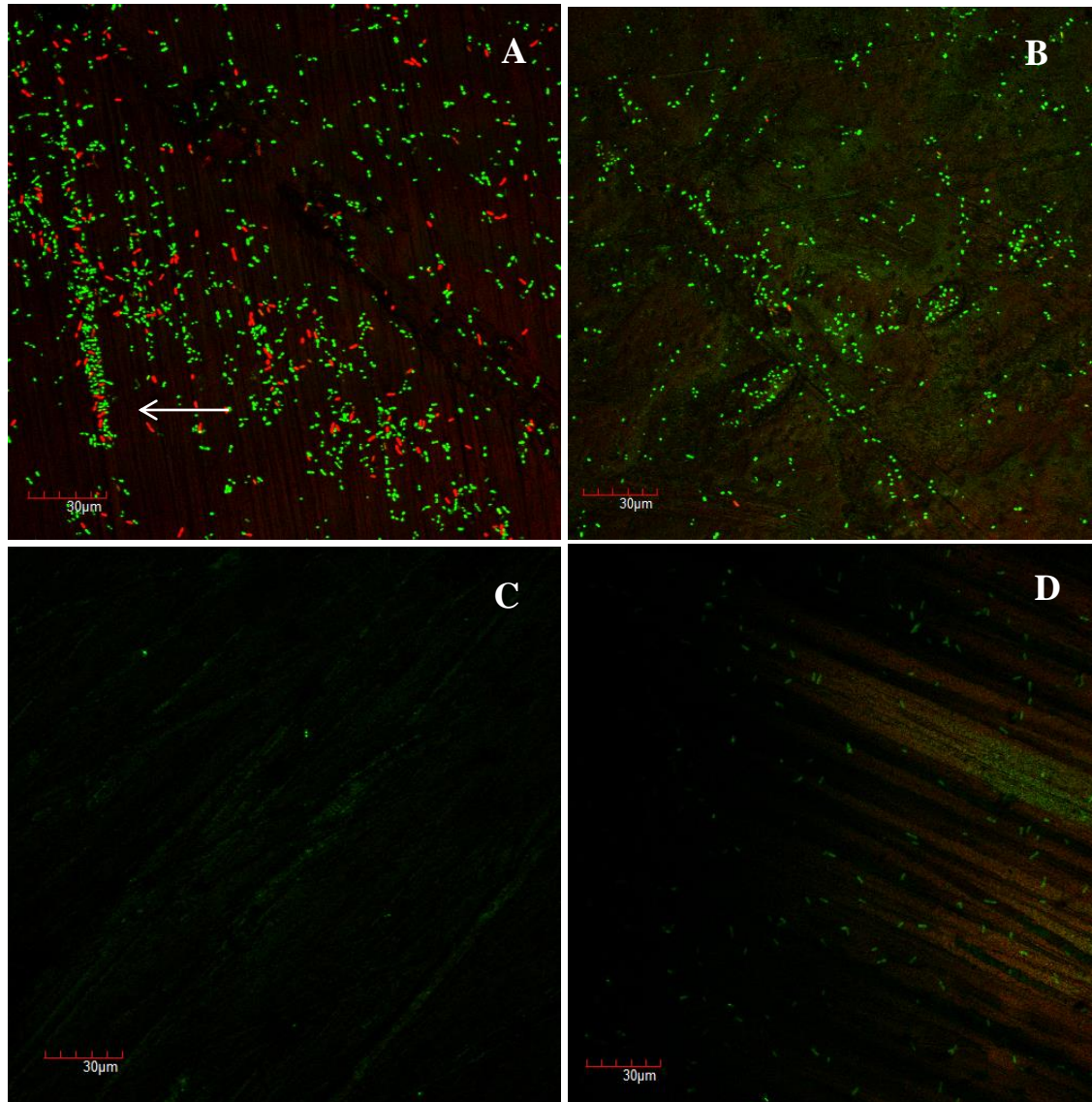
O cobre e o latão apresentaram diferenças estatísticas significativas de acordo com a temperatura de incubação. As menores contagens bacterianas foram observadas a 4°C para ambas as superfícies, sendo significativamente menor do que aquelas observadas a 25°C. Observou-se uma tendência de aumento da contagem bacteriana conforme o aumento das temperaturas de incubação. Estes resultados diferem de estudos anteriores, nos quais os autores concluíram que o efeito antimicrobiano aumenta à medida que a temperatura passa da refrigeração para a temperatura ambiente (FAUNDEZ *et al.*, 2004; MICHELS *et al.*, 2005; MEHTAR *et al.*, 2008). Uma possível justificativa é que estes trabalhos avaliam a atividade antimicrobiana em superfícies secas, enquanto o presente estudo avaliou a anti-formação de biofilme em superfícies úmidas. Ainda, Schonewille *et al.* (2012) descreveram que a diminuição na temperatura de incubação pode reduzir o crescimento bacteriano, mas também pode favorecer a produção de biofilme. Diversos autores demonstraram que a formação do biofilme é mais intensa entre 25°C e 30°C, pois a produção de celulose e fimbria ocorre apenas em temperaturas abaixo de 30°C, especialmente entre 25°C e 28°C (STEPANOVIĆ *et al.*, 2003; CABARKAPA *et al.*, 2015; PIRAS *et al.*, 2015).

5.1.4 Microscopia confocal de varredura a laser

Na Figura 6 estão apresentadas as micrografias geradas por CLSM para avaliação da formação de biofilmes por *S. Enteritidis* nas superfícies de cobre, latão, cobre revestido com estanho e aço inoxidável a 25°C. A utilização da CLSM para análise das células *in situ* permitiu a avaliação das possíveis hipóteses aos resultados microbiológicos encontrados nas análises anteriores, nas quais as superfícies antimicrobianas apresentaram médias das contagens bacterianas inferiores às superfícies de aço inoxidável e estanho.

A primeira hipótese seria de que há uma adesão celular semelhante em todas as superfícies, mas com um maior número de células inviáveis nas superfícies de cobre e de latão. A segunda hipótese seria de que o latão e o cobre inibiriam a adesão do biofilme bacteriano, e nas demais superfícies ocorreria uma maior adesão.

Figura 6 - Micrografias geradas por CLSM da formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis nas quatro superfícies avaliadas, quando incubadas a 25°C durante 24 horas.



Legenda: (A) Cupons de aço inoxidável (AISI 316). (B) Cupons de cobre revestido integralmente com estanho. (C) Cupons de cobre 99,9% (C11000). (D) Cupons de latão 70% Cu (C26000). Células viáveis em verde e inviáveis em vermelho. A seta indica a maior adesão celular em regiões com fissuras.

Ao analisar as diferenças de adesão das superfícies, evidencia-se uma menor adesão celular bacteriana no cobre e no latão, que apresentaram atividade antimicrobiana no teste bacteriológico. Apesar de o teste bacteriológico não ter demonstrado diferença significativa entre as contagens do latão e do cobre, a CLSM evidenciou uma menor quantidade de células aderidas no cupom de cobre. A CLSM também demonstrou que a adesão celular foi maior nas fissuras encontradas nos cupons

de aço inoxidável (Figura 6). Com estes resultados, pode-se inferir também que a corrosão por pites vista nas micrografias realizadas pelo MEV, possivelmente, influenciou em uma maior adesão celular.

Noyce *et al.* (2006a) avaliaram através da Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC), técnica também utilizada para análise de células *in situ*, os resultados microbiológicos obtidos na cultura direta de três cepas de MRSA recuperados de cupons de aço inoxidável (AISI 304) e cobre eletrolítico (99,9% Cu). Segundos os autores, as imagens obtidas corroboraram com os resultados microbiológicos obtidos nos cupons de cobre 99,9%, os quais apresentaram zero emissão fluorescente após 45 min a 22°C. Em contraste, nas imagens de aço inoxidável, as cepas de MRSA foram capazes de persistir e permanecer viáveis por períodos de até 72 horas a 22°C. Estes mesmos autores também avaliaram a adesão de *E. coli* O157 nas mesmas superfícies, também através da DIC. As imagens no tempo zero demonstraram células ativas nas duas superfícies, e após incubação a 22°C, por seis horas, não houve marcação fluorescente na superfície de cobre. Quando avaliado o aço inoxidável, as imagens mostraram a presença de células bacterianas cujos números correspondiam aos números cultiváveis de células recuperadas no meio seletivo (NOYCE *et al.*, 2006). Estudos realizados por Espirito Santo *et al.* (2011) indicam que as células ativas de *E. coli* foram inativadas e acumularam íons cúpricos nas superfícies úmidas de cobre. Na incubação a 37 °C, as células foram inativadas durante um período de três horas e nenhuma célula viva pode ser recuperada após esse tempo. Os autores também constataram que os dados de acumulação e cinética de morte celular demonstram claramente a correlação entre a liberação de íons de cobre pelas superfícies e seu acúmulo pelas células. Os mesmos autores também avaliaram a viabilidade de células de *Staphylococcus haemolyticus*. Foi observado danos à membrana celular e morte após sete minutos de exposição às superfícies de cobre, diferenciando-se das superfícies de aço inoxidável em que a maioria das células estavam viáveis (ESPIRITO SANTO *et al.*, 2012).

Com base nos resultados encontrados em outras pesquisas, é improvável que as superfícies de cobre tenham a capacidade de inibir a adesão bacteriana inicial, uma vez que esta pode iniciar logo após o contato da bactéria com a superfície (NOYCE *et al.*, 2006a). Trabalhos anteriores demonstram que as células bacterianas se aderem às superfícies e, conforme há a liberação dos íons de cobre, ocorrem danos à membrana celular e morte após, no mínimo, 3 horas (ESPIRITO SANTO *et al.*, 2012). Pode-se

inferir também que, após a morte celular, possivelmente as células mortas desprendem-se das superfícies, uma vez que não se observa adesão celular depois de horas em contato (NOYCE *et al.*, 2006; ESPIRITO SANTO *et al.*, 2012). Esses trabalhos corroboram os resultados encontrados neste experimento, no qual foi observado um número muito baixo de bactérias aderidas após 24 horas de contato com o cobre. A adesão celular apresentada no cupom de latão pode ser justificada pelo cobre apresentar mecanismo de ação mais lento em superfícies úmidas (ESPIRITO SANTO *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2012). Poucos estudos foram realizados para avaliar microscopicamente os danos e a viabilidade das células bacterianas quando em contato com o cobre, principalmente quando se trata da formação de biofilme. Portanto, mais trabalhos como esses são necessários para melhor compreensão da adesão em diferentes meios e tempos de contato.

5.2 Experimento 2 - Avaliação da densidade de corrente de corrosão estimada em ensaios de polarização potencioestática

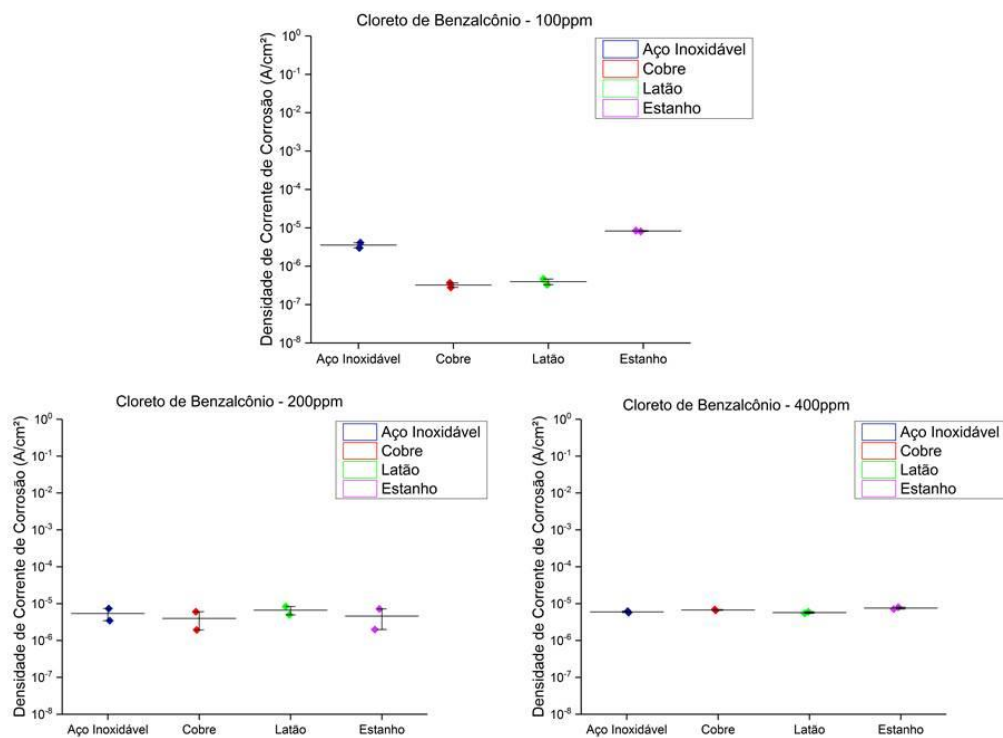
5.2.1 Ensaio de Polarização Potencioestática

Após realização da polarização, as curvas foram analisadas pela densidade de corrente de corrosão através da curva de aproximação da equação de Butler-Volmer. A análise considera a comparação das amostras a partir da diferença de ordem de grandeza, sendo significativa quando maior de 1 log. Quanto menor o valor da densidade de corrente, mais a superfície resistiu à corrosão. Na Tabela 4 estão descritas as médias logarítmicas das densidades de corrente de corrosão do desinfetante cloreto de benzalcônio nas quatro superfícies, e o perfil gráfico dos resultados está representado na Figura 7.

Tabela 4 – Valores correspondentes às médias logarítmicas das repetições das densidades de corrente de corrosão causada pelo cloreto de benzalcônio nas diferentes superfícies.

Superfície	Concentração (ppm) do desinfetante		
	100	200	400
Aço Inoxidável	$3,55 \times 10^{-6}$	$5,39 \times 10^{-6}$	$5,98 \times 10^{-6}$
Cobre	$5,24 \times 10^{-7}$	$3,98 \times 10^{-6}$	$6,73 \times 10^{-6}$
Latão	$4,97 \times 10^{-7}$	$6,66 \times 10^{-6}$	$5,73 \times 10^{-6}$
Estanho	$9,27 \times 10^{-6}$	$4,59 \times 10^{-6}$	$7,57 \times 10^{-6}$

Figura 7 - Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do cloreto de benzalcônio.



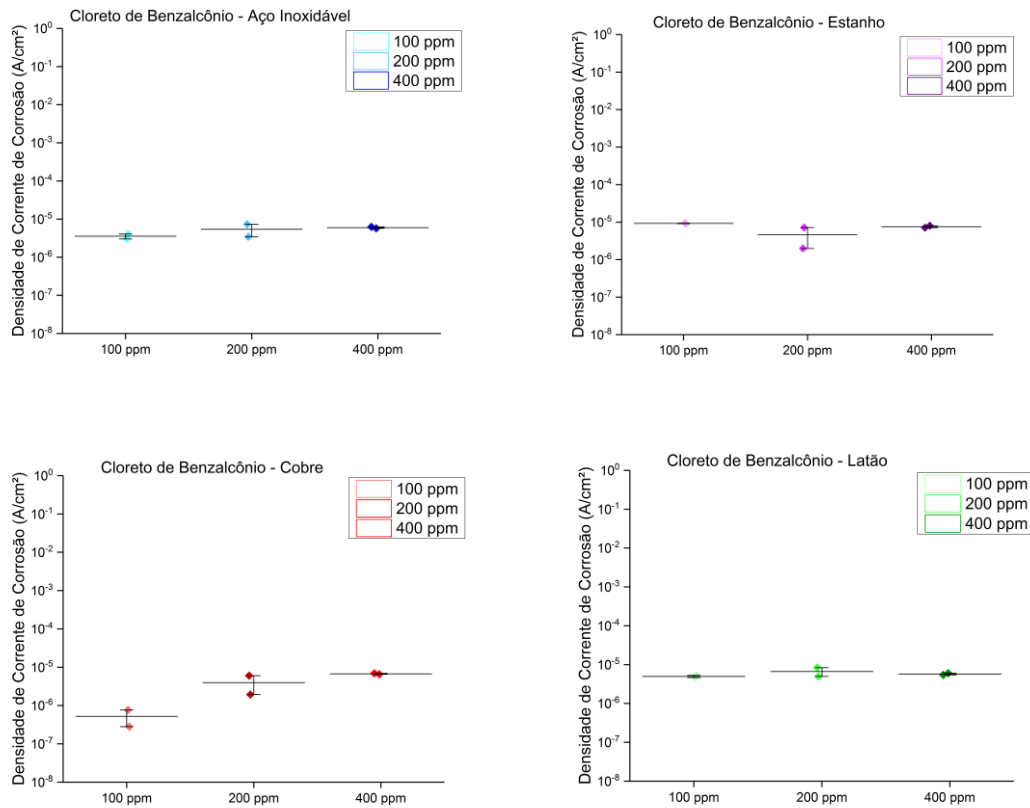
A 100 ppm, a densidade de corrente de corrosão apresentou mudança significativa nas superfícies de cobre e de latão, correspondendo a uma diferença de uma ordem de grandeza quando comparado ao aço inoxidável e ao cobre revestido com estanho. Nas concentrações de 200 ppm e 400 ppm, o desinfetante não afetou o desempenho da densidade de corrente de corrosão em nenhuma das superfícies, não

sendo observadas diferenças significativas. Ratifica-se que esta análise considera somente a comparação logarítmica dos resultados, pois a diferença é realizada pelo número de vezes em que uma superfície é melhor do que a outra.

O cloreto de benzalcônio pertence ao grupo dos quaternários de amônio, amplamente utilizado na avicultura (WOLFRAN, 1994). Os compostos químicos à base de quaternário de amônio são facilmente degradados no ambiente e atuam em uma ampla faixa de pH, sendo sua ação comprometida em locais onde a água apresenta dureza maior e em materiais mais fibrosos (KUANA, 2009). Em relação ao risco operacional, este desinfetante não é considerado irritante para a pele, possui baixa toxicidade e é inodoro, além de ser pouco corrosivo aos metais (MIYAGI *et al.*, 2000; RUI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2017). Os resultados de resistência à corrosão avaliados em todas as superfícies podem ser explicados pela baixa capacidade de corrosão que o cloreto de benzalcônio apresenta. Pode-se assumir que as superfícies antimicrobianas apresentaram resultados semelhantes às aquelas que já são utilizadas na indústria.

A representação gráfica dos dados de densidade de corrosão individuais para cada superfície está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do cloreto de benzalcônio, analisadas individualmente.



Ao analisar individualmente cada superfície nas diferentes concentrações do cloreto de benzalcônio, a densidade de corrente de corrosão não apresentou mudança significativa na ordem de grandeza. Desta forma, pode-se inferir que as concentrações avaliadas não influenciaram na atividade corrosiva de cada material. Scur *et al.* (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de cloreto de benzalcônio e de hipoclorito de sódio frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na concentração recomendada pelo fabricante (200ppm), na metade e no dobro do recomendado. Os autores verificaram reduções nas médias das contagens bacterianas para ambos desinfetantes à medida que as concentrações dos desinfetantes aumentavam. Embora neste estudo a corrosão não tenha sido influenciada pelas concentrações, a capacidade residual dos desinfetantes, com maior tempo em contato com a superfície, deve ser levada em consideração. Segundo Hoffmann *et al.* (1995), o poder residual é uma característica desejável em desinfetantes. Entretanto, Holden *et al.* (1995) afirmam que

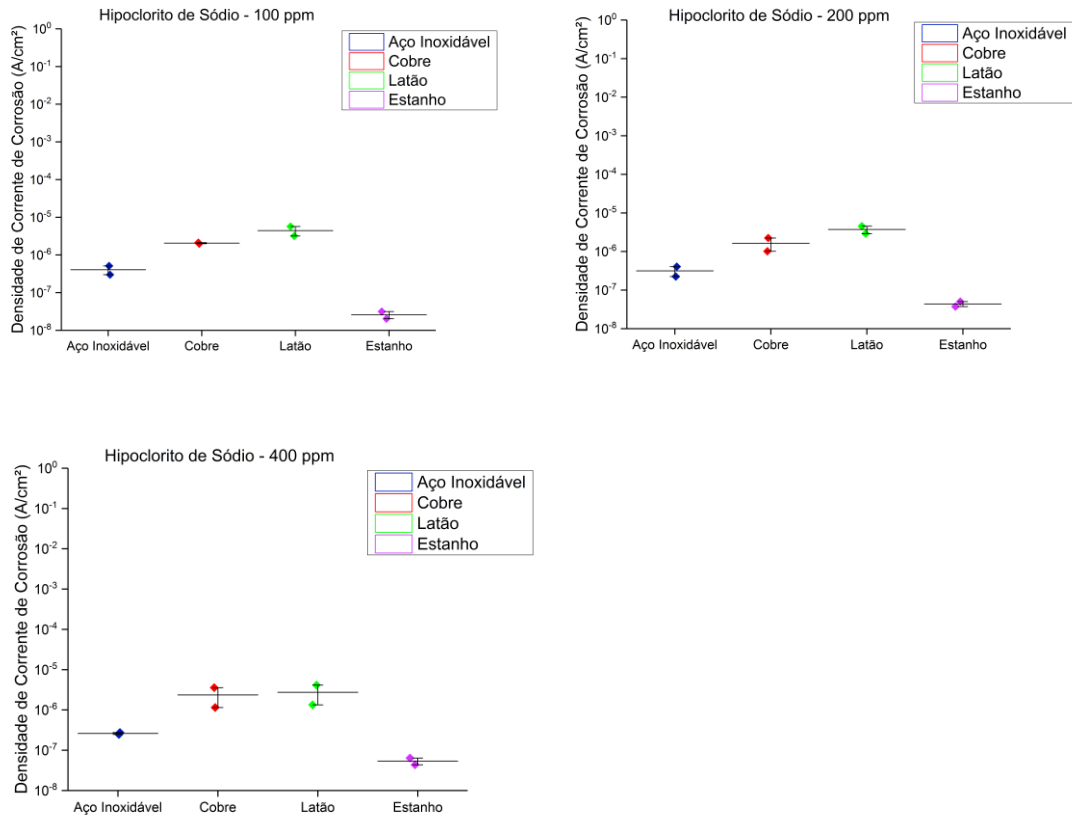
a concentração do desinfetante residual e a temperatura desempenham um papel importante nas taxas de corrosão das superfícies e no desenvolvimento de biofilme. A capacidade residual dos desinfetantes aumenta as taxas de corrosão (AWWA, 1999; MCNEILL; EDWARDS, 2001). No entanto, quando relacionada à atividade microbiana, a baixa carga residual de desinfetantes pode aumentar o crescimento de bactérias indutoras de corrosão (MCNEILL; EDWARDS, 2001).

Na Tabela 5 estão descritas as médias logarítmicas das densidades de corrente de corrosão do desinfetante hipoclorito de sódio nas quatro superfícies, e os perfis gráficos dos resultados dos dados estão representados na Figura 9.

Tabela 5 – Valores correspondentes às médias das repetições das densidades de corrente de corrosão causada pelo hipoclorito de sódio nas superfícies de aço inoxidável, cobre, latão e estanho.

Superfície	Concentração (ppm) do desinfetante		
	100	200	400
Aço Inoxidável	$4,05 \times 10^7$	$3,15 \times 10^7$	$2,61 \times 10^7$
Cobre	$2,06 \times 10^6$	$1,63 \times 10^6$	$2,36 \times 10^6$
Latão	$4,44 \times 10^6$	$3,72 \times 10^6$	$2,74 \times 10^6$
Estanho	$2,59 \times 10^8$	$4,38 \times 10^8$	$5,38 \times 10^8$

Figura 9 - Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do hipoclorito de sódio.



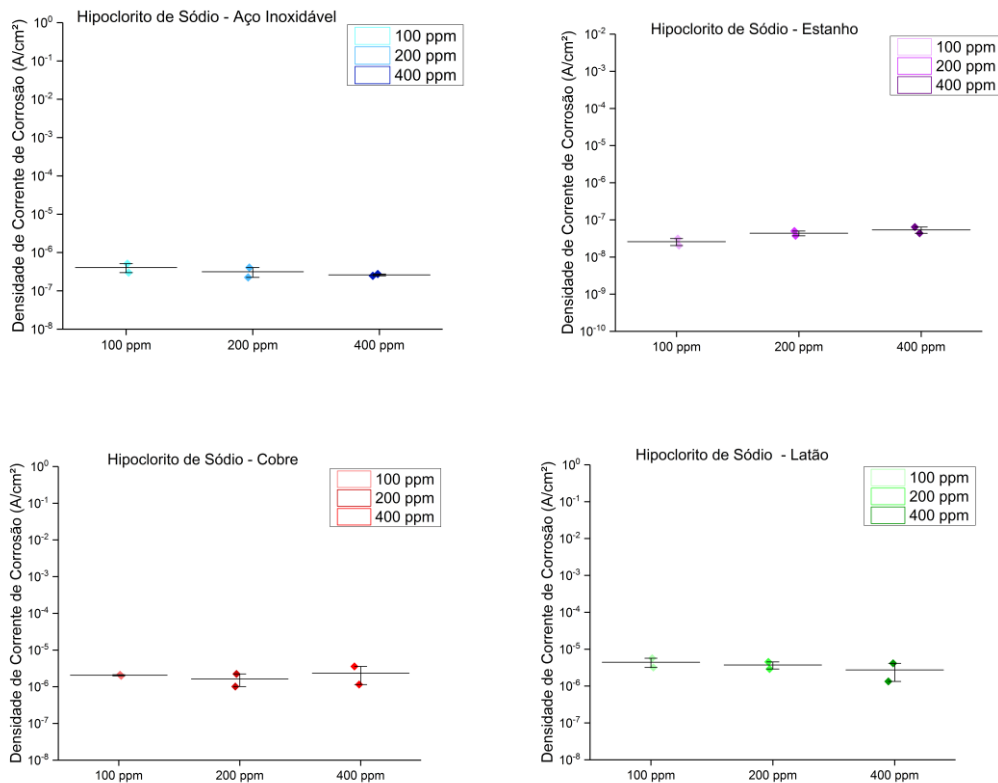
As curvas realizadas para avaliação das superfícies na densidade de corrente de corrosão com hipoclorito de sódio apresentaram resultados iguais nas três concentrações avaliadas, indicando que o desinfetante não é afetado pela concentração nessa análise. Comparando-se as superfícies antimicrobianas ao aço inoxidável e ao estanho, observa-se diferença de uma ordem e duas ordens de grandeza, respectivamente. A solução de hipoclorito de sódio (NaClO), com 10 a 12% de cloro ativo, é um dos principais compostos clorados inorgânicos utilizados para desinfecção (ANDRADE, 2008; MACEDO; OLIVEIRA, 2010). Entre as suas principais vantagens estão o baixo custo, a fácil preparação e aplicação, a ação rápida que não é afetada pela dureza da água, a ação efetiva contra uma grande variedade de microrganismos e, em baixas concentrações, é relativamente não-tóxico (ANDRADE, 2008). Contudo, o hipoclorito de sódio apresenta capacidade de corrosão, odor forte e possibilidade de manchar as superfícies nas quais é aplicado (MENDES *et al.*, 2004). Estudos realizados por Schalh *et al.*

(2004) avaliaram o efeito da desinfecção com hipoclorito de sódio sobre a resistência à corrosão de cinco tipos de ligas metálicas (Ag-Sn, Cu-Al, Cu-Zn, Ni-Cr e Co-Cr). A análise revelou que as ligas de cobre são mais susceptíveis à corrosão e as de Ni-Cr e Co-Cr as mais resistentes, ficando as de Ag-Sn em posição intermediária. Por outro lado, Aoki (2006) afirma que o cobre é considerado um metal nobre e resistente à corrosão em geral. Um exemplo é o uso de tintas à base de cobre em navios para diminuir a taxa de corrosão que as superfícies sofrem, devido à água salinizada do mar, responsável por rápido processo de corrosão eletroquímica e incrustações provenientes de organismos vegetais ou animais aderidos à superfície metálica (OLIVEIRA, 2012). Embora as curvas apresentem o cobre e o latão como mais susceptíveis à corrosão, quando em contato com o hipoclorito de sódio, pode-se afirmar que o cobre é o metal com aplicações mais diversificadas na civilização humana, sendo que praticamente todas elas ocorrem em condições de exposição atmosférica, quando ocorre maior oxidação (NUNES *et al.*, 2005).

O estanho apresentou maior resistência à corrosão uniforme em todas as concentrações avaliadas do hipoclorito de sódio, inclusive superior aos resultados do aço inoxidável. O revestimento com estanho é frequentemente utilizado em latas metálicas seladas contendo alimentos em conserva. Essas latas são chamadas de folhas de flandres, que consiste em um chapa de aço revestida por uma fina camada de estanho. Neste caso, o estanho é utilizado por ser mais resistente à corrosão que o aço (SANTANA, 2010). Contudo, ele ainda é revestido por outra camada de um óxido ou de um polímero, pois o ácido cítrico dos alimentos poderia oxidar o estanho (DANTAS *et al.*, 2012). Desta forma, o uso de desinfetantes ácidos pode não apresentar o mesmo efeito nas superfícies de estanho.

As curvas de aproximação individuais para cada superfície estão apresentadas na Figura 10.

Figura 10 - Análise da densidade de corrente de corrosão das diferentes superfícies nas concentrações de 100, 200 e 400 ppm do hipoclorito de sódio, analisadas individualmente.



Ao analisar individualmente cada superfície nas diferentes concentrações do hipoclorito de sódio, assim como o desinfetante cloreto de benzalcônio, a densidade de corrente de corrosão não apresentou mudança significativa na ordem de grandeza, indicando que o desinfetante não é afetado pela concentração nessa análise. Desta forma, pode-se inferir que as concentrações não influenciaram na atividade corrosiva de cada material. Segundo o Código de Regulamentações Federais, a concentração de 200 ppm do hipoclorito de sódio corresponde ao limite máximo liberado (FDA, 2018). A utilização do dobro da concentração liberada para o uso não interferiu na corrosão. Porém, a capacidade residual dos desinfetantes comerciais pode influenciar na corrosão das superfícies (AWWA, 1999; MCNEILL; EDWARDS, 2001).

Outra observação ao experimento é a corrosão microbiologicamente influenciada (CMI). Sabe-se que a corrosão pode ser causada por intermediários químicos

produzidos por microrganismos que não estão em contato direto com a superfície corrosiva ou por substâncias químicas geradas por microrganismos na forma de biofilme em superfícies metálicas (RINGAS *et al.*, 1983; TILLER, 1986). Como consequência, podem ocasionar graves riscos à segurança dos alimentos e levar a consideráveis perdas econômicas, devido ao aumento dos custos de manutenção (ZHANG *et al.* 2015). A questão microbiológica não foi abordada neste experimento, mas deve ser levada em consideração, visto que outros estudos demonstraram uma menor adesão bacteriana nas superfícies de cobre e de latão. Sendo assim, com menor adesão bacteriana, menor será a possibilidade de crescimento de bactérias indutoras de corrosão que facilitariam o processo destrutivo dos metais.

Até o presente momento, nenhum estudo comparativo sobre a corrosão das quatro superfícies foi realizado em contato com cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio, assim como outros desinfetantes comumente utilizados na indústria de alimentos. Por esta razão, novos estudos são necessários para a melhor compreensão da capacidade de corrosão dos materiais. Sugerem-se, futuramente, estudos de corrosão frente a outros desinfetantes, e também a avaliação e a comparação da densidade de corrente de corrosão das superfícies, quando em contato com microrganismos de interesse em avicultura.

6 CONCLUSÕES

- 1) A utilização de luz ultravioleta demonstrou ser a melhor forma de esterilização dos cupons, uma vez que as superfícies dos metais não foram afetadas, assim como não foram alteradas as características macroscópicas das mesmas.
- 2) Foram observadas propriedades antimicrobianas nas superfícies de cobre eletrolítico (99,9%) (C11000) e de latão 70% Cu (C26000) frente à formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis, independentemente da temperatura de incubação. A liga de cobre avaliada mostrou ter os mesmos potenciais antimicrobianos do que o cobre eletrolítico. O cobre revestido com estanho não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma temperatura.
- 3) A média das contagens bacterianas das superfícies de cobre e de latão aumentou à medida que a temperatura passou da refrigeração para a temperatura ambiente, enquanto nas superfícies de aço inoxidável e cobre revestidas com estanho não foram observadas diferenças na adesão bacteriana, nas mesmas condições.
- 4) Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível inferir que a superfícies de cobre eletrolítico (99,9%) (C11000) e de latão 70% Cu (C26000) são as que apresentam, em termos microbiológicos, maiores benefícios de utilização em superfícies de abatedouro avícola.
- 5) A Microscopia Confocal de Varredura a Laser comprovou os resultados microbiológicos, demonstrando uma menor adesão bacteriana nas superfícies de cobre e de latão.
- 6) As superfícies de cobre e de latão apresentaram o mesmo potencial de corrosão das superfícies de aço inoxidável e cobre revestido com estanho quando em contato com cloreto de benzalcônio. Quando em contato com hipoclorito de sódio, as superfícies de cobre revestido com estanho foram as mais resistentes à corrosão e as de cobre e de latão as mais susceptíveis, ficando as de aço inoxidável em posição intermediária.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. *et al.* Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives Microbiology**, v. 196, p. 453-472, 2014.

ABPA- Relatório Anual 2018. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>> Acesso em: 12 de novembro de 2019.

ABPA- Relatório Anual 2017. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>> Acesso em: 15 de agosto de 2019.

ABRACO – **Associação Brasileira de Corrosão**, 5 – Polarização, Passivação – Velocidade de Corrosão. Disponível em: <<http://www.abraco.org.br/corros15.htm>>, Acesso em: 15 de dezembro de 2019.

AMERICAN IRON AND STEEL INSTITUTE - AISI. Southfield: AISI, 2008. Disponível em: <<http://www.steel.org>>. Acesso em: 23 de dezembro de 2019.

ANDRADE, E. C. B. *et al.* Avaliação do teor de cobre e zinco em carnes cruas, processadas termicamente, resfriadas e congeladas no período de um mês. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n. 3, p.393-396, 2004.

ANDRADE N. J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 293-302, 2013

AVINEWS – Revista brasileira. Disponível em: < <https://avicultura.info/chile-agrosuper-implementa-uso-de-cobre-en-planta-procesadora-avicola/>> Acesso em: 15 de abril de 2018.

BACK, A.; ISHIZUKA, M. M. Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal. São Paulo: Fundação Cargill, p. 239, 2010.

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

BLEICHERT, P. *et al.* Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces. **Biometals**, v. 27, n. 6, p. 1179–1189, 2014.

BORGES, K. A. *et al.* Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 71–76, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 20, de 22 de março de 2007. Regulamento Técnico sobre disposições para embalagens, revestimentos, utensílios, tampas e equipamentos metálicos em contato com alimentos. Brasília, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial em *Salmonella* spp. Brasília, 2011. 60p.

BRESSAN, J.D. *et al.* Influence of hardness on the wear resistance of 17-4 PH stainless steel evaluated by the pin-on-disc testing. **Journal of Materials Processing Technology**, v.205, p. 353-359, 2008

BRITISH STAINLESS STEEL ASSOCIATION - BSSA. Sheffield: BSSA, 2008. Disponível em: <<http://www.bssa.org.uk>>. Acesso em: 11 de outubro de 2019.

CABARKAPA, I. *et al.* Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. **Acta Veterinaria-Beograd**, v. 65, n. 3, p. 371-389, 2015.

CARVALHO, D. *et al.* Atividade dos desinfetantes cloreto de benzalcônio e iodóforo sobre cepas de *Escherichia coli* patogênica aviária isoladas em frangos de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.18, n.1, p.10-15, 2017

CARVALHO, D. **Formação de biofilmes por *Salmonella* enteritidis, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*. Alternativas para controle e aplicação de modelagem preditiva.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, p.79.

CASARIN, L. S. *et al.* Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 103-108, 2014

CASEY, A. L. *et al.* Role of copper in reducing hospital environment contamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 1, p. 72–77, 2010.

CDC. Center for Disease Control and Protection. *Salmonella* 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 3 de julho de 2018.

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

China Food and Drug Administration. Food Safety Risk Analysis: **Interpretation of *Salmonella* Food Infections**. 2015. Disponível em: <<http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0051/128420.html>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

CIUCCIO, R. L. *et al.* Determinação das resistências à esterilização em autoclave, à corrosão e à exposição térmica de instrumental cirúrgico: estudo de caso. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 2, p 40-44, 2010.

COSTERTON, *et al.* Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

COUGHLAN L. M. *et al.* New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-21, 2016.

CRITCHLEY, M. M. *et al.* The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v. 94, p. 501-507, 2003.

DANTAS, S. T. Estabilidade de molho de tomate em embalagens metálicas com baixo revestimento de estanho. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 110-117, 2012.

DEPNER, R. F. R. *et al.* Action of Antimicrobial Copper on Bacteria and Fungi Isolated from Commercial Poultry Hatcheries. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 2016.

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

DUIJKEREN V. *et al.* Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3980-3985, 2002.

EBRAHIMI, N. *et al.* Comparative study of critical pitting temperature (CPT) of stainless steels by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), potentiodynamic and potentiostatic techniques. **Corrosion Science**, v. 59, p. 96-102, 2012.

EFSA. European Food Safety Authority. *Salmonella* 2017. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>>. Acesso em: 13 de julho de 2018.

ELGUINDI, J. *et al.* Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper-ion resistant bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1963-1970, 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **EPA registers copper-containing alloy product, 2008**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm>>. Acesso em: 2 de agosto de 2018.

ESPÍRITO SANTO, C. *et al.* Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. **Microbiology Open**, v.1, p.46-51, 2012.

ESPÍRITO SANTO, C. *et al.* Bacterial Killing by Dry Metallic Copper Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.3, p.794-802, 2011.

ESPÍRITO SANTO, C. *et al.* Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia coli* on Metallic Copper Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.4, p.977-986, 2008.

FAÚNDEZ, G. *et al.* Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **BioMed Central Microbiology**, v.4 n.19, p.1-7, 2004.

FLEXER, V. *et al.* A New Strategy for Corrosion Inhibition Coatings for Lead Heritage Metal Objects. **Electrochimica Acta**, v. 179, p. 441–451, out. 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food and Drugs. Department of Health and Human Services, Part 178 Indirect Food Additives: Adjuvants, Producers AIDS and Sanitizers. **Code of Federal Regulation**. Title 21. v. 3, April – 2018.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 607, 2013.

FROTA, A.C. Subnotificações de surtos alimentares: até quando?. **Food Safety**. 2015. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/subnotificacao-de-surtos-alimentares-ate-quando/>. Acesso em: 5 de maio de 2018.

GALANIS, E. *et al.* Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000-2002 for World Health Organization Global Salm-Surv. **Emerging Infectious Diseases**, n. 12, v. 3, p. 381-388, 2006.

GAN, Y.; CHEN, D.; KANG, Z. A highly anticorrosive chromium-free conversion coating prepared on electroless Ni–P coating. **Surface and Coatings Technology**, v. 287, p. 25–32, fev. 2016.

GEHLEN, S. S. Dinâmica de formação de biofilmes multiespecies por *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2016, 105 p.

GIÃO, M. S.; WILKS, S. A.; KEEVIL, C. W. Influence of copper surfaces on biofilm formation by *Legionella pneumophila* in potable water. **BioMetals**, v. 28, n. 2, p. 329–339, 2015.

GIAOURIS, E.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 10, p. 2149–2154, 2005.

GIBSON, H. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1999.

GONÇALVES, E.C.B.A. *et al.* Teores de cobre em extratos de carne *in natura* e processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.2, p.298-302, 2007.

GRASS, G. *et al.* Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.5, p.1541-1547, 2011.

HIMANSHU, S. *et al.* Nanotechnology in the Food Industry: Perspectives and Prospects. **Functional Food and Human Health**, p. 425-445, 2018.

HOFFMAN L. R. *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, v. 436, p. 1171–1175, 2005.

HOLDEN, B. *et al.* The effect of changing inter process and final disinfection reagents on corrosion and Biofilm growth in distribution pipes. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 213-220, 1995.

HONG, T; NAGUMO, M. Effect of surface roughness on early stages of pitting corrosion on type 301 stainless steel, **Corrosion Science**, v. 39, n 9, p. 1665-1672, 1997.

HUANG, Y. *et al.* Corrosion resistance properties of superhydrophobic copper surfaces fabricated by one-step electrochemical modification process. **Applied Surface Science**, v. 282, p. 689–694, out. 2013.

INKINEN, J. *et al.* Copper as an antibacterial material in different facilities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64. n. 1, p. 19-26, 2017.

International Copper Association do Brasil. Disponível em:
<https://www.procobre.org/pt/beneficios/fornecimento-de-alimentos/> Acesso em: 2 de novembro de 2019.

IRINO, K. *et al.* Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 38, p. 193-196, 1996.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.

JOSHI, N. C.; KUMAR, V.; SINGH, A. A Brief Discussion on the Green Synthesis and Characterisation of Copper Nanoparticles (CuNPs). **International Journal of Research in Advent Technology**, v. 7, n. 4, p. 201–204, 2019.

KIELEMOES, J.; VERSTRAETE, W. Influence of copper-alloying of austenitic stainless steel on multi-species biofilm development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 148-152, 2001.

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

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

LAYCOCK, L. J.; NEWMAN, R. C. Temperature dependence of pitting potentials for austenitic stainless steels above their critical pitting temperature. **Corrosion Science**, v. 40, n. 6, p. 887-902, 1998.

LEWIS, A. **Antimicrobial properties of copper alloys in food-processing facilities**. New York, 2005.

LIU, Y. *et al.* A electro-deposition process for fabrication of biomimetic super-hydrophobic surface and its corrosion resistance on magnesium alloy. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 395–403, abr. 2014.

LUO, J. *et al.* Killing of bacteria by copper, cadmium, and silver surfaces reveals relevant physicochemical parameters. **Biointerphases**, v. 12, n. 2, p. 301, 2017

MACEDO, J. A. B.; OLIVEIRA, F. S. Desinfecção secundária: o estado da arte do processo desinfecção em ETAs, com redução de custos operacionais e garantia da qualidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 3, n. 2, 2010.

MACOMBER, L.; IMLAY, J.A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 106, p. 8344-8349, 2009.

MANNHEIMER, W. A. *Microscopia dos Materiais*, Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. Rio de Janeiro, 2002.

MARAIS, F.; MEHTAR, S.; CHALKLEY, L. Antimicrobial efficacy of copper touch surfaces in reducing environmental bioburden in a South African community healthcare facility. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 1, p. 80–82, 2010.

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

MCNEILL, L.S.; EDWARDS, M. Iron pipe corrosion in distribution systems. **Journal of American Water Works Association**, v. 93, n. 7, p. 88- 100, 2001.

MEHTAR, S. *et al.* The antimicrobial activity and copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. **Journal of Hospital Infection**, v.68, p.45-51, 2008.

MENDES, A. A. *et al.* Produção de Frangos de Corte. Campinas. FACTA. **Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Agrícola**, 2004. Cap. 8 p. 117-119. Cap. 11, p. 171-173.

MEYLHEUC, T. *et al.* Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior

of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 128-137, 2006.

MICHELS, H. T. *et al.* From Laboratory Research to a Clinical Trial: Copper Alloy Surfaces Kill Bacteria and Reduce Hospital-Acquired Infections. **Health Environments Research and Design Journal**, v. 15, n. 1, p. 64-79, 2015.

MICHELS, H.T. *et al.* Copper Alloys for Human Infectious Disease Control. Materials Science and Technology Conference, Pittsburgh, PA, September 25-28, 2005. Copper for the 21st Century Symposium.

MICHELS, H.T.; NOYCE, J.O.; KEEVIL, C.W. Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n.2, p. 191-195, 2009.

MIKOLAY, A. *et al.* Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. **Appl Microbial Biotechnol**, v.87, p.1875-1879, 2010.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 444-448, 2000.

MOAYED, M. H.; LAYCOCK, N. J.; NEWMAN, R. C. Dependence of the critical pitting temperature on surface roughness. **Corrosion Science**, v. 45, p. 1203-1216, 2003.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 730-750, 1999.

NOYCE, J.O. *et al.* Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2748-2750, 2007.

NOYCE, J.O. *et al.* Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. **Journal of Hospital Infection**, v.63, p.289-297, 2006.

O' GORMAN, J.; HUMPHREYS, H. Applications of copper to prevent and control infection. Where are we now?. **Journal of Hospital Infection**, v.82, p.217-223, 2012.

OHSUMI, Y., KITAMOTO, K., ANRAKU, Y. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. **The Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 2676-2682, 1988.

OLIVEIRA, A. Corrosão e tratamento de superfície. Belém: IFPA; Santa Maria: UFSM, 2012. 104p.

OLIVEIRA, D.C.V. *et al.* Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 6, p. 478-483, 2014.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Control de la salmonelosis: importância de la hygiene veterinária e de los productos de origem animal. (Série de informes técnicos, n.774), 1998.

PAGE, K.; WILSON, M.; PARKIN, I. P. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 3818–3831, 2009.

PARIZZI, S.Q.F. *et al.* Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

PARRA, A. *et al.* Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 113-118, 2018.

PIRAS, F. *et al.* Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 78, p. 1875-1878, 2015.

PORPINO, K. K. P. *et al.* Fe (ii) adsorption on *Ucides Cordatus* crab shells. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 928–932, 2011.

RAGHUNATH, A.; PERUMAL, E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 137–152, 2017.

REUTER, M. *et al.* Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2122–2128, 2010.

RODRIGUES, L. B. *et al.* Biofilm Formation by *Salmonella* Enteritidis at Different Incubation Temperatures. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. March, p. 1–6, 2018.

ROSCHE B, *et al.* Microbial biofilms: A concept for industrial catalysis? **Trends Biotechnol**, v. 27, p. 636–643, 2009.

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

RUI, B. R. *et al.* Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Garça – SP, n. 16, 2011.

SANTANA, V. M. S. A leitura e a química das substancias. **Cadernos PDE**. Secretaria de Estado da Educação do Paraná (SEED); Universidade Estadual de Londrina, 2010.

SCHALCH, M. V. *et al.* Resistencia à corrosão de ligas odontológicas submetidas a desinfecção. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 33, n. 3, p. 143-148, 2004.

SCHMIDT, M. G. *et al.* Copper surfaces are associated with significantly lower concentrations of bacteria on selected surfaces within a pediatric intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 2, p. 203–209, 2016.

SCHONEWILLE, E. *et al.* Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 360–365, 2012.

SCUR, M. C. *et al.* Atividade de desinfetantes frente a sorotipos de *Salmonella* isolados de granjas avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.17, n.4, p.677-684, 2016.

SENGAN, M. *et al.* Effective elimination of biofilm formed with waterborne pathogens using copper nanoparticles. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 341–346, 2019

SIFRI, C. D *et al.* Reduced health care-associated infections in an acute care community hospital using a combination of self-disinfecting copper impregnated composite hard surfaces and linens. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 12, p. 1565-1571, 2016.

SILVA, A. *et al.* Carbon steel corrosion: an everyday approach for chemistry teaching. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 293-296, 2015

SILVA, E. M.; DUARTE A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n.2, p. 85-100, 2002.

SILVA, P.L. O tifo aviário na avicultura de corte. *Salmonella Gallinarum*. Avisite, Encarte Especial, n. 1, p. 5-6, 2015.

SIQUEIRA, C. A. C.; ARAUJO, L. P. Hydrotesting and microbial Corrosion. **Corrosion Protection Mater**, v. 31, n. 1, p. 13-16, 2012.

SKOOG, D. A. *et al.* Princípios de Microanálise Instrumental, quinta edição, Ed. Bookman.

SOULI, M. *et al.* Antimicrobial activity of copper surfaces against carbapenemase-producing contemporary Gram-negative clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, p.852-857, 2013.

SOUZA, J. C. M. *et al.* Biofilm formation on different materials used in oral rehabilitation. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 2, p. 141–147, 2016.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, p. 339-343, 2003.

SVS. Serviço de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 11 de junho de 2018.

TAYLOR, M.; CHAPLIN, S. The Economic Assessment of an Environmental Intervention: Discrete Deployment of Copper for Infection Control in ICUs. **Value in Health**, v. 16, n. 7, p. A353, 2013.

TESSARI, E. N. C. *et al.* Important aspects of *Salmonella* in the poultry industry and in public health. In: MAHMOUD, B. S. M. (Org.). *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen*. 1. ed. Croatia: Intech, cap. 9, p. 181-199, 2012.

THOMAS, M. E. *et al.* Quantification of horizontal transmission of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteria in pair-housed groups of laying hens. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 19, p. 6361-6, 2009.

THRELFALL, E.J.; FROST, L.A. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p. 5-16, 1990.

TIDE, C. *et al.* The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, v. 42, p. 85–96, 1999.

TILLER, A.K. In: Proc. Int. Conf. on Biologically Induced Corrosion, Gaithersburg, Maryland, Houston, TX: NACE, 1986.

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

VAN DER KOOIJ, D.; VEENENDAAL, H. R.; SCHEFFER, W. J. H. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. **Water Research**, v. 39, n. 13, p. 2789–2798, 2005.

VIDELA, H.A. Biofilms and Corrosion Interactions on Stainless Steel in Seawater. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation*, p. 245-257, 2005.

VINCENT, M; HARTEMANN, P; DEUTSCH, E, M. Antimicrobial applications of copper. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 585-591, 2016.

WAGNER, M. *et al.* Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS–matrix. **Water Research**, v. 43, p. 63–76, 2009.

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

WARNES, S.L. *et al.* Biocidal Efficacy of Copper Alloys against Pathogenic Enterococci Involves Degradations of Genomic and Plasmid DNAs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n.16, p.5390-5401, 2010.

WARNES, S.L.; KEEVIL, C.W. Inactivation of Norovirus on Dry Copper Alloy Surfaces. **Plos One**, v.8, p.1-9, 2013.

WHO. World Health Organization. Health Topics: *Salmonella*. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em: 15 de maio de 2018.

WIMPENNY, J. *et al.* Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 661-671, 2000.

WOLFRAN, Q. Desinfecção moderna. In. Semana de Estudos Agropecuários de Botucatu, 8., 1999, Botucatu. Curso. Botucatu: UNESP, 1994, 40 p.

YIN, B. *et al.* The Characterization of Biofilm Formation and Detection of Biofilm-Related Genes in *Salmonella* Isolated from Beef Processing Plants. **Foodborne pathogens and disease**, v. 15, n. 10, 2018.

ZHANG, P. *et al.* Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. **Bioelectrochemistry**, v. 101 p. 14–21, 2015.

ZHANG, M. *et al.* A high anticorrosive chromium-free conversion coating prepared with an alkaline conversion bath on electroless Ni–P coating. **Applied Surface Science**, v. 349, p. 108–115, 2015a.

ZHU, L. *et al.* Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. **Food Microbiology**, v.30, p. 303-310, 2012.

APÊNDICE A – Listas das cepas utilizadas no estudo

Tabela 1 – Identificação de ano e origem avícola de isolamento das cepas de *Salmonella* Enteritidis pertencentes à bacterioteca do CDPA e que foram utilizadas para os ensaios de formação de biofilme.

Identificação	Ano de isolamento	Origem avícola
35	2006	Carcaça
36	2006	Carcaça
170	1996	Carcaça
192	1999	Órgão
217	2000	Suabe de arrasto
219	2000	Órgão
224	2000	Órgão
230	2001	Suabe de arrasto
233	2001	Órgão
242	2001	Suabe de arrasto

ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista Applied and Environmental Microbiology:

"Antimicrobial property of copper surfaces against biofilm formation by Salmonella Enteritidis".

1 Antimicrobial property of copper surfaces against biofilm formation by *Salmonella*
2 Enteritidis

3

4 Karine P. Pontin,^a# Karen A. Borges,^a Thales Q. Furian,^a Daiane Carvalho,^a Daiane E.
5 Wilsamnn,^a Vivian Lucca,^a Gabriela Z. Chitolina,^a Carlos Tadeu P. Salle,^a Hamilton Luiz
6 de S. Moares,^a Vladimir P. do Nascimento^a

7

8 ^aCentro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária,
9 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

10

11 Running title: antimicrobial properties of copper

12

13 #Address correspondence to Karine P. Pontin, pontin.karine@gmail.com

14

15 **Abstract**

16 *Salmonella* é considerada um dos patógenos de maior relevância para o setor avícola, e o
17 sorovar *S. Enteritidis* é um dos mais frequentemente envolvido nas salmoneloses
18 alimentares. Devido à evolução da resistência antimicrobiana aos desinfetantes, o cobre
19 vem sendo estudado como uma possível alternativa ao aço inoxidável devido a sua
20 atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de
21 superfícies de cobre na anti-formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis. Para
22 avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizados cupons de 1 cm² de cobre 99,9%,
23 latão, cobre revestido com estanho e aço inoxidável (controle) (AISI 316) incubados com a
24 bactéria a 4°C, 12°C e 25°C. O método utilizado foi o de diluição, com teste de suspensão

25 em células planctônicas e a contagem bacteriana. Observou-se redução significativa na
26 produção de biofilme nas superfícies de cobre e latão nas três temperaturas avaliadas. Estes
27 resultados demonstraram efetividade na redução de *S. Enteritidis*, sugerindo assim, que
28 superfícies de cobre e suas ligas podem ser utilizadas como um antimicrobiano alternativo
29 no setor avícola para controle deste patógeno importante para a saúde pública.

30

31 Palavras-chave: *Salmonella*; biofilme; cobre; propriedades antimicrobianas.

32

33 **Importance:**

34 *Salmonella* spp. tem capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies de contato
35 com alimentos, representando um grande problema para a saúde pública por contaminação
36 do produto final e maior uso de desinfetantes. Com o surgimento da resistência aos
37 produtos químicos utilizados nas superfícies industriais, o interesse por agentes
38 antimicrobianos alternativos aumentou na saúde pública. O cobre foi reconhecido em 2008
39 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) como o primeiro agente
40 antimicrobiano metálico e pode ser utilizado como um complemento das práticas padrão de
41 limpeza e desinfecção das superfícies industriais. A importância de nossa pesquisa está em
42 demonstrar a efetividade das propriedades antimicrobianas do cobre conferindo redução da
43 formação de biofilme e diminuição da carga bacteriana persistente.

44

45 **INTRODUÇÃO**

46 Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Salmonella* spp. é um dos
47 principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos em vários países,
48 incluindo o Brasil (BRASIL, 2015, OMS, 2016). Os Centros de Controle e Prevenção de

49 Doenças dos Estados Unidos (CDC) estimam que todos os anos, pelo menos um milhão
50 dos casos de doenças transmitidas por alimentos neste país sejam causadas por *Salmonella*,
51 levando a mais 19.000 hospitalizações e cerca de 380 mortes (CDC, 2017). Os produtos de
52 origem avícola estão entre as principais fontes de transmissão deste patógeno ao homem,
53 sendo responsáveis por até 47% de todas as infecções (CDC 2011). *S. Enteritidis* está entre
54 os cinco sorovares mais comumente isolados de produtos avícolas, representando elevado
55 risco à segurança dos alimentos. Nos últimos anos, este sorovar tornou-se o mais comum
56 nos humanos em âmbito mundial, especialmente na Europa, onde responde por 39,5% de
57 todos os casos de salmoneloses confirmadas (EFSA, 2015; EFSA, 2017).

58 *S. Enteritidis* possui a habilidade de formar biofilmes em diversas superfícies
59 utilizadas na indústria de alimentos, inclusive aquelas presentes nos matadouros-
60 frigoríficos de aves. Diversos estudos comprovam o potencial de *Salmonella* para a
61 formação de biofilmes em diversos materiais, tais como vidro, polipropileno, poliestireno e
62 aço inoxidável (REUTER *et al.*, 2010; SCHONEWILLE *et al.*, 2012). A formação de
63 biofilme nas plantas processadoras de alimentos aumenta a chance de contaminação do
64 produto final e representa um grande risco à saúde do consumidor (ABDALLAH *et al.*,
65 2014; COLAGIORGI *et al.*, 2017). A adesão de bactérias ao alimento e às superfícies de
66 contato pode aumentar a deterioração do produto, levando a sérias perdas econômicas, além
67 de gerar um maior uso de produtos químicos, o que pode resultar na resistência
68 antimicrobiana aos desinfetantes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

69 Com o objetivo de reduzir o uso de desinfetantes e de antimicrobianos, o uso de
70 ligas de cobre como superfícies de contato clínico foi liberado nos Estados Unidos a partir
71 de 2008 (EPA, 2008). A ação antimicrobiana ocorre através da liberação de íons de cobre
72 da superfície, induzindo danos na membrana das bactérias e gerando perda conteúdo

73 citoplasmático. Além disso, espécies reativas de oxigênio produzidas por íons de cobre
74 induzem maiores danos às estruturas celulares e até a degradação do DNA (GRASS *et al.*,
75 2011; LUO *et al.*, 2017). Diferentes fatores podem interferir na ação do cobre, incluindo
76 temperatura, características da liga de cobre, umidade, espécies bacterianas, tipo de contato
77 entre as bactérias e a superfície, estado de oxidação do cobre, entre outros (BLEICHERT *et*
78 *al.*, 2014; VINCENT *et al.*, 2016). Entretanto, ainda não se conhece completamente o
79 mecanismo de ação das superfícies úmidas de cobre e se o cobre e suas ligas apresentam
80 potencial antimicrobiano na prevenção de biofilme por *Salmonella* Enteritidis nas
81 temperaturas encontradas em ambientes de matadouros-frigoríficos.

82 Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de
83 superfícies de cobre frente a anti-formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis como
84 uma alternativa ao aço inoxidável para superfícies de contato com alimentos.

85

86 **RESULTADOS**

87 **Efeito das superfícies e das temperaturas na anti-formação de biofilme por *Salmonella*** 88 **Enteritidis**

89 Na Tabela 1 estão descritas as contagens bacterianas obtidas nos ensaios de anti-
90 formação de biofilme por *S. Enteritidis* nas quatro superfícies avaliadas e em três
91 temperaturas de incubação, durante 24 horas.

92

93

94

95 Tabela 1 – Média das contagens bacterianas (\log_{10} UFC.cm⁻²) obtidas no ensaio de anti-
 96 formação de biofilmes por *S. Enteritidis* para cada superfície a 4°C, 12°C e
 97 25°C.

Superfície	Temperatura		
	4°C	12°C	25°C
Aço Inoxidável	5.688±0,64 ^{Aa}	5.895±0,28 ^{Aa}	6.012±0,35 ^{Aa}
Cobre	2.641±2,02 ^{Bb}	4.208±0,74 ^{Bb}	4.561±1,77 ^{Bb}
Latão	2.797±1,85 ^{Bb}	3.497±1,10 ^{Bb}	4.557±1,29 ^{Bb}
Estanho	5.692±0,19 ^{Aa}	5.862±0,21 ^{Aa}	6.083±0,34 ^{Aa}

98 Legenda: Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística
 99 significativa ($p < 0,05$) entre as superfícies na mesma temperatura.

100 Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa
 101 ($p < 0,05$) entre as temperaturas na mesma superfície.

102 Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (DP) das contagens das colônias das dez
 103 cepas de *S. Enteritidis*.

104

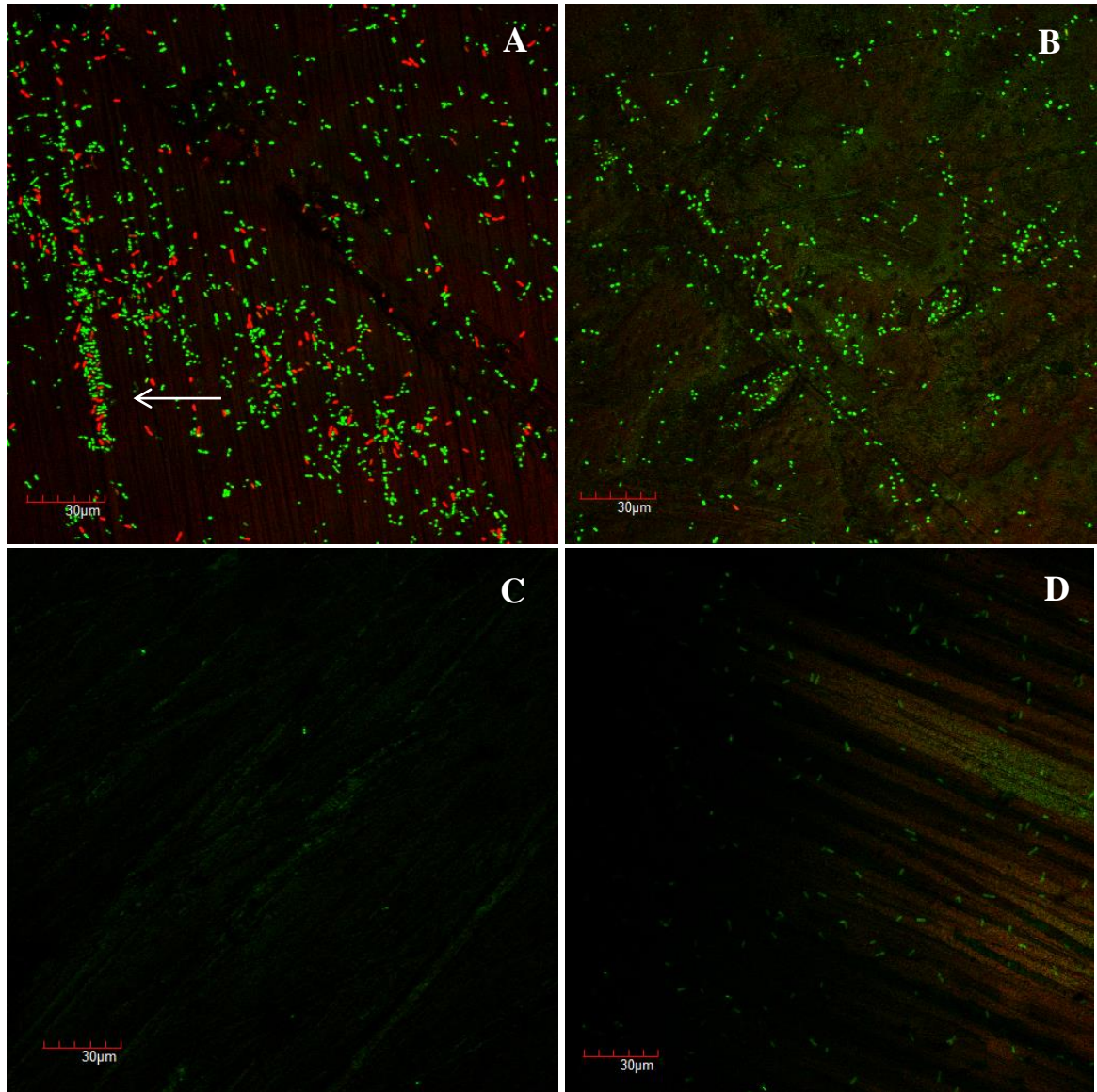
105 **Microscopia confocal de varredura a laser**

106 Na Figura 1 estão apresentadas as micrografias geradas por CLSM para avaliação
 107 da formação de biofilmes por *S. Enteritidis* nas superfícies de cobre, latão, cobre revestido
 108 com estanho e aço inoxidável a 25°C.

109

110

111 Figura 1 - Micrografias geradas por CLSM da formação de biofilmes por *Salmonella*
112 Enteritidis nas quatro superfícies avaliadas, quando incubadas a 25°C.



114 Legenda: (A) Cupons de aço inoxidável (AISI 316). (B) Cupons de cobre revestido
115 integralmente com estanho. (C) Cupons de cobre 99,9% (C11000). (D) Cupons de latão
116 70% Cu (C26000). Células viáveis em verde e inviáveis em vermelho. A seta indica uma
117 maior adesão celular junto às fissuras.
118

121 **DISCUSSÃO**

122 Diversos estudos avaliam a atividade antimicrobiana do cobre utilizando
123 nanopartículas (BABAEI *et al.*, 2017; RAGHUNATH; PERUMAL, 2017; DUFFY *et al.*,
124 2018; SENGAN *et al.*, 2019; JOSHI *et al.*, 2019) frente a diversos microrganismos
125 patogênicos, inclusive *Salmonella*. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que avaliam a
126 implantação de superfícies de cobre na indústria avícola. Até o momento, apenas dois
127 estabelecimentos que produzem alimentos utilizam superfícies de cobre na sua estrutura,
128 sendo um abatedouro-frigorífico de aves e outro de suínos, ambos localizados no Chile.
129 Estudos realizados pelos estabelecimentos demonstraram que após a implementação das
130 superfícies em 2018, observou-se uma redução de praticamente 100% no crescimento de
131 microrganismos patogênicos, reduzindo a contaminação da superfície de contato direto em
132 20% e em 34% em pisos e ralos (AVINEWS, 2019). Faúndez *et al.* (2004) sugerem que
133 folhas de cobre nas superfícies poderiam ser utilizadas para diminuir a carga bacteriana
134 persistente após a limpeza diária, evitar a formação de biofilmes, reduzir a viabilidade de
135 bactérias patogênicas, reduzir a contaminação cruzada e para atuar como autodesinfetantes
136 em áreas onde a carga bacteriana é continuamente renovada, como em matadouros-
137 frigoríficos, por exemplo.

138 O cobre eletrolítico e o latão apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na
139 contagem bacteriana, quando comparados ao aço inoxidável e ao cobre revestido com
140 estanho. Ao analisar as diferenças de adesão das superfícies na CMSL, também se
141 observou uma menor adesão celular no cobre e no latão em relação às demais superfícies.
142 A ação antimicrobiana de cupons de cobre eletrolítico (99.9% Cu) frente a outros
143 microrganismos já havia sido demonstrada por Noyce *et al.* (2006a) através de testes
144 bacteriológicos e da Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC). Estes

145 autores demonstraram a ação do cobre frente a cepas de MRSA e de *E. coli* O157
146 incubados a 22°C. Em contraste, estes microrganismos permaneceram viáveis após a
147 incubação em cupons de aço inoxidável por até 72 horas a 22°C. A ação antimicrobiana do
148 cobre também já foi demonstrada frente a isolados de *Staphylococcus haemolyticus*,
149 observando-se danos à membrana plasmática e morte celular após sete minutos de
150 exposição ao metal, diferenciando-se das superfícies de aço inoxidável em que a maioria
151 das células estavam viáveis (ESPIRITO SANTO *et al.*, 2012). Um estudo realizado por
152 Espirito Santo *et al.* (2011) demonstrou claramente a correlação entre a liberação de íons de
153 cobre pelas superfícies e seu acúmulo pelas células bacterianas, levando à morte celular em
154 um período de três horas. Com base nos resultados encontrados em outras pesquisas, é
155 improvável que as superfícies de cobre tenham a capacidade de inibir a adesão bacteriana
156 inicial, uma vez que esta pode iniciar logo após o contato da bactéria com a superfície
157 (NOYCE *et al.*, 2006a). Após a morte celular, possivelmente as células mortas
158 desprendem-se das superfícies, uma vez que não se observa adesão celular depois de horas
159 em contato (NOYCE *et al.*, 2006; ESPIRITO SANTO *et al.*, 2012). Esses trabalhos
160 corroboram os resultados encontrados neste experimento, no qual foi observado um número
161 muito baixo de bactérias aderidas após 24 horas de contato com o cobre.

162 De acordo com a literatura, as propriedades antimicrobianas da superfície são
163 superiores à medida que o teor de cobre das ligas aumenta (MICHELS *et al.*, 2005;
164 MIKOLAY *et al.*, 2010). Uma vez que o latão e o cobre eletrolítico apresentam diferentes
165 concentrações de cobre na sua composição, poderia existir diferença na atividade
166 antimicrobiana entre as duas superfícies. Porém, não foi observado diferença estatística
167 significativa ($p > 0,05$) entre elas, independentemente da temperatura avaliada. Estes
168 resultados indicam que mesmo uma liga com menor teor cúprico apresenta atividade

169 antimicrobiana semelhante a uma superfície de cobre 99,9%, demonstrando o potencial de
170 aplicação de ligas na indústria avícola em virtude de custos reduzidos para implantação em
171 relação ao cobre eletrolítico. Apesar deste teste não ter demonstrado diferença estatística
172 significativa entre as contagens bacterianas do latão e do cobre, a CLSM mostrou uma
173 menor quantidade de células aderidas no cupom de cobre. A adesão celular apresentada no
174 cupom de latão pode ser justificada pelo mecanismo de ação ser mais lento em superfícies
175 úmidas (ZHU *et al.*, 2012; ESPIRITO SANTO *et al.*, 2011). Neste contexto, Noyce *et al.*
176 (2006) demonstraram que, apesar de levarem mais tempo para obter reduções significativas
177 das contagens bacterianas, as superfícies de latão (80% Cu) também demonstraram boa
178 capacidade bactericida frente a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA),
179 quando comparadas às superfícies de cobre eletrolítico. A ação antimicrobiana das ligas,
180 com concentrações de cobre variando entre 70 e 90%, também já foi demonstrada frente a
181 isolados de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*
182 (MEHTAR *et al.*, 2008).

183 No Brasil, ainda não há nenhum estudo realizado em plantas de matadouros-
184 frigoríficos, devido à limitação imposta pela legislação. De acordo com a legislação
185 brasileira, o cobre só pode ser utilizado em superfícies que tenham contato com alimento se
186 for revestido com ouro, prata, níquel ou estanho (BRASIL, 2007). De acordo com
187 pesquisadores, o cobre é proibido no Brasil devido a uma possível toxicidade que poderia
188 ocorrer nos alimentos em contato com este metal (ANDRADE *et al.*, 2004; FAÚNDES *et*
189 *al.*, 2004). Porém, já foi demonstrado que os alimentos expostos aos íons cúpricos tendem a
190 atingir teores máximos de 2,5mg/100g após alguns minutos (FAÚNDEZ *et al.*, 2004),
191 sendo de 0,9 a 1,6 mg a ingestão diária de cobre recomendada e o limite máximo de 10 mg
192 para adultos entre 19 e 50 anos (BRASIL, 2005). Em condições normais de processamento,

193 o tempo de exposição dos produtos alimentícios às superfícies é de poucos minutos,
194 devendo a aquisição de cobre permanecer muito baixa. Embora a toxicidade humana possa
195 ocorrer, a exposição ao cobre é considerada segura, evidenciada também pelo uso
196 disseminado de dispositivos intrauterinos de cobre e pelo baixo risco de reações adversas
197 devido ao contato dérmico com o metal. A baixa sensibilidade do tecido humano ao cobre
198 pode ser contrastada com a dos microrganismos que são extremamente sensíveis aos seus
199 efeitos tóxicos (O’GORMAN; HUMPHREY, 2012). Com o objetivo de avaliar o cobre
200 dentro das normas impostas pela legislação brasileira, também foi feita a avaliação do
201 cobre revestido com estanho. O estanho foi escolhido por apresentar um menor custo em
202 relação ao ouro, à prata e ao níquel. Porém, observou-se que as superfícies de cobre
203 revestidas integralmente por estanho não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) em
204 relação ao controle em nenhuma temperatura avaliada, possivelmente devido ao
205 mecanismo de ação dos íons de cobre, que ocorre comprovadamente por contato direto da
206 bactéria com o cobre (GRASS *et al.*, 2011). Desta forma, o revestimento das superfícies de
207 cobre, conforme exigido pela legislação brasileira, impede as propriedades antimicrobianas
208 expostas a partir do contato e da liberação de íons.

209 Avaliando-se a ação antimicrobiana das superfícies na anti-formação de biofilme
210 por *Salmonella* Enteritidis, observou-se um alto desvio padrão das médias das contagens
211 em todas as superfícies antimicrobianas e em todas as temperaturas, representando a
212 variabilidade entre as cepas. Trabalhos anteriores já demonstraram que mesmo dentro de
213 um mesmo sorovar existem variações importantes quanto à habilidade em produzir
214 biofilme devido às características intrínsecas das cepas (BORGES *et al.*, 2018).

215 É importante ressaltar que o cobre também apresenta limitações. Critchley *et al.*
216 (2008) constataram o isolamento de microrganismos resistentes a partir de tubulações de

217 cobre. Há um potencial uso e aplicação prática de ligas de cobre para evitar a adesão de
218 bactérias e os efeitos deletérios do biofilme (KIELEMOES; VERSTAETE, 2001).
219 Entretanto, em condições naturais, provavelmente só serão possíveis para exposições de
220 curto prazo de 1 a 2 dias. Desta forma, nos casos em que a superfície é completamente
221 limpa em intervalos regulares, essa liberação lenta de cobre biocida pode ser interessante.
222 Van der Kooij *et al.* (2005) demonstrando a limitação do cobre para remoção de biofilme
223 em tubulações após 2 anos. Contudo, a indústria avícola possui processos de higienização
224 pré-operacional e operacional realizados rotineiramente, corroborando os resultados
225 encontrados.

226 Em relação ao efeito das temperaturas na anti-formação do biofilme por *Salmonella*
227 *Enteritidis*, diversos trabalhos já demonstraram que a temperatura é um dos fatores mais
228 importantes na formação destas estruturas (OLIVEIRA *et al.*, 2014; CABARKAPA *et al.*,
229 2015; BORGES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018). Ao comparar o efeito da
230 temperatura em cada superfície, não se observou diferença significativa ($p>0,05$) entre elas
231 para o aço inoxidável e o estanho, indicando que possivelmente este não é o fator mais
232 importante para a adesão bacteriana nestas superfícies. Giaouris *et al.* (2005) também não
233 encontraram diferenças estatísticas significativas na adesão de biofilme de *S. Enteritidis* em
234 cupons de aço inoxidável incubados durante 7 dias a 5°C, 20°C e 37°C. Entretanto, é
235 importante destacar que estas superfícies não apresentaram atividade antimicrobiana
236 significativa. Logo, a contagem bacteriana é mais elevada nestas superfícies do que nas
237 demais, o que possivelmente interferiu na análise estatística.

238 O cobre e o latão apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$) entre
239 as temperaturas de incubação. As menores contagens bacterianas foram observadas a 4°C
240 para ambas as superfícies, sendo significativamente ($p<0,05$) menores do que aquelas

241 observadas a 25°C. Observou-se uma tendência de aumento da contagem bacteriana
242 conforme o aumento das temperaturas de incubação. Estes resultados diferem de estudos
243 anteriores, nos quais os autores concluíram que o efeito antimicrobiano aumenta à medida
244 que a temperatura passa da refrigeração para a temperatura ambiente (FAUNDEZ *et al.*,
245 2004; MICHELS *et al.*, 2005; MEHTAR *et al.*, 2008). Uma possível justificativa é que
246 estes trabalhos avaliam a atividade antimicrobiana em superfícies secas, enquanto o
247 presente trabalho avaliou a anti-formação de biofilme em superfícies úmidas. Segundo
248 Kielemoes e Versaete, (2001) a atuação dos íons liberados pelo cobre é distinta em
249 superfícies úmidas e secas pois o estresse e as condições de sobrevivência são diferentes
250 daquelas dos sistemas aquosos. Outra explicação seria a diminuição da temperatura de
251 incubação poder reduzir o crescimento bacteriano, mas também favorecer a produção de
252 biofilme (SCHONEWILLE *et al.*, 2012). Diversos autores demonstraram que a formação
253 do biofilme é mais intensa entre 25°C e 30°C, pois a produção de celulose e fimbria ocorre
254 apenas em temperaturas abaixo de 30°C, especialmente entre 25°C e 28°C (STEPANOVIĆ
255 *et al.*, 2003; CABARKAPA *et al.*, 2015; PIRAS *et al.*, 2015).

256 Os resultados obtidos neste trabalho reforçam os dados obtidos em outros trabalhos
257 a respeito da atividade antimicrobiana do cobre e demonstram o seu potencial de utilização
258 na indústria avícola. Poucos estudos foram realizados para avaliar microscopicamente os
259 danos e a viabilidade das células bacterianas quando em contato com o cobre,
260 principalmente quando se trata da formação de biofilme. Neste contexto, este é um trabalho
261 inicial que visa demonstrar os benefícios que o cobre pode trazer para a medicina
262 veterinária, não somente na segurança dos alimentos como também na produção animal e
263 na saúde pública.

264

265 **MATERIAIS E MÉTODOS**

266 **Cepas de *Salmonella* Enteritidis**

267 Foram utilizadas dez cepas de *S. Enteritidis* isoladas de fontes avícolas e
 268 previamente confirmadas quanto ao potencial de formação de biofilme a $4\pm 1^\circ\text{C}$, $12\pm 1^\circ\text{C}$ e
 269 $25\pm 1^\circ\text{C}$ (BORGES *et al.*, 2018; CARVALHO, 2019). As cepas encontravam-se estocadas a
 270 -80°C em caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra) com 25% de
 271 glicerol (Synth; Diadema, Brasil). As cepas foram reativadas em caldo BHI e
 272 posteriormente cultivadas em ágar de desoxicolato lisina xilose (XLD) (Merck; Darmstadt,
 273 Alemanha) e confirmadas quanto à pureza.

274

275 **Preparação das superfícies**

276 Os cupons foram produzidos e fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Cobre
 277 (PROCOBRE) (São Paulo, Brasil) e foram confeccionados nas dimensões de 1 cm
 278 (largura) x 1 cm (comprimento) x 0,1 cm (espessura). A Tabela 2 descreve a composição
 279 das ligas testadas neste estudo.

280

281 Tabela 2 – Composição metálica das quatro superfícies avaliadas no experimento.

Metal	SNU ^a n°	Composição (%)						
		Cu	Zn	Sn	Ni	Mn	Fe	Cr
Cobre eletrolítico	C11000	99,9						
Latão	C26000	70	30					
Cobre Estanhado	Cu + Sn	*		*				
Aço inoxidável ^b	AISI 316				10	2	68,92	16

282 Legenda: Cobre (Cu), Zinco (Zn), Estanho (Sn), Níquel (Ni) Manganês (Mn), Ferro (Fe) e
283 Cromo (Cr).

284 ^a Sistema de Numeração Unificado

285 ^b Aço inoxidável também contém 0,08% C, 1% Si e 2% Mo.

286 * Cobre estanhado não é considerado uma liga, somente revestimento do cobre
287 integralmente com estanho.

288

289 O aço inoxidável (AISI 316) foi utilizado como superfície controle, visto que este
290 material é amplamente encontrado em matadouros-frigoríficos de aves. O cobre eletrolítico
291 (C11000, 99.9% Cu) representa o teor máximo de cobre a ser encontrado, e o latão
292 (C26000, 70% Cu/ 30% Zn) é uma liga metálica de cobre e zinco. Também foi utilizado o
293 cobre estanhado, que não é considerado uma liga, somente o cobre revestido integralmente
294 com estanho. Esta superfície foi utilizada para seguir a legislação brasileira, que proíbe o
295 contato direto do cobre, latão ou bronze com alimentos (BRASIL, 2007). O revestimento
296 foi realizado por uma empresa privada, localizada em Cachoeirinha (RS, Brasil).

297

298 **Preparação do inóculo**

299 O preparo dos inóculos para os ensaios com biofilmes foi realizado de acordo com
300 Stepanovik *et al.* (2007), com adaptações. Inicialmente, as cepas de *S. Enteritidis* foram
301 incubadas em caldo BHI a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas. Após, foi feito o plaqueamento em ágar
302 tripticase de soja (TSA) (Oxoid; Hampshire, Inglaterra), seguido de incubação a $37\pm 1^\circ\text{C}$
303 por 18-24 horas. Posteriormente, uma colônia do TSA foi inoculada em caldo tripton de
304 soja sem glicose (TSB) (Difco Laboratories; Detroit, Estados Unidos) e incubada a $37\pm 1^\circ\text{C}$
305 por ± 18 horas. As turvações do TSB foram ajustadas até a escala 1 de McFarland,

306 correspondendo a um intervalo de 0,224 a 0,300 em espectrofotômetro no comprimento de
307 onda de 620nm (SP-22 – Biospectro; São Paulo, Brasil).

308

309 **Ensaio de adesão**

310 Para a avaliação da anti-formação de biofilme, cada superfície foi testada em
311 triplicatas biológicas em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços de fundo plano
312 (Kasvi; São José dos Pinhais, Brasil). Foram adicionados 3 mL do inóculo e um cupom em
313 cada poço, e as placas foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ (simulando a temperatura ambiente de
314 processamento de matadouros-frigoríficos), $12\pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura máxima da sala de cortes
315 permitida pela legislação brasileira) e $4\pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura da sala refrigeração) (BRASIL,
316 1998), durante 24 horas. Após a incubação, os cupons de cada material foram retirados com
317 o auxílio de uma pinça estéril e lavados com 5 mL de água peptonada tamponada 0,1%
318 (APT) (Merck; Darmstadt, Alemanha) para a remoção das células planctônicas. Em
319 seguida, os cupons foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de APT 0,1% e
320 homogeneizados com esferas de vidro em agitador vórtex (Kasvi, São José dos Pinhais,
321 Brasil) durante um minuto para a desadesão das células sésseis.

322 A contagem bacteriana de cada cupom foi realizada através de diluições seriadas
323 (10^{-1} a 10^{-4}) em tubos contendo solução salina 0,85% através da técnica de *drop plate*. As
324 placas foram incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas em condições de aerobiose para posterior
325 contagem (UFC/cm²). Para determinar a contagem microbiológica, foi considerada a área
326 de superfície dos dois lados do cupom, assim como a área lateral, conforme ilustrado na
327 fórmula a seguir (GEHLEN, 2016):

328

329

330
$$\text{UFC.cm}^{-2} = (\text{Vd/Va}) \times \text{M} \times (\text{D/A})$$

331

332 Sendo:

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

334 Va: volume da alíquota utilizada no plaqueamento (0,01 mL)

335 M: média da contagem bacteriana obtida nas placas (UFC)

336 D: diluição utilizada na contagem

337 A: área do cupom (2,4 cm²)

338

339 **Microscopia Confocal de Varredura a Laser**

340 A Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM) foi realizada para
 341 visualização *in situ* das células bacterianas viáveis e inviáveis e para comparação da adesão
 342 de biofilmes nas diferentes superfícies. A preparação do material para execução dos ensaios
 343 foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido pelo Centro de Microscopia e
 344 Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

345 Duas cepas de *S. Enteritidis* da nossa coleção de cultras foram selecionadas para
 346 este ensaio por serem capazes de formar biofilme em todas as temperaturas avaliadas
 347 (25±1°C, 12±1°C e 4±1°C). O teste foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno
 348 com 12 poços contendo um cupom de cada superfície em cada poço. Primeiramente, foram
 349 adicionados 3 mL do inóculo padronizado a 10⁸UFC/mL em cada poço, seguido de
 350 incubação da placa a 25°C durante 24 horas. Após, foi realizada a lavagem dos cupons com
 351 5 mL de água destilada estéril para remoção das células não aderidas. Um volume de 2 µL
 352 de uma mistura 1:1 de corantes fluorescentes SYTO9 (estoque 3.34 mM em DMSO) e
 353 iodeto de propídio (IP; estoque 20 mM em DMSO) do *LIVE/DEAD*[®] *BacLight*TM *Viability*

354 *Kit* (Invitrogen; Carlsbad, Estados Unidos) foi adicionado a 497,5 µL de solução salina
355 0,85% estéril. Um total de 50 µL desta solução foi depositado sobre os cupons. A placa
356 contendo os cupons foi então incubada em temperatura ambiente e protegida da luz por 15
357 minutos para permitir a marcação fluorescente das bactérias. As análises foram realizadas
358 no CMM – UFRGS em microscópio confocal modelo *FluoView*TM FV10000 (Olympus®
359 Inc. Tóquio, Japão), onde se reconstruiu tridimensionalmente as seções no eixo Z. A
360 análise e o processamento das imagens foi feita utilizando-se o *software Olympus FluoView*
361 *v.4*.

362

363 **Análise estatística**

364 O programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software; San Diego, EUA) foi utilizado
365 para a análise estatística dos dados. Foi adotado como referencial para as análises um nível
366 de significância de 5%. Os resultados obtidos na adesão do biofilme bacteriano nas
367 diferentes temperaturas e superfícies foram analisados por meio da análise de variância
368 com comparação das médias realizadas com o teste de Bonferroni.

369

370 **CONCLUSÕES**

371 Foi observada atividade antimicrobiana nas superfícies de cobre eletrolítico (99,9%;
372 C11000) e de latão (70% Cu; C26000) frente à anti-formação de biofilme por *Salmonella*
373 *Enteritidis*, nas três temperaturas de incubação avaliadas, quando comparadas ao aço
374 inoxidável e ao cobre revestido por estanho. O latão, liga com menor teor de cobre,
375 mostrou ter os mesmos potenciais antimicrobianos do que o cobre eletrolítico. A atividade
376 antimicrobiana do cobre reduziu à medida que a temperatura aumentou.

377

378 **AGRADECIMENTOS**

379 Este estudo contou com o apoio do Instituto Brasileiro de Cobre (PROCOBRE) e da
380 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

381

382 **REFERÊNCIAS**

383 Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. 2014. Biofilm formation and
384 persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments.

385 Arch Microbiol 196:453–472.

386 ANDRADE, E. C. B. *et al.* Avaliação do teor de cobre e zinco em carnes cruas,
387 processadas termicamente, resfriadas e congeladas no período de um mês. Ciência e
388 Tecnologia dos Alimentos, v.24, n. 3, p.393-396, 2004.

389 Avinews - Revista brasileira. Available at: < [https://avicultura.info/chile-agrosuper-
391 implementa-uso-de-cobre-en-planta-procesadora-avicola/](https://avicultura.info/chile-agrosuper-
390 implementa-uso-de-cobre-en-planta-procesadora-avicola/)> Accessed on Ago. 16,
392 2019.

392 Babaei S, Bajelani F, Mansourizaveleh O, Abbasi A, Oubari F. 2017. A study of the
393 bactericidal effect of copper oxide nanoparticles on *Shigella sonnei* and *Salmonella*
394 *Typhimurium*. J Babol Univ Med Sci 19:76–81.

395 Bleichert P, Santo CE, Hanczaruk M, Meyer H, Grass G. 2014. Inactivation of bacterial
396 and viral biothreat agents on metallic copper surfaces. BioMetals 27:1179–1189.

397 Borges KA, Furian TQ, Souza SN, Menezes R, Tondo EC, Salle CTP, Moraes HLS,
398 Nascimento VP. 2018. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at
399 different temperature conditions. Pesqui Vet Bras 38:71–76.

400 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº210. Regulamento

- 401 Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Brasília,
402 DF: Diário Oficial da União, Poder Executivo, 1998.
- 403 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de
404 setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada
405 (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, 2005.
- 406 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 20, de 22 de março de
407 2007. Regulamento Técnico sobre disposições para embalagens, revestimentos,
408 utensílios, tampas e equipamentos metálicos em contato com alimentos. Brasília,
409 2007.
- 410 Brasil 2015. Doenças Transmitidas por Alimentos. Ministério da Saúde e Secretaria de
411 Vigilância em Saúde, Brasília. Available at <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais--DTA-2015.pdf>> Accessed on Nov. 15, 2005.
- 412
413
- 414 Cabarkapa I., Skrinjar M., Levic J., Kokic B., Blagojev N., Milanov D. & Suvajdzic L.
415 2015. Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. Acta Vet., Beogr.
416 65:371-389
- 417 CDC 2011. CDC 2011 estimates: findings. Center for Disease Control. Available at
418 <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne--estimates.html>> Accessed
419 on Jan. 16, 2005.
- 420 Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2017. *Listeria*
421 *monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. Pathogens 6.
- 422 Critchley MM, Cromar NJ, McClure NC, Fallowfield HJ. 2003. The influence of the
423 chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. J
424 Appl Microbiol 94:501–507.

- 425 De Oliveira DCV, Fernandes Júnior A, Kaneno R, Silva MG, Araújo Júnior JP, Silva NCC,
426 Rall VLM. 2014. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on
427 temperature and surface material. *Foodborne Pathog Dis* 11:478–483.
- 428 Duffy LL, Osmond-McLeod MJ, Judy J, King T. 2018. Investigation into the antibacterial
429 activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant
430 isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Food Control* 92:293–300.
- 431 EPA - Environmental Protection Agency. EPA registers copper-containing alloy products
432 Washington; 2008. Available at: [http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-](http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm)
433 [alloy-products.htm](http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm). Accessed on Jan. 16, 2019.
- 434 Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. 2004. Antimicrobial activity of copper
435 surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC*
436 *Microbiol* 4:1–7.
- 437 Giaouris E, Chorianopoulos N, Nychas GJE. 2005. Effect of temperature, pH, and water
438 activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* enteritidis PT4 on stainless
439 steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance
440 measurements. *J Food Prot* 68:2149–2154.
- 441 Grass G, Rensing C, Solioz M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl*
442 *Environ Microbiol* 77:1541–1547.
- 443 Joshi NC, Kumar V, Singh A. 2019. A Brief Discussion on the Green Synthesis and
444 Characterisation of Copper Nanoparticles (CuNPs). *Int J Res Advent Technol*
445 7:201–204.
- 446 Kielemoes J, Verstraete W. 2001. Influence of copper-alloying of austenitic stainless steel
447 on multi-species biofilm development. *Lett Appl Microbiol* 33:148–152.
- 448 Luo J, Hein C, Mücklich F, Solioz M. 2017. Killing of bacteria by copper, cadmium, and

- 449 silver surfaces reveals relevant physicochemical parameters. *Biointerphases*
450 12:020301.
- 451 Mehtar S, Wiid I, Todorov SD. 2008. The antimicrobial activity of copper and copper
452 alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from
453 healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *J Hosp Infect* 68:45–51
- 454 Michels HT, Wilks S a, Noyce JO, Keevil CW. 2005. Copper Alloys for Human Infectious
455 Disease Control. Mater Sci Technol Conf Pittsburgh, PA Copp 21st Century Symp
456 11.
- 457 Mikolay A, Huggett S, Tikana L, Grass G, Braun J, Nies DH. 2010. Survival of bacteria on
458 metallic copper surfaces in a hospital trial. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1875–
459 1879.
- 460 Noyce JO, Michels H, Keevil CW. 2006. Use of copper cast alloys to control *Escherichia*
461 *coli* O157 cross-contamination during food processing. *Appl Environ Microbiol*
462 72:4239–4244.
- 463 Noyce JO, Michels H, Keevil CW. 2006. Potential use of copper surfaces to reduce
464 survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare
465 environment. *J Hosp Infect* 63:289–297.
- 466 O’Gorman J, Humphreys H. 2012. Application of copper to prevent and control infection.
467 Where are we now? *J Hosp Infect* 81:217–223.
- 468 Piras F., Fois F., Consolati S.G., Mazza R. & Mazzette R. 2015. Influence of temperature,
469 source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig
470 slaughterhouses. *J. Food Prot.* 78:1875-1878.
- 471 Raghunath A, Perumal E. 2017. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a
472 promise for the future. *Int J Antimicrob Agents* 49:137–152.

- 473 Reuter M, Mallett A, Pearson BM, Van Vliet AHM. 2010. Biofilm formation by
474 *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*
475 76:2122–2128.
- 476 Rodrigues LB, Webber B, Levandowski R, Gehlen SS, Ruschel dos Santos L, Pilotto F,
477 Tondo EC, Do Nascimento VP. 2018. Biofilm Formation by *Salmonella* Enteritidis
478 at Different Incubation Temperatures. *Acta Sci Vet* 47:1–6.
- 479 Santo CE, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. 2011.
480 Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol* 77:794–
481 802.
- 482 Santo CE, Quaranta D, Grass G. 2012. Antimicrobial metallic copper surfaces kill
483 *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiologyopen* 1:46–52
- 484 Sengan M, Subramaniyan SB, Arul Prakash S, Kamlekar R, Veerappan A. 2019. Effective
485 elimination of biofilm formed with waterborne pathogens using copper
486 nanoparticles. *Microb Pathog* 127:341–346.
- 487 Schmidt MG, Von Dessauer B, Benavente C, Benadof D, Cifuentes P, Elgueta A, Duran C,
488 Navarrete MS. 2016. Copper surfaces are associated with significantly lower
489 concentrations of bacteria on selected surfaces within a pediatric intensive care unit.
490 *Am J Infect Control* 44:203–209.
- 491 Schonewille E, Nesse LL, Hauck R, Windhorst D, Hafez HM, Vestby LK. 2012. Biofilm
492 building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment.
493 *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:360–365.
- 494 Stepanović S., Ćirković I., Mijač V. & Švabić-Vlahović M. 2003. Influence of the
495 incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by
496 *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* 20:339-343.

- 497 Van Der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJH. 2005. Biofilm formation and
498 multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper,
499 stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res* 39:2789–2798.
- 500 Vincent M, Hartemann P, Engels-Deutsch M. 2016. Antimicrobial applications of copper.
501 *Int J Hyg Environ Health* 219:585–591.
- 502 Zhu L, Elguindi J, Rensing C, Ravishankar S. 2012. Antimicrobial activity of different
503 copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*.
504 *Food Microbiol* 30:303–310.
- 505 WHO 2016. *Salmonella*. World Health Organization, Geneva. Available at: <[http://](http://www.who.int/topics/salmonella/en/)
506 www.who.int/topics/salmonella/en/> Accessed on Apr. 16, 2019.