



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ESTUDO DE UM REVESTIMENTO
ANTIMICROBIANO PARA USO DOMÉSTICO

por

Liliana Santos Mendes

Fevereiro de 2022



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

ESTUDO DE UM REVESTIMENTO ANTIMICROBIANO PARA USO DOMÉSTICO

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia e Inovação

por

Liliana Santos Mendes

Orientador: Joana Inês Bastos Barbosa

Co-orientador: Paula Cristina Maia Teixeira

Fevereiro de 2022

Resumo

As cozinhas são ambientes que contêm um grande número de bactérias. Na sua maioria são inofensivas, mas também têm sido encontrados patogénicos como *Salmonella* e *Campylobacter*. A presença destes patogénicos é preocupante, pois acumulam-se em alguns locais (frigoríficos, lava-louças, tábuas de corte e bancadas) e podem ser transmitidos para alimentos que vão ser consumidos causando toxinfecções alimentares. Todos os anos são reportados milhares de casos de doenças de origem alimentar. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade antimicrobiana de um revestimento em spray, à base de compostos quaternários de amónio, aplicado em diferentes superfícies e, de seguida, avaliar a sua capacidade em prevenir possíveis contaminações cruzadas.

Numa primeira fase, foi avaliada a atividade antimicrobiana do revestimento contra isolados de *Campylobacter* e *Salmonella* em superfícies de inox, acrílico, mármore e silicone, utilizando o método preconizado pela ISO 22196 (2011). Para *Campylobacter* spp. não foi possível determinar a sua inibição nas diferentes superfícies, uma vez que o patogénico não se multiplicou nas condições controlo. Como trabalho futuro, seria importante ajustar o protocolo de forma a contornar este problema. Para *Salmonella* spp., foram encontradas grandes diferenças entre as superfícies tratadas e as não tratadas, demonstrando que o revestimento se mostrou eficaz em inibir este patogénico. De seguida, foi avaliada a capacidade do revestimento em impedir contaminações cruzadas entre uma superfície contaminada com um alimento e um alimento não contaminado. Neste caso, quando o patogénico *Salmonella* foi incorporado numa matriz e colocado em cima de uma determinada superfície tratada com revestimento, o mesmo não foi inibido e contaminou o alimento que posteriormente foi colocado em contacto com a superfície contaminada. Esta contaminação cruzada ocorreu independentemente do tempo de contacto do alimento (10 segundos ou 2 horas) e do material da superfície testada. Verificou-se, assim, que o revestimento não eliminou *Salmonella* quando a mesma está incorporada numa matriz alimentar. Com a realização deste trabalho, verificou-se que o revestimento tem uma boa atividade antimicrobiana segundo a norma ISO 22196:2011. No entanto, quando se adiciona a bactéria numa matriz alimentar a utilização do revestimento não diminui a transferência de bactérias das superfícies para o alimento, mostrando que a matriz alimentar protege a bactéria da atuação do revestimento.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., Revestimento antimicrobiano, Superfícies, Contaminação cruzada.

Abstract

Kitchens are environments that contain a large number of bacteria. They are mostly harmless, but pathogens such as *Salmonella* and *Campylobacter* have also been found. The presence of these pathogens is worrying, as they accumulate in some places (refrigerators, washbasins, cutting boards and countertops) and can be transmitted to food that will be consumed, leading to the appearance of food infection. Thousands of cases of foodborne illnesses are reported every year.

Thus, the objective of the present work was to determine the antimicrobial activity of a spray coating, based on quaternary ammonium compounds, applied to different surfaces, and then to evaluate its ability to prevent possible cross-contamination.

First, the antimicrobial activity of the coating against *Campylobacter* and *Salmonella* isolates on stainless steel, acrylic, marble and silicone surfaces was evaluated, using the ISO 22196 (2011) method. For *Campylobacter* spp. it was not possible to determine its inhibition on different surfaces, as the pathogen was not able to grow under control conditions. In future work, it would be important to adjust the protocol to get around this problem. For *Salmonella*, great differences were found between treated and untreated surfaces, demonstrating that the coating was effective in inhibiting this pathogen.

Then, the ability of the coating to prevent cross-contamination between a surface contaminated with food and a non-contaminated food was investigated. In this case, when the *Salmonella* pathogen was incorporated into a matrix and placed on top of a certain surface, it was not inhibited and was able to contaminate the food that was in contact with the contaminated surface. This cross-contamination occurred regardless of the food contact time (10 seconds or 2 hours) and the surface material tested. It was thus found that the coating was not effective in eliminating *Salmonella* when it is incorporated into a food matrix.

With this work, it was verified that the coating has a good antimicrobial activity according to ISO 22196:2011. However, when the bacteria are added to a food matrix, the use of the coating does not reduce the transfer of bacteria from the surfaces to the food, showing that the food matrix protects the bacteria from the action of the coating.

Keywords: *Salmonella*, *Campylobacter*, Antibacterial Coating, Surface, Cross-contamination.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Paula Teixeira e Doutora Joana Barbosa, pela orientação, motivação e ajuda na realização deste projeto. Também, por me terem aceite como aluna, por me terem integrado na equipa e a disponibilidade demonstrada.

A todos os meus colegas de laboratório, pelo apoio nas dificuldades, a boa disposição e a excelente integração.

À minha família, pais e irmão, por me incentivarem desde o início na realização desta etapa, demonstrando grande apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu namorado, Artur Cunha, pelo apoio incondicional, nos bons e maus momentos, e pela companhia nas longas horas de estudo.

A todos um muito Obrigado!

Índice

Resumo	iii
Abstract	iv
Agradecimentos	v
Abreviaturas	viii
1. Introdução	1
1.1 Contaminação cruzada	2
1.1.1. <i>Campylobacter</i> spp.....	3
1.1.2. <i>Salmonella</i> spp.	4
1.2. Desinfecção de superfícies	6
1.2. Revestimentos antimicrobianos	7
2. Objetivos	10
3. Materiais e métodos	11
3.1. Revestimento comercial	11
3.2. Avaliação da eficácia antimicrobiana do revestimento comercial através da norma ISO 22196:2011.....	11
3.2.1. Preparação do inóculo	11
3.2.2. Preparação das superfícies	12
3.2.3. Eficácia antimicrobiana do revestimento através da norma ISO 22196:2011 ...	12
3.3. Avaliação da eficácia antimicrobiana de um revestimento comercial na presença de matrizes alimentares	13
3.3.1. Preparação do inóculo	13
3.3.2. Preparação da matriz alimentar	13
3.3.3. Preparação das superfícies	13
3.3.4. Avaliação da contaminação cruzada	14
3.4. Análise estatística.....	15
4. Resultados e Discussão	16

4.1. Avaliação da eficácia antimicrobiana de um revestimento comercial	16
4.2. Contaminação cruzada	18
5. Conclusão	24
6. Trabalho futuro	25
Bibliografia	26

Abreviaturas

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BPW – *Buffered Peptone Water*

CQA – Compostos Quaternários de Amónio

ECDC – *European Center for Disease Prevention and Control*

HACCP – Hazard Analysis of Critical Control Point

ISO – *International Organization for Standardization*

JIS – *Japanese Industrial Standards*

NB – *Neutralizing Broth*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCA – *Plate Count Agar*

TSA – *Tryptic Soy Agar*

TSBYE – *Tryptic Soy Broth with Yeast Extract*

UE – União Europeia

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

XLD – *Xylose Lysine Deoxycholate*

1. Introdução

Ao redor do mundo existem muitos milhões de pessoas a ficar doentes e outros milhares a morrer devido ao consumo de comida não segura, por motivos químicos, biológicos, ambientais ou de higiene pessoal (Fung *et al.*, 2018). Os consumidores querem alimentos com qualidade e segurança e, para isso, confiam nos governos para assegurar que todos os produtos que compram são seguros para consumo. Devido a isso, surgiram sistemas de gestão da segurança alimentar, como o sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), o *British Retail Consortium* (BRC), o *International Featured Standards* (IFS), entre outros. Todos estes sistemas têm elementos em comum: programa de pré-requisitos (PPR); análise de perigos (são importantes para identificar, controlar e diminuir os riscos de segurança alimentar na indústria alimentar); regulamentos legais; e gestão de riscos (importante para antecipar e responder às várias ameaças associadas aos alimentos) (Djekic *et al.*, 2021).

A segurança alimentar está sempre em constante mudança, pois tem de acompanhar os desenvolvimentos tecnológicos, as novas políticas, os novos padrões e os novos regulamentos que são continuamente alterados para proteger a saúde e bem-estar da população (Fung *et al.*, 2018). Devido a todas estas alterações, que adicionam complexidade aos sistemas, os consumidores acabam por ficar mal informados sobre este assunto (Fung *et al.*, 2018; King *et al.*, 2017). No entanto, a segurança alimentar também enfrenta desafios, como as alterações climáticas, o aparecimento de novos patogénicos, o aumento da resistência dos microrganismos a medicamentos, o aumento de consumidores de risco (imunodeprimidos e idosos) e a alteração de preferências dos consumidores (que atualmente preferem produtos frescos e pouco processados), o que faz com que tenha de ser uma preocupação global para que possa estar sempre a par destas constantes mudanças (King *et al.*, 2017). E essa preocupação global em torno deste tema está presente, uma vez que a contaminação alimentar é uma constante preocupação pública.

Existem três tipos de contaminação: a microbiológica, a física e a química. No entanto, a que está na origem de mais problemas é a contaminação microbiológica, devido aos organismos patogénicos, ou seja, causadores de doença (Rocha, 2016). Todos os anos são reportados milhares de surtos de doenças causadas por água ou alimentos contaminados (Iulietto & Evers, 2020a; EFSA, 2021). A cozinha tem um papel importante na transferência dos agentes causadores de doença alimentar (Kusumaningrum, 2003), uma vez que grande parte dos consumidores usam superfícies e equipamentos contaminados na preparação dos alimentos,

pois não têm como saber se as suas superfícies estão contaminadas com patogénicos (Kusumaningrum, 2003; Møretro *et al.*, 2020). Na Europa, estima-se que, em 2019, 40,5% dos surtos ocorreram em ambiente doméstico (Iulietto & Evers, 2020). *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* são microrganismos que comumente se encontram nessas superfícies, pois são transmitidos por alimentos, principalmente de origem animal. O contacto dos alimentos com estas superfícies é uma frequente forma de contaminação cruzada (Yemmireddy & Hung, 2017).

1.1 Contaminação cruzada

Segundo Pérez-Rodríguez *et al.* (2008), a contaminação cruzada pode ser definida como um termo geral que se refere à transferência, direta ou indireta, de bactérias e vírus de um produto contaminado para um produto não contaminado.

A segurança alimentar é assegurada pela partilha da responsabilidade de todos os envolvidos na produção, desde o produtor ao consumidor. Ao longo da cadeia alimentar vários processos e boas práticas são implementados, de forma a assegurar que os alimentos que chegam ao consumidor são seguros para consumo (EUFIC, 2006). No entanto, após entrarem no ambiente doméstico, não há forma de estimar o risco no manuseamento dos alimentos (Iulietto & Evers, 2020). Existem evidências de que 40,5% dos surtos alimentares ocorrem em ambientes domésticos e que 15,6% desses surtos se dão devido a alimentos que foram contaminados dentro de casa, sendo, por isso, a contaminação cruzada identificada como uma das principais causas dos surtos (Iulietto & Evers, 2020).

As cozinhas são ambientes que contêm um grande número de bactérias, mas na maioria dos casos são inofensivas. No entanto, também têm sido encontrados patogénicos como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. É nas superfícies que entram em contacto com os alimentos (bancas, utensílios, pratos, tábuas de corte, facas, recipientes de armazenamento de alimentos, etc) que se verifica a presença de microrganismos (Azelmad *et al.*, 2017; DeFlorio *et al.*, 2021; Fink *et al.*, 2017). Estas superfícies são contaminadas por alimentos que já estão contaminados e pela água que entra em contacto com eles (DeFlorio *et al.*, 2021).

As superfícies de contacto com os alimentos são consideradas uma preocupação no que diz respeito à propagação de patogénicos alimentares, uma vez que a contaminação cruzada através destas superfícies é um fator de risco, porque leva à contaminação de alimentos durante a sua preparação, sendo assim identificada como uma das principais causas de infeções alimentares (Azelmad *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2020; Fink *et al.*, 2017).

A ocorrência de contaminação cruzada ainda é muito recorrente, porque quando as células aderem às superfícies presentes nas cozinhas não são facilmente removidas pelos produtos de limpeza comuns, tornando-se assim num foco de contaminação (Fink *et al.*, 2017).

Esta dificuldade em eliminar os patogênicos das superfícies, juntamente com a falta de conhecimento, por parte dos consumidores, das técnicas corretas de manuseamento dos alimentos, de forma a prevenir contaminação, eleva ainda mais o risco de ocorrência de contaminação cruzada. Se os consumidores alterassem a forma como preparam, cozinham e armazenam os alimentos, o número de intoxicações alimentares poderia diminuir de 40 a 60% (de Jong *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2017).

Todos os anos são reportados números elevados de doença e morte provocadas por intoxicações alimentares. No entanto, o número real deste problema não é conhecido porque a maioria dos casos não é relatado, ou porque não procuram assistência médica ou, quando procuram, são mal diagnosticados (WHO, 2017).

Segundo a EFSA (2021) as doenças alimentares com mais casos reportados na Europa são a campilobacteriose e a salmonelose, e estão associadas ao consumo de alimentos contaminados com as bactérias *Campylobacter* e *Salmonella*, respetivamente (ECDC, n.d.)

1.1.1. *Campylobacter* spp

Campylobacter é uma bactéria Gram-negativa, que pode apresentar forma de espiral ou de bastonete curvo, ter um ou dois flagelos polares, são não formadoras de esporos e obtêm a sua energia através de aminoácidos ou intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (Kaakoush *et al.*, 2015; Snelling *et al.*, 2005). A maioria das espécies de *Campylobacter* cresce em condições microaerofílicas e têm um metabolismo respiratório, mas existem também espécies que preferem condições anaeróbicas de crescimento (Kaakoush *et al.*, 2015).

Atualmente são conhecidas vinte e seis espécies e nove subespécies de *Campylobacter* (Kaakoush *et al.*, 2015). *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lardis* e *Campylobacter upsaliensis* são as espécies que mais estão associadas com as doenças gastrointestinais humanas (Snelling *et al.*, 2005). *Campylobacter coli* e *C. jejuni* são as espécies responsáveis pela maioria dos casos de doença reportados (Iovine, 2013; Smith & Fratamico, 2010; Snelling *et al.*, 2005).

Segundo o ECDC (n.d.) a campilobacteriose é uma doença diarreica causada por bactérias do género *Campylobacter*. A comunicação de surtos de campilobacteriose em humanos é obrigatória de acordo com a diretiva 2003/99/EC. A infeção tem um período de incubação de um a cinco dias, e os seus sintomas incluem diarreia, dor abdominal, febre, dores de cabeça,

náusea e vômitos. Na maior parte dos casos a doença é autolimitada, mas pode perdurar por vários dias. No entanto, existem casos onde podem ocorrer complicações como a artrite reativa (1 a 5% dos infetados) ou a síndrome de Guillain-Barré. Os idosos, crianças e imunodeprimidos são grupos de risco da campilobacteriose (Guyard-Nicodème *et al.*, 2013; Smith & Fratamico, 2010; Wieczorek & Osek, 2013).

A campilobacteriose é uma doença zoonótica, uma vez que a principal causa de transmissão para os humanos é o consumo de alimentos de origem animal crus ou malcozinhados, especialmente carne de aves, uma vez que a carne fica contaminada durante o processo de abate e a bactéria sobrevive nas fendas das carcaças dos animais devido ao pouco oxigénio existente (Iovine, 2013). Também existe transmissão através do consumo de água contaminada ou de humano para humano, apesar destas últimas fontes de contaminação serem raras (Iovine, 2013; Kaakoush *et al.*, 2015; Wieczorek & Osek, 2013). Uma das possíveis causas de transmissão é, também, o consumo de alimentos (cozinhados ou de origem vegetal) que estiveram em contacto com superfícies, utensílios e mãos contaminadas com *Campylobacter* (Cardoso *et al.*, 2020; Guyard-Nicodème *et al.*, 2013).

Desde 2005 que a campilobacteriose é a infeção gastrointestinal mais reportada nos países desenvolvidos (Iovine, 2013; EFSA, 2021; Wieczorek & Osek, 2013). Em 2019, foram confirmados mais de 220 mil casos de campilobacteriose na União Europeia (UE), com Portugal a reportar 942 casos (EFSA, 2021).

1.1.2. *Salmonella* spp.

Salmonella é uma bactéria em forma de bastonete, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. Dentro do género *Salmonella* foram identificados cerca de 2600 serótipos e a maioria deles tem a capacidade de se adaptarem a uma grande variedade de hospedeiros animais, incluindo humanos (Eng *et al.*, 2015).

O género *Salmonella* inclui duas espécies *Salmonella enterica* (espécie-tipo) e *Salmonella bongori*, divisão que se baseia na diferença no 16 rRNA (Eng *et al.*, 2015). A espécie *S. bongori* afeta principalmente animais de sangue-frio, no entanto, já foram reportados casos em humanos. A espécie *S. enterica* divide-se em 6 subespécies, sendo a entérica (subsp. I) a que se encontra nos humanos e animais de sangue quente e a principal responsável pelos casos de salmonelose reportados (Ryan *et al.*, 2017).

A salmonelose é reconhecida como uma das principais infeções transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados com *Salmonella*, de acordo com a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Geralmente, a salmonelose é transmitida quando células de

Salmonella são introduzidas nas áreas de preparação de alimentos. Vários fatores como a multiplicação em alimentos devido à temperatura inadequada de armazenamento, tempo insuficiente de cozedura e contaminação cruzada estão implicados nos surtos de salmonelose (Carrasco *et al.*, 2012; Fearnley *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012).

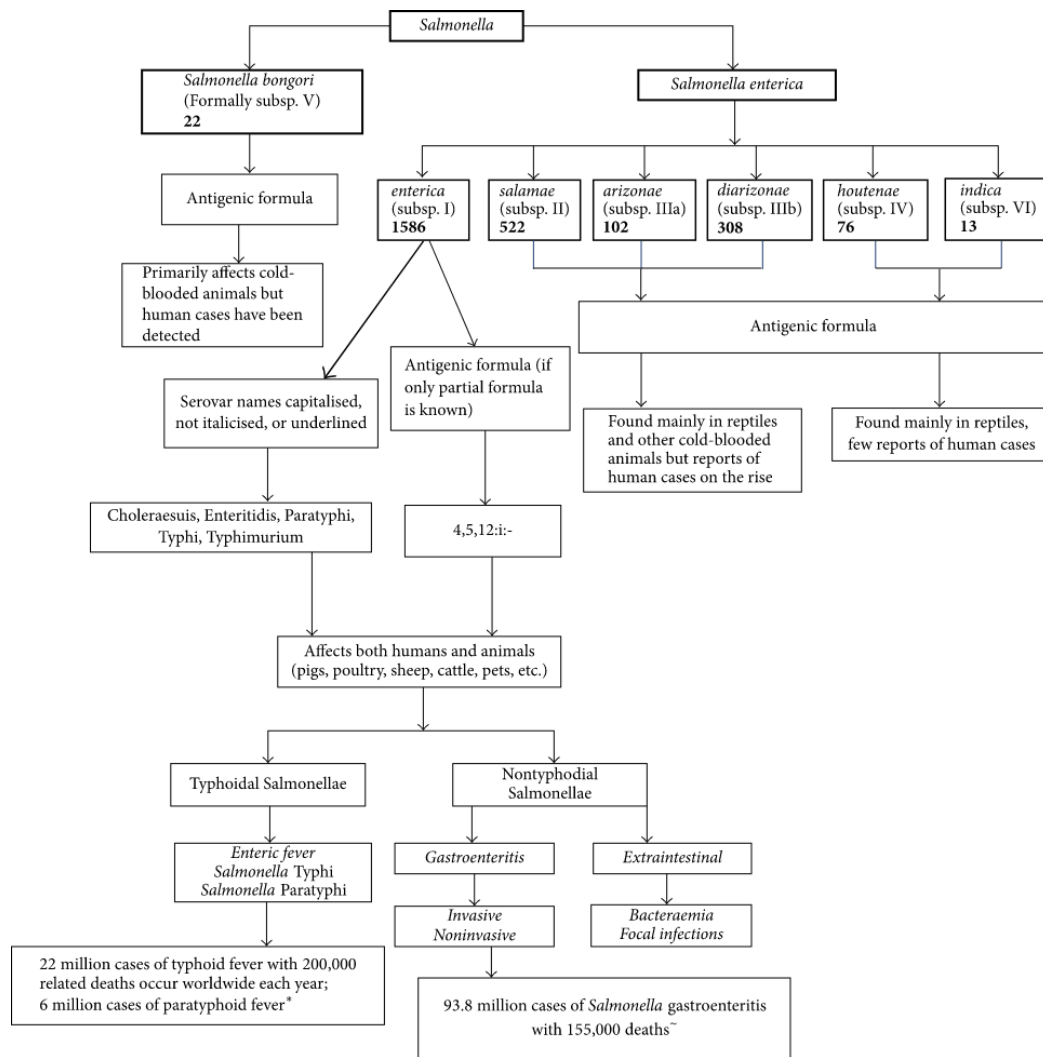


Figura 1- Análise da nomenclatura do género *Salmonella* (retirado de Ryan *et al.*, 2017)

Salmonella Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são as principais responsáveis pelos casos de salmonelose reportados na EU (Eng *et al.*, 2015; EFSA, 2021). Os alimentos que mais evidências apresentam de serem veículos para a contaminação por salmonelose são produtos de origem animal (ovos, carne de porco e derivados) e produtos de pastelaria em que a contaminação destes alimentos ocorre principalmente através de contacto com matéria fecal (Carrasco *et al.*, 2012; EFSA, 2021). A infeção provocada por estas bactérias tem um período

de incubação de 4 a 72 horas e pode manifestar-se como gastroenterite, febre tifóide e bacteriemia. A salmonelose não tifoide apresenta uma baixa taxa de mortalidade, mas pode causar complicações em crianças, idosos e imunodeprimidos (Antunes *et al.*, 2016; Eng *et al.*, 2015; EFSA, 2021).

Segundo a diretiva 2003/99/EC, a comunicação de surtos de salmonelose em humanos é obrigatória. Em 2019, foram reportados mais de 85 mil casos de salmonelose e 926 surtos na EU (EFSA, 2021). Os surtos ocorridos resultaram em 1,915 hospitalizações, que equivale a 50,5% das hospitalizações por intoxicações alimentares. Os alimentos que mais evidências apresentam de serem veículos para a contaminação por salmonelose são produtos de origem animal (ovos, carne de porco e derivados) e produtos de pastelaria em que a contaminação destes alimentos ocorre principalmente através de contacto com matéria fecal (Carrasco *et al.*, 2012; EFSA, 2021).

1.2. Desinfecção de superfícies

Na indústria alimentar são utilizados procedimentos físicos e químicos (pressão de água, irradiação, detergentes alcalinos, compostos à base de cloro, entre outros) na limpeza e desinfecção das superfícies, aplicando-se sistemas de controlo de qualidade e programas de HACCP. Contudo, estes tratamentos não são suficientes para prevenir novas contaminações se os manuseadores de alimentos e os consumidores não estiverem devidamente informados (Rocha, 2016; Yemmireddy & Hung, 2017a). Porém, nas cozinhas domésticas, existe uma maior probabilidade de contaminação, pois ao contrário do ambiente controlado de indústria alimentar, aqui os microrganismos patogénicos têm imensas portas de entrada como alimentos, o ar, insetos ou animais de estimação. Com esta maior probabilidade de contaminação, as superfícies teriam de ser constantemente limpas para evitar novas contaminações (Kusumaningrum, 2003).

Para impedir os constantes contágios, a nanotecnologia foi desenvolvendo produtos que podem ser aplicados ao longo de toda a cadeia alimentar, como nas embalagens, no transporte, no armazenamento, nos utensílios e nas superfícies de contacto com os alimentos (Sharma *et al.*, 2021). O estudo dos mecanismos antimicrobianos tem sido muito mais focado na embalagem, pois estas acompanham os produtos desde a sua origem até ao consumidor. A aplicação destes mecanismos nas embalagens pode ocorrer de diferentes formas: incorporação nos materiais das embalagens; contacto direto; e adição durante o processamento dos alimentos (Kim *et al.*, 2020) No entanto, tem aumentado o interesse pelas técnicas de libertação lenta, que são favoráveis pois comprometem menos as propriedades químicas e físicas dos materiais das

embalagens, fazendo com que seja mais fácil cumprir os requisitos de segurança alimentar (Khaneghah *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). Outro tema que tem sido bastante estudado são os revestimentos das superfícies que entram em contacto com os alimentos, uma vez que nestas se podem aderir e multiplicar patogénicos levando a doenças, contaminações ou outros danos (Fink *et al.*, 2017; Poverenov & Klein, 2018).

Alguns dos agentes antimicrobianos utilizados neste tipo de situações são: óleos essenciais; quitosana; compostos halogenados; compostos quaternários de amónio; metais; e óxidos de metais (Kim *et al.*, 2020).

Um agente muito utilizado é a quitosana, por ser um polissacárido natural que apresenta ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (Khaneghah *et al.*, 2018; Priyadarshi & Rhim, 2020). Os compostos quaternários de amónio também têm sido utilizados, pois têm ação contra várias bactérias, incluindo as resistentes a vários antibióticos e por serem compostos sólidos de fácil diluição que os faz ter uma atividade prolongada (Lee & Pascall, 2020; Poverenov & Klein, 2018). Já os óleos essenciais são amplamente estudados na inibição de microrganismos, já que têm uma importante característica, a hidrofobia, que lhes permite interagir com os lípidos da membrana celular e mitocôndria, tornando as estruturas menos organizadas e mais permeáveis (Khaneghah *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2021).

No entanto, nos últimos anos, a resistência dos microrganismos aos desinfetantes/antibióticos tem vindo a aumentar, devido ao aumento do uso destes agentes antimicrobianos (Khaneghah *et al.*, 2018; Poverenov & Klein, 2018). Este aumento da resistência, contribui para a necessidade de se combinar vários métodos, uma vez que o uso de apenas um poderoso agente antimicrobiano já não é suficiente (Khaneghah *et al.*, 2018). Devido a isso, tem aumentado a procura por novos tratamentos que controlem o crescimento microbiano, sem libertarem grandes quantidades de agentes microbianos para o ambiente (Khaneghah *et al.*, 2018; Poverenov & Klein, 2018).

1.2. Revestimentos antimicrobianos

Os produtos de limpeza domésticos têm vindo a incorporar, na sua composição, agentes antimicrobianos (hipocloritos, dióxido de cloro, ácido peracético e aldeídos derivados de glutamina) ao longo de várias décadas e têm ganho a confiança dos consumidores, uma vez que têm uma grande capacidade de inativar microrganismos através de oxidação química (Lee & Pascall, 2020; Tiwari, 2018). No entanto, estes produtos de limpeza são apenas temporários e não têm uma ação duradora, havendo contaminação microbiana das superfícies pouco tempo

depois da sua aplicação (Tiwari, 2018). Uma das formas de obter uma proteção mais duradora é através de revestimentos de superfície antimicrobianos. Sun *et al.* (2019), estudou a atividade antimicrobiana de um revestimento que continha compostos quaternários de amônio e nanopartículas de sílica, através de um procedimento semelhante ao da norma ISO 22196:2011, para as bactérias *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que o revestimento teve uma eficácia de 99%, mas tal só foi possível devido à junção dos dois agentes antimicrobianos, uma vez que as nanopartículas de sílica migravam para o topo do revestimento e melhorava a atividade antimicrobiana, tendo uma duração até 24h (Sun *et al.*, 2019). Já Yemmireddy & Hung (2017b), verificaram o efeito de um revestimento antimicrobiano à base de dióxido de titânio em tábuas de corte contra *E. coli*. Os autores observaram que este tipo de revestimento altera a hidrofobicidade das superfícies tornando-as super-hidrofóbicas, o que resulta numa menor aderência bacteriana. Yemmireddy & Hung (2017b) também observaram que outras propriedades das superfícies alteram a aderência de bactérias, como a rugosidade. Existem diferentes tipos de revestimento com diversas formas de atuação antimicrobiana. Uma das formas de atuação é através da alteração das superfícies, ou seja, superfícies lisas apresentam menor probabilidade de contaminação do que superfícies rugosas (Poverenov & Klein, 2018). As propriedades químicas dos materiais das superfícies também influenciam a capacidade antimicrobiana; por exemplo, superfícies hidrofílicas/hidrofóbicas têm menor probabilidade de permanecer contaminadas (Azelmad *et al.*, 2017; Cloutier *et al.*, 2015; Fink *et al.*, 2017). A hidrofobicidade de uma superfície é a sua afinidade/repulsão em relação à água. Sabe-se que o processo de adesão é facilitado pela hidrofobicidade das superfícies que interagem (Teixeira *et al.*, 2015). Superfícies hidrofílicas ou hidrofóbicas têm uma maior adsorção de bactérias, o que torna mais difícil a sua adesão e crescimento (Yuan *et al.*, 2017). Existem também revestimentos repelentes de proteínas/microrganismos, que utilizam uma camada de polímeros em grande densidade, a que se costuma chamar de “escova”. A maioria dos polímeros utilizados nessas “escovas” são hidrofílicos, assim a água será atraída pelos polímeros e irá formar uma camada repelente junto a superfície (Cloutier *et al.*, 2015; Knetsch & Koole, 2011; Salwiczek *et al.*, 2014). Outra forma de atuação dos revestimentos é através da incorporação/libertação de antibióticos, onde são aplicados nas superfícies revestimentos biodegradáveis que contêm antibióticos, que se vão degradando lentamente causando a libertação dos mesmos (Cloutier *et al.*, 2015; Knetsch & Koole, 2011; Salwiczek *et al.*, 2014).

Neste estudo, foi avaliado um revestimento que tinha como princípio ativo compostos quaternários de amônio (CQA). Estes compostos têm uma grande atividade antimicrobiana e demonstram eficácia contra várias bactérias, incluindo espécies com resistência a antibióticos

(Li *et al.*, 2020; Poverenov & Klein, 2018). A eficácia dos CQA está relacionada com as interações electrostáticas dos compostos com a membrana celular das bactérias, ou seja, a interação entre os CQA, positivamente carregados, e os grupos principais do ácido fosfolípido da membrana celular das bactérias, negativamente carregados (Knetsch & Koole, 2011; Li *et al.*, 2020; Poverenov & Klein, 2018). A eficiência dos CQA pode ser melhorada quando estes são aplicados em superfícies hidrofílicas, uma vez que os compostos também são hidrofílicos, a adesão dos CQA à superfície aumenta, criando um efeito antibacteriano e anti-incrustante. Esta maior aderência contribui também para minimizar os efeitos ambientais e a resistência bacteriana a este composto (Li *et al.*, 2020; Poverenov & Klein, 2018). O uso dos CQA é popular, pois é de fácil fabricação, de baixo custo de produção, modifica grandes áreas de superfície e tem um amplo espectro bactericida (Knetsch & Koole, 2011; Li *et al.*, 2020).

Devido às suas vastas aplicações e versatilidade, o estudo de revestimentos antimicrobianos tem vindo a aumentar, para encontrar alternativas ao uso dos antimicrobianos tradicionais de pouca duração e que não danifiquem as propriedades das superfícies (Cloutier *et al.*, 2015; Knetsch & Koole, 2011; Lee & Pascall, 2020; Li *et al.*, 2020; Poverenov & Klein, 2018; Tiwari, 2018).

2. Objetivos

A contaminação cruzada de alimentos através de superfícies nas cozinhas leva ao aparecimento de muitos casos de toxinfecções alimentares (Lee & Pascall, 2020). Com a percepção de que as técnicas tradicionais de limpeza das superfícies não eliminam os patogénicos na totalidade, surgiu o tema para este trabalho. O estudo baseou-se em verificar se um revestimento comercial tinha atividade antimicrobiana eficaz na eliminação de patogénicos (em específico, *Salmonella* e *Campylobacter*), mesmo se estes estivessem incorporados numa matriz alimentar, e se prevenia a contaminação cruzada entre alimentos, em diversas superfícies, que se encontram comumente nas cozinhas.

3. Materiais e métodos

3.1. Revestimento comercial

O revestimento comercial usado neste estudo foi gentilmente cedido por uma empresa portuguesa (não identificada por motivos de confidencialidade) com uma formulação à base de composto quaternários de amónio.

3.2. Avaliação da eficácia antimicrobiana do revestimento comercial através da norma ISO 22196:2011

3.2.1. Preparação do inóculo

Nesta parte do estudo foram utilizadas duas bactérias: *Salmonella* e *Campylobacter*.

Para a preparação do inóculo de *Salmonella* foram utilizadas várias estirpes, *Salmonella* Enteritidis ESB37, *Salmonella* Infantis ESB46, *Salmonella* Seftenberg ESB45, *Salmonella* Typhimurium ESB36 e *S. Typhimurium* ESB47. Para cada experiência, cada estirpe foi retirada do stock congelado a -20°C e colocada a crescer em *Tryptic Soy Agar* com 6g/L de *Yeast Extract* (TSA YE, Biokar Diagnostics, França) a 37 °C durante 24h. Para a preparação de cada inóculo, uma colónia isolada foi ressuspensa em *Tryptic Soy Broth* com 6g/L de *Yeast Extract* (TSBYE, Biokar Diagnostics) e após incubação, 0,1% (V/V) dessa suspensão foi colocada em novo meio TSBYE e incubado às mesmas condições. As células foram recuperadas por centrifugação (15000 rpm, 5 min, MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), após uma lavagem em solução de Ringer. Foi preparado um cocktail de *Salmonella* adicionando 1 mL de cada estirpe e efetuando diluições até ser obtida a concentração pretendida para as experiências de 10⁵ Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/mL.

Para a preparação do inóculo de *Campylobacter* foram utilizadas duas estirpes, *C. jejuni* e *C. coli*. Para cada experiência, cada estirpe foi retirada do stock congelado a -20°C e colocada a crescer em TSA com 2% (V/V) de sangue cavalo (E&O Laboratories Limited, Escócia) a 42 °C por 48h em microaerofilia. Para a preparação de cada inóculo, uma colónia isolada foi ressuspensa em TSB com 2% (V/V) de sangue de cavalo, 0,1% (V/V) dessa suspensão foi colocada em novo meio e incubado às mesmas condições. Foi preparado um cocktail de *Campylobacter* adicionando 1 mL de cada estirpe e efetuando diluições até ser obtida a concentração pretendida para as experiências de 10⁵ UFC/mL.

3.2.2. Preparação das superfícies

Foram testados quatro tipos de superfícies: inox e silicone (de tamanho 6,0 cm x 2,5 cm), acrílico e mármore (de tamanho 5,0 cm x 5,0 cm). Antes de cada experiência, as superfícies eram desinfetadas numa solução de lixívia (40% V/V) durante 24h, submersas em água estéril durante mais 5 minutos e colocadas numa placa de Petri para secar numa estufa a 50 °C até um máximo de 24 h. Após a desinfecção, 9 superfícies eram utilizadas para cada réplica: 3 para o controlo T0 (superfície não tratada e contagem imediatamente após colocar o inóculo), 3 para o controlo T24 (superfície não tratada e contagem 24 h após colocar o inóculo) e 3 tratadas com o revestimento (superfície tratada e contagem 24 h após colocar o inóculo. Nas placas tratadas, após a aplicação do revestimento eram colocadas numa estufa a 37 °C por 30 min, até secarem, e só depois era aplicado o inóculo.

3.2.3. Eficácia antimicrobiana do revestimento através da norma ISO 22196:2011

Para estudar a eficácia do revestimento, o procedimento utilizado foi baseado na norma ISO 22196 (2011). O volume de inóculo adicionado em cada superfície foi proporcional à dimensão da superfície (400 µL para 6,0 cm x 2,5 cm ou 200 µL para 5,0 cm x 5,0 cm). Após ser colocado, o inóculo era coberto com um filme feito a partir de um saco *Stomacher*® estéril, de tamanho proporcional à dimensão da superfície (4 cm x 4 cm e 5 cm x 1,5 cm) e as superfícies colocadas a 22 °C por 24 h para *Salmonella* e 42 °C por 48 h para *Campylobacter* e humidade relativa >90%. Para recuperar as bactérias da superfície eram adicionados 10 mL de *Dey-Engley Neutralizing Broth* (NB, BD Difco, Sparks, EUA) à superfície e a mesma lavada nesse volume. As diluições necessárias foram realizadas no mesmo diluente. Cada amostra e respetivas diluições eram colocadas no meio da cultura *Plate Count Agar* (PCA, Biokar Diagnostics) e incubadas a 35 °C por 48 h ou no meio *Tryptic Soy Agar* (TSA, Biokar Diagnostics) e incubado a 42 °C por 48 h em microaerofilia para *Salmonella* e *Campylobacter*, respetivamente. Após a incubação eram contadas as colónias para se proceder à determinação das UFC/cm². Três réplicas independentes foram realizadas.

3.3. Avaliação da eficácia antimicrobiana de um revestimento comercial na presença de matrizes alimentares

3.3.1. Preparação do inóculo

Neste estudo foram utilizadas várias estirpes de *S. Enteritidis* ESB37, *S. Infantis* ESB46, *S. Seftenberg* ESB45, *S. Typhimurium* ESB36 e *S. Typhimurium* ESB47. Para a preparação do inóculo foi utilizado o método referido na secção 3.2.1, sendo apenas alterado o nível final do inóculo para 10^9 UFC/mL.

3.3.2. Preparação da matriz alimentar

Nesta parte do estudo foram utilizadas três matrizes alimentares diferentes, gema de ovo, frango cozido e frango cru.

- Gema de ovo

Para a preparação desta matriz foram utilizados 7,2 mL de *egg yolk* (Biokar Diagnostics) e adicionado 0,8 mL de inóculo a um nível de 10^9 UFC/mL, para obter uma matriz contaminada com um nível final de 10^7 UFC/mL.

- Frango cozido

Bifes de frango frescos, adquiridos numa superfície comercial, foram cortados em pedaços (1,5 cm x 1,5 cm) e colocados em água a ferver por 5 min, de forma que, após a cozedura, o tamanho de cada pedaço passava a ser de 1 cm x 1 cm e com, aproximadamente, 1g. Foram colocados 2 cubos de frango (2g) em 18 mL de água estéril e homogeneizado no *Stomacher*® por 40 segundos. Para a obtenção de uma matriz com um nível final de 10^7 UFC/ml foram combinados 7,2 mL da pasta de frango e 0,8 mL de inóculo a 10^9 UFC/mL.

- Frango cru

A partir de bifes de frango, adquiridos numa superfície comercial, foram cortados cubos de 1 cm x 1 cm, com aproximadamente 1 g. Colocaram-se num saco de *Stomacher*® 24 cubos de frango cru e adicionaram-se 200 µL de inóculo (a um nível de 10^8 UFC/mL), deixando-se a repousar por 24 h a 5 °C.

3.3.3. Preparação das superfícies

Foram testados dois tipos de superfícies: inox (de tamanho 6,0 cm x 2,5 cm) e mármore (de tamanho 5,0 cm x 5,0 cm). Antes de cada experiência, as superfícies eram desinfetadas

conforme descrito anteriormente na secção 3.2.2. Após a sua desinfeção, 12 superfícies eram utilizadas: 3 não tratadas para cada tempo de contacto, 10 segundos e 2 h; 3 tratadas para cada tempo de contacto, 10 segundos e 2 h. As placas tratadas, após a aplicação do revestimento eram colocadas numa estufa a 37 °C por 30 min, até secarem.

3.3.4. Avaliação da contaminação cruzada

Esta experiência foi utilizada para verificar se ocorria transmissão de microrganismos para um alimento após contacto com uma superfície contaminada, mas revestida com um composto antimicrobiano. O procedimento foi semelhante ao descrito na secção 3.2.3, sendo diferentes as matrizes artificialmente contaminadas (líquida e sólida) e o alimento não contaminado (frango cozido e tomate). Também foram usados dois tempos de contacto para avaliar a sua influência (10 segundos e 2 horas).

- Matriz líquida

Para avaliar a inibição de contaminação cruzada das superfícies revestidas, foram colocados 200 µL de gema de ovo ou solução de frango cozido, previamente contaminadas, e após 10 segundos ou 2 horas, foi colocado sobre a superfície um pedaço de frango cozinhado (1 cm x 1 cm, ≈ 1g), por 10 segundos. Após esse tempo de contacto, a contaminação do alimento foi analisada conforme descrito abaixo.

- Matriz sólida

Como matriz sólida foi colocado um cubo de frango cru, previamente contaminado, que ficava em contacto com a superfície por 10 segundos ou 2 horas. Ao fim do tempo de contacto, foi colocado imediatamente um cubo de tomate (1 cm x 1 cm) durante 10 segundos e analisado conforme descrito abaixo.

Para determinar a contaminação cruzada ocorrida, o alimento (frango cozido ou tomate) foi colocado em 9 mL de *Buffered Peptone Water* (BPW, Biokar Diagnostics) e homogeneizado por 40 segundos num *Stomacher*®. As diluições foram efetuadas em Ringer e plaqueadas em *Rapid Salmonella* (Bio-Rad, USA) com a ajuda do aparelho *Spiral plater* (InterScience). Depois de retirado o alimento, as superfícies também foram avaliadas; com o auxílio uma zaragatoa o que ficou da matriz foi retirada da superfície e colocada em 1 mL de NB. As diluições foram efetuadas e plaqueadas conforme descrito anteriormente e incubadas a 37 °C por 48h. Após a incubação, as colónias foram contadas de forma a determinar as UFC/mL.

Como controlo das condições acima descritas, foram colocados 200 μ L de inóculo sem matriz e após 10 segundos ou 2 horas foi colocado sobre a superfície um pedaço de frango cozinhado (1 cm x 1 cm, \approx 1g), por 10 segundos. Após esse tempo de contacto, as contaminações do alimento e da superfície foram analisadas conforme descrito anteriormente. Três réplicas independentes foram realizadas.

Um esquema resumo desta experiência está apresentado na Figura 3.3.4.1.

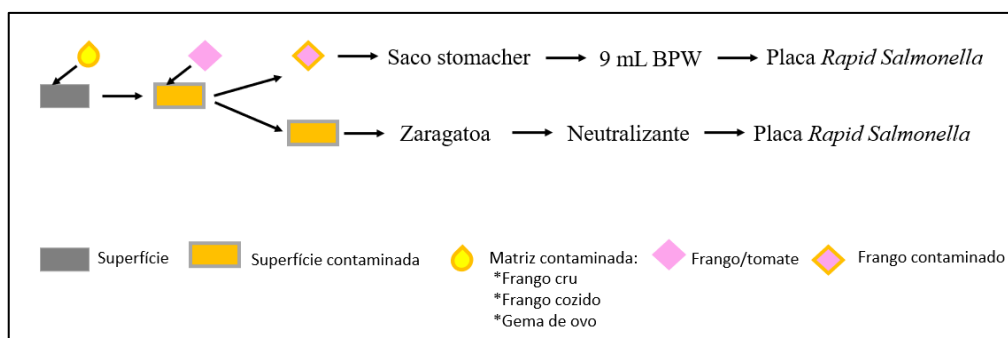


Figura 3.3.4.1 – Esquema dos procedimentos realizados para a avaliação da contaminação cruzada do frango/tomate após contacto com uma superfície contaminada

3.4. Análise estatística

Foi realizada uma análise de variância para testar as diferenças entre a viabilidade microbiana na presença do revestimento nas diferentes superfícies, bem como na presença do revestimento na prevenção de contaminação cruzada nas diferentes superfícies e nos diferentes tempos de contacto. As comparações múltiplas foram avaliadas pelo teste *post-hoc* de Tukey e todas as análises foram realizadas usando IBM SPSS Statistics, 27 (IBM Corporation, EUA). A diferença média foi considerada significativa ao nível de 0,05.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da eficácia antimicrobiana de um revestimento comercial

A atividade antimicrobiana do revestimento à base de compostos quaternários de amónio foi avaliada para as bactérias Gram-negativas *Campylobacter* e *Salmonella*, após 24 h de incubação a 22 °C e em diferentes superfícies através da ISO 22196 (2011). No entanto, esta norma não define valores da eficácia da atividade antimicrobiana, por isso, foi utilizado o critério da norma japonesa, *Japanese Industrial Standards (JIS) Z 2801* (redução $\geq 2 \log \text{UFC/cm}^2$), idêntica à ISO 22196 (JIS, 2000; Torlak & Sert, 2013; Yagci *et al.*, 2011).

No presente estudo, não foi possível determinar a eficácia do revestimento para *Campylobacter*, uma vez que a bactéria não sobreviveu nas superfícies controlo, ou seja, sem revestimento e após 24h de incubação. As condições de crescimento utilizadas foram as indicadas para o crescimento de culturas de *Campylobacter*: meio de cultura nutritivo (TSA com 2% (V/V) de sangue cavalo), temperatura entre os 37 °C e os 42 °C, durante 48 h e baixos níveis de oxigénio (Hsieh *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2015; Reeser *et al.*, 2007). Uma das justificações possíveis poderá ser o facto de as superfícies poderem absorver o calor da estufa e tornarem-se demasiado quentes, criando um ambiente hostil à sobrevivência da bactéria. Para além de todas as variáveis já referidas, a própria bactéria em estudo é difícil de trabalhar, pois é capaz de entrar em estado de viabilidade, mas não culturabilidade não sendo recuperada pelos métodos de cultivo convencionais. Este mecanismo ainda não é claro, o que alerta para a necessidade de continuar a estudar as condições de cultivo deste patogénico (Hsieh *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos para *Salmonella* spp. em cada uma das superfícies testadas, estão apresentados na Figura 4.1.

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as diferentes superfícies no T₀. O inox e o acrílico, que apresentam um número de UFC/cm² mais elevado, exibem diferenças para as superfícies de mármore e silicone, com contagem mais baixa de colónias (Figura 4.1).

As características que mais podem ter influenciado para esta diferença são a rugosidade e a capacidade hidrofóbica de cada superfície, uma vez que noutros estudos realizados para verificar a aderência de microrganismos em superfícies, essas foram as que mais afetaram a sobrevivência bacteriana (Fink *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2015). No estudo de Fink *et al.* (2017), os autores verificaram as características de diversas superfícies (silicone, alumínio, Teflon e vidro) e a capacidade das bactérias em lhes aderirem. Com os

resultados obtidos, os autores concluíram que a rugosidade, devido ao maior número de fissuras e defeitos nas superfícies e a hidrofobia têm um impacto enorme na aderência das bactérias.

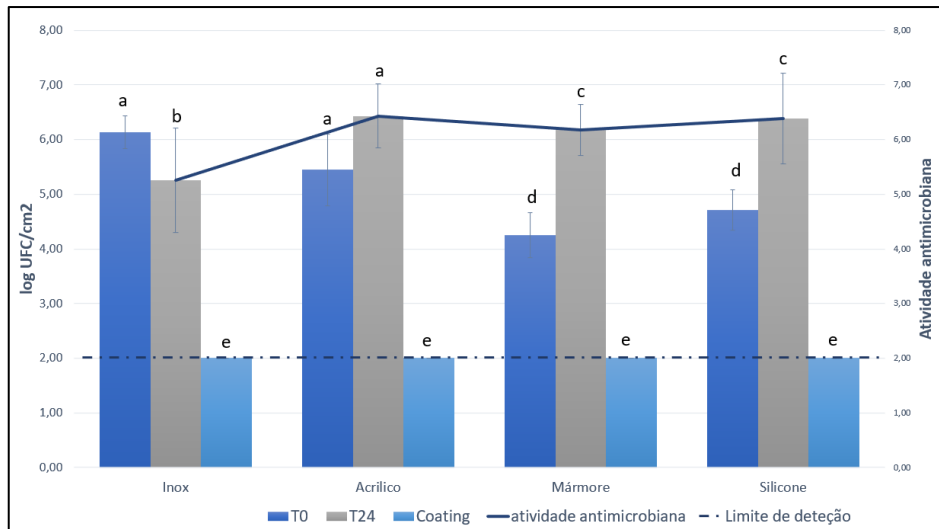


Figura 4.1 - Atividade antimicrobiana do revestimento contra *Salmonella*. Os resultados são médias baseadas em dados de três repetições e os desvios padrão são indicados por barras de erro. Letras minúsculas equivalentes, por isolado, significam diferenças não significativas entre cada condição ($P > 0,05$). A linha a tracejado indica o limite de detecção da técnica de enumeração.

No inox e no acrílico houve uma maior sobrevivência microbiana no momento T_0 (Figura 4.1), o que pode ter acontecido devido a uma menor hidrofobicidade apresentada por essas superfícies. Esta característica traduz a afinidade ou repulsa das superfícies em relação à água, influenciando o processo de adesão das bactérias (Fink *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2015). Já no caso do mármore e do silicone (Figura 4.1), os baixos valores de UFC/cm² obtidos no controle T_0 parecem ter sido unicamente influenciados pela sua elevada hidrofobicidade. Isto pode dever-se ao reduzido tempo de contacto do inóculo com a superfície, uma vez que as restantes características destas superfícies influenciariam para uma elevada adesão bacteriana. Observa-se isso nos resultados do controle T_{24} , onde ambas as superfícies têm diferenças significativas em relação aos respetivos controlos ($P = 0,001$). A diferença encontrada entre o controle T_0 e o T_{24} , no mármore e no silicone, pode ser explicada por estes serem materiais mais rugosos e, por isso, terem falhas e cavidades na superfície onde se acumulam as bactérias (Azelmad *et al.*, 2017; Fink *et al.*, 2017). Após 24 h a 22 °C verificou-se o aumento de células que se fixaram na superfície, equiparando com o valor obtido no inox e acrílico. Azelmad *et al.* (2017) estudaram, também, a adesão de bactérias em superfícies comumente encontradas nas cozinhas, como mármore, granito e inox. As suas conclusões foram semelhantes às do estudo de Fink *et al.* (2017), em que os fatores que mais afetam a aderência de bactérias é a rugosidade e as características físico-químicas (hidrofobia),

afirmando que células hidrofóbicas têm mais tendência para aderirem a superfícies hidrofóbicas e células hidrofílicas tendem a aderir melhor a superfícies hidrofílicas.

Apenas para o inox se verificou um decréscimo no valor de UFC/cm² (P = 0,224) após as T₂₄ nas superfícies controlo (Figura 4.1). Isto pode acontecer devido ao facto deste material ser bastante resistente ao calor e à corrosão causada pelos produtos de limpeza e alimentos com que entra em contacto (Cvetkovski, 2012). Esta resistência faz com que a superfície seja menos porosa dificultando a capacidade de adesão das bactérias e impedindo a sua multiplicação. Para além disso, a elevada resistência à abrasão e danos do inox, aumenta a probabilidade de este manter as propriedades higiénicas (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

É possível observar que o revestimento foi eficaz na eliminação de *Salmonella* em todas as superfícies, com contagens inferiores ao limite de deteção da técnica de enumeração (2 log UFC/cm²), mesmo quando estas superfícies apresentam características mais favoráveis ao crescimento bacteriano. Pode, então, ser considerada a hipótese de que o revestimento cria uma camada protetora nas superfícies. Lee e Pascall (2020), também obtiveram resultados idênticos no seu estudo, onde testaram a atividade antimicrobiana em superfícies de inox para *Listeria innocua* e *E. coli*. Os autores observaram uma redução de 3 a 4 ciclos logarítmicos para ambas as bactérias, provando que este tipo de revestimento tem eficácia contra bactérias Gram-positivas e negativas, ou seja, tem potencial para ser utilizada em ambientes onde exista a preocupação da ocorrência de contaminação cruzada, como é o caso das cozinhas (Lee & Pascall, 2020).

4.2. Contaminação cruzada

Nesta parte do estudo foi avaliado se o revestimento era capaz de prevenir a contaminação cruzada de um alimento (frango cozido/tomate) por uma superfície (inox/mármore) com o revestimento e previamente contaminada por uma matriz alimentar (gema de ovo/frango cozido/frango cru) com um *cocktail* de várias espécies de *Salmonella*.

Em todas as réplicas realizadas neste ensaio, as superfícies foram contaminadas com um *cocktail* a 10⁷ UFC/mL, de forma a ser possível detetar sempre que houvesse contaminação cruzada, mesmo se a taxa de transmissão fosse baixa. Foram também testados 2 tempos de contacto da matriz com a superfície antes de ser colocado o alimento, com o objetivo de verificar se o tempo de contacto influenciava os resultados e de forma a simular duas situações que podem ocorrer em ambiente doméstico: 10 segundos de contacto com a superfície, quando uma área é contaminada e logo de seguida é colocado outro alimento por cima; e após 2 horas,

quando a contaminação ocorre durante a preparação da refeição e só no fim de a consumir é que se procede à limpeza.

Os resultados obtidos após o tempo de contacto da superfície com a matriz relativos à atividade antimicrobiana do revestimento estão representados nas figuras 4.2.1 e 4.2.2.

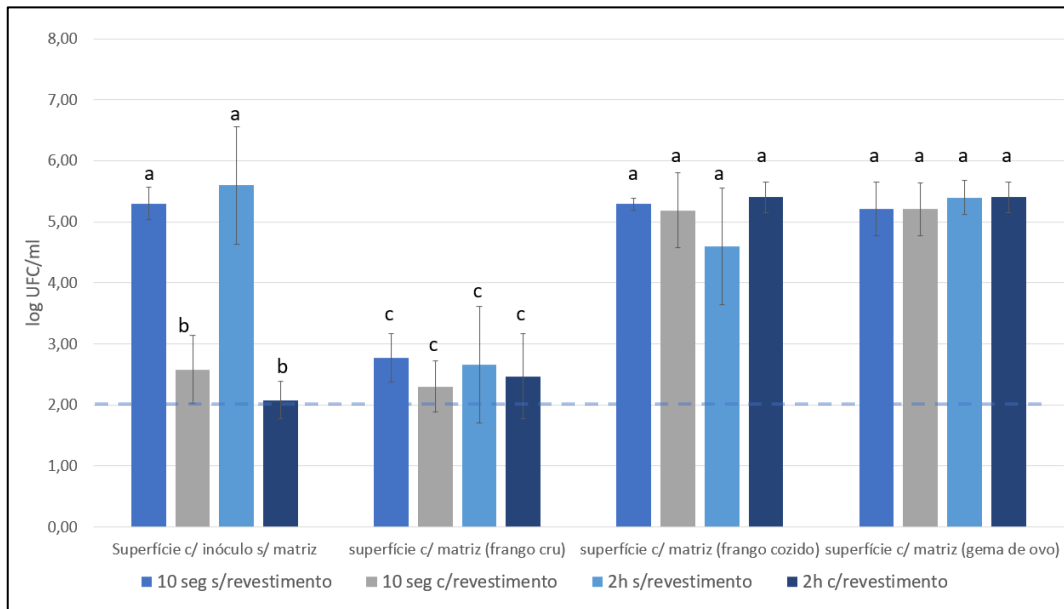


Figura 4.2.1 - Resultados da atividade antimicrobiana do revestimento no inox após o contacto de 10 seg e 2h com as matrizes alimentares. Os resultados são médias baseadas em dados de três repetições e os desvios padrão são indicados por barras de erro. Letras minúsculas equivalentes, por isolado, significam diferenças não significativas entre cada condição ($P > 0,05$). A linha a tracejado indica o limite de deteção da técnica de enumeração.

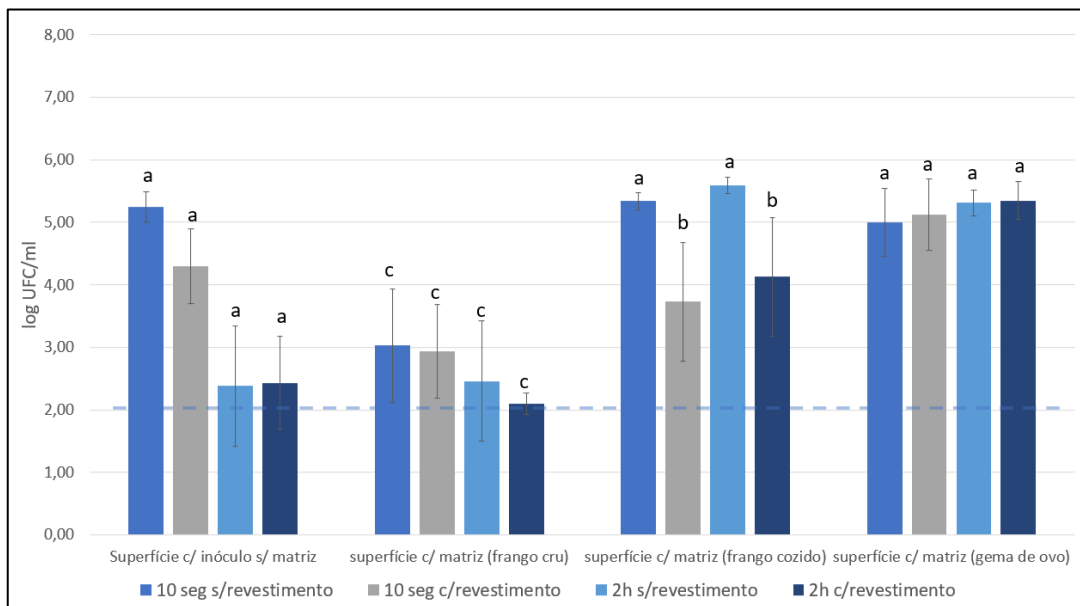


Figura 4.2.2 - Resultados da atividade antimicrobiana do revestimento no mármore após o contacto de 10 seg e 2h com as matrizes alimentares. Os resultados são médias baseadas em dados de três repetições e os desvios padrão são indicados por barras de erro. Letras minúsculas equivalentes, por isolado, significam diferenças não significativas entre cada condição ($P > 0,05$). A linha a tracejado indica o limite de deteção da técnica de enumeração.

Analisados os resultados, foi possível concluir que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as superfícies de inox e mármore. O mesmo já tinha sido comprovado no estudo de Jensen *et al.* (2013) em que os autores reportaram que a diferença entre superfícies pouco influencia a transferência bacteriana. No entanto, observaram-se diferenças significativas ($P = 0,002$) na matriz de frango cru em comparação às restantes. Estas diferenças provavelmente aconteceram, porque o método de preparação desta matriz foi diferente. Na matriz de frango cru foram utilizados pequenos pedaços de frango, resultando em superfícies com uma textura rugosa, o que dificultava a contaminação do alimento, em comparação com as matrizes líquidas, onde a contaminação foi mais fácil. É sabido que essa rugosidade confere proteção às bactérias, dificultando a sua transferência para as superfícies (Tang *et al.*, 2011).

Nas figuras 4.2.3 e 4.2.4, observam-se os resultados obtidos acerca da eficácia do revestimento antimicrobiano na prevenção da transferência de *Salmonella* para alimentos (frango/tomate) que entraram em contacto com as superfícies contaminadas.

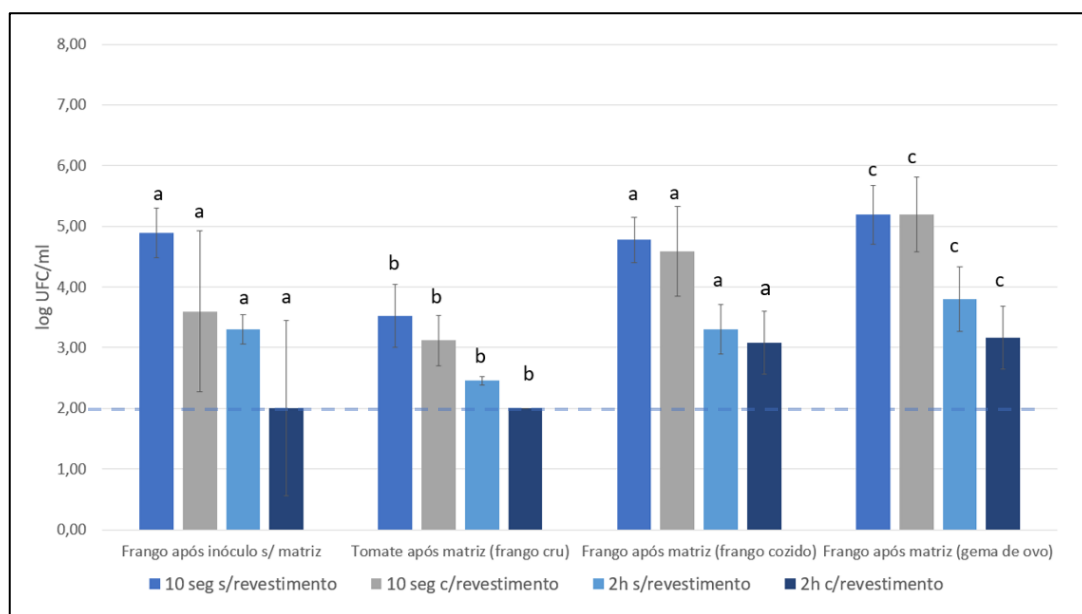


Figura 4.2.3- Resultados da transferência de bactérias da superfície para o alimento, após 10seg e 2h de contacto da matriz com o inox. Os resultados são médias baseadas em dados de três repetições e os desvios padrão são indicados por barras de erro. Letras minúsculas equivalentes, por isolado, significam diferenças não significativas entre cada condição ($P > 0,05$). A linha tracejada indica o limite de deteção da técnica de enumeração.

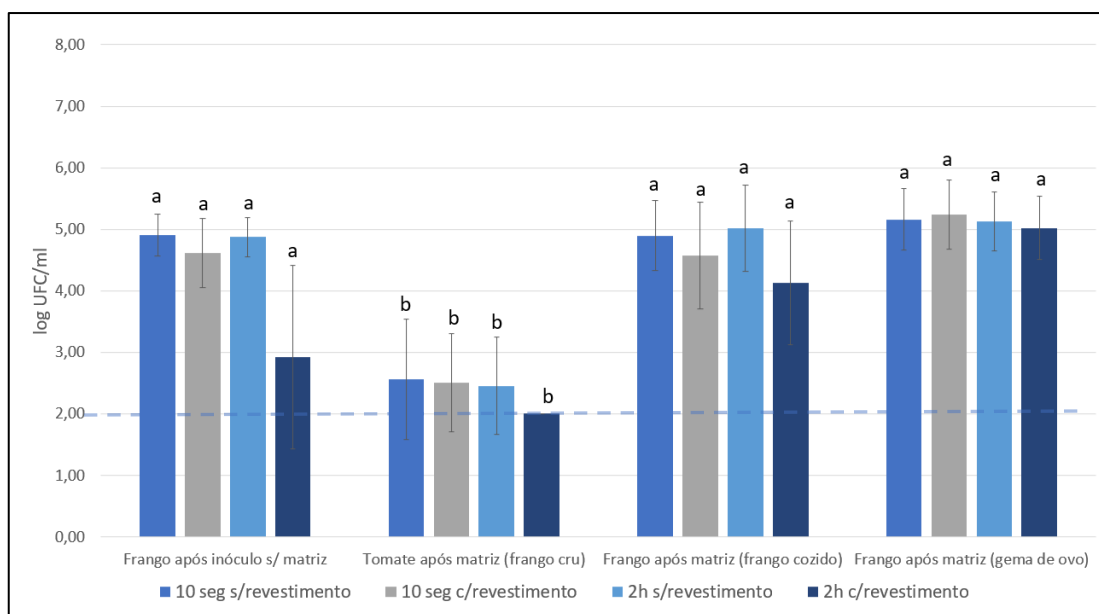


Figura 4.2.4 - Resultados da transferência de bactérias da superfície para o alimento contaminação cruzada, após 10seg e 2h de contacto da matriz com o mármore. Os resultados são médias baseadas em dados de três repetições e os desvios padrão são indicados por barras de erro. Letras minúsculas equivalentes, por isolado, significam diferenças não significativas entre cada condição ($P > 0,05$). A linha a tracejado indica o limite de detecção da técnica de enumeração.

Relativamente ao tempo de contacto, foi verificado que em nenhum dos casos (Figura 4.2.3 e 4.2.4) este foi um fator que influenciou nas contagens obtidas, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$). Dawson *et al.* (2007) também analisaram se o tempo de permanência do inóculo de *Salmonella* numa superfície poderia afetar a sua transmissão, colocando 1 mL de inóculo de concentração 10^7 UFC/mL, em superfícies de 10 x 10 cm, colocadas na estufa a 21 °C por 0, 2, 4, 8 e 24 h e, de seguida, era colocado o alimento “limpo”. Os resultados obtidos por Dawson *et al.* (2007) permitiram aos autores concluir que as taxas de transferência em função do tempo de espera variavam com a superfície testada: no azulejo até às 4h havia um rápido decréscimo e estabilizava a partir daí; na carpete, a taxa de transferência não sofria grande alteração até às 4h, mas depois das 8h existia uma redução de 1,5 log CFU/cm².

Noutros estudos já foi comprovado que o tipo de superfície contaminada não é um fator determinante para a transferência bacteriana. A humidade do alimento, a uniformidade da superfície do alimento e o tipo de matriz contaminada mostraram-se ser fatores mais determinantes para a ocorrência de contaminação cruzada (Jensen *et al.*, 2013; Miranda & Schaffner, 2016).

O tipo de matriz foi um dos fatores analisados nesta experiência. Este fator é relevante, pois o nível de nutrientes presentes na matriz afeta a sobrevivência das bactérias presentes na superfície; quanto mais nutritiva for, mais bactérias retém (Dawson *et al.*, 2007).

Na matriz de frango cru, a diferença de valores deve-se ao diferente método de preparação, como explicado acima. Contudo, o alimento (tomate) utilizado para avaliar a contaminação cruzada a partir desta matriz (frango cru) também foi diferente dos restantes, mas não parece que este tenha tido grande influência na obtenção de valores de UFC/mL mais baixos que os restantes, uma vez que este, por ser um alimento húmido, poderia facilitar a transferência bacteriana (Gkana *et al.*, 2016; Miranda & Schaffner, 2016).

Na matriz de frango cozido observaram-se diferenças significativas na sobrevivência de *Salmonella* entre as superfícies de mármore tratadas e não tratadas ($P = 0,019$), no entanto para a contaminação cruzada, não se observaram diferenças significativas entre os alimentos ($P = 1,000$). Com a análise dos gráficos (4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5) verificaram-se diferenças entre a sua interação no inox e no mármore, contrariando o estudo anteriormente referido de Jensen *et al.* (2013), mostrando que nesta matriz as superfícies de contacto interferem na transmissão de bactérias. Estes resultados ocorrem provavelmente por esta matriz ser a menos nutritiva, composta por 10% de frango e 90% de água, conferindo menos proteção à bactéria (Dawson *et al.*, 2007).

Na matriz de gema de ovo, obtiveram-se diferenças significativas entre as superfícies contaminadas e o controlo ($P < 0,05$) em ambas as situações. Os valores alcançados na matriz foram sempre mais elevados do que os do controlo em todos os momentos, isso pode dever-se ao facto de a natureza da matriz ter um papel determinante na ocorrência de contaminação cruzada (Miranda & Schaffner, 2016). A gema de ovo é um dos alimentos mais abundantes, principalmente constituída por triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, ácidos gordos e vitaminas (Chousalkar *et al.*, 2021). O patogénico *Salmonella* utiliza esses nutrientes, presentes na gema de ovo, para estabilizar a membrana celular quando está em stress, podendo ocorrer a sua multiplicação (Chousalkar *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2018).

Nos controlos, apenas diferenças significativas ($P = 0,026$) foram encontradas entre as superfícies de inox tratadas e não tratadas (figura 4.2.1), demonstrando novamente o que tinha sido observado na primeira parte deste trabalho em relação à atividade antimicrobiana do revestimento utilizado. No entanto, com os resultados obtidos nesta parte do estudo, observou-se que o revestimento comercial só depois de 2h de contacto e em inóculos sem matrizes é que apresentou valores quase inexistentes de sobrevivência de *Salmonella*. Dessa forma, foi possível comprovar que o uso deste revestimento não impediu a transmissão, não havendo

diferenças significativas ($P > 0,05$) entre superfícies tratadas e não tratadas quando a bactéria está inserida numa matriz alimentar.

Gunther *et al.* (2018), realizaram um estudo sobre a atividade antimicrobiana de um revestimento de compostos quaternários de amónio contra *Campylobacter jejuni*, onde utilizaram diferentes concentrações de revestimento e diferentes tempos de contacto. A conclusão a que chegaram foi que o revestimento tem sempre atividade antimicrobiana, mas em curtos períodos de tempo de contacto a sua eficácia reduz, e demonstra uma boa atividade microbiana em longos períodos de contacto.

Apesar do revestimento utilizado neste estudo ter sido efetivo na ausência de uma matriz alimentar, na sua presença o mesmo não parece ser capaz de impedir a contaminação cruzada de alimentos, não se mostrando eficaz na eliminação de *Salmonella*. A matriz alimentar parece ter sido o fator determinante para a sobrevivência de *Salmonella*, uma vez que conferiu proteção à bactéria dificultando a atuação do revestimento (Gkana *et al.*, 2016; H. Kusumaningrum, 2003; Miranda & Schaffner, 2016). O mesmo tem sido reportado para outros patogénicos; Kaden *et al.* (2018) estudaram a sobrevivência de *Brucella* em várias matrizes, como leite, farinha, folhas de espinafres, água de torneira, entre outros. Observaram que a recuperação de *Brucella* após uma hora em contacto com as matrizes alimentares foi elevada, exceto nos espinafres em que observaram uma baixa recuperação. Foi também observado que a bactéria consegue permanecer viva durante vários dias em algumas matrizes alimentares (132 dias no leite e 28 na água). Os autores concluíram que a sobrevivência de *Brucella* foi afetada pela composição das matrizes, mas que a bactéria tem uma grande capacidade de sobrevivência das matrizes favoráveis ao seu crescimento, como o caso do leite que é um reservatório natural de *Brucella*.

5. Conclusão

A sobrevivência de patogênicos nas superfícies que contactam com os alimentos é um fator a considerar na avaliação da contaminação cruzada de superfícies para alimentos. Por outro lado, dificultar a permanência desses organismos nas áreas de contacto com alimentos é uma solução para diminuir a ocorrência de contaminação cruzada. Foi com esse intuito que se realizou o presente trabalho, para se verificar se um revestimento comercial ajudaria a prevenir a ocorrência de contaminação cruzada de superfícies para alimentos.

Ao aplicar a norma internacional ISO 22196: 2011, observou-se uma redução bacteriana para níveis inferiores ao limite de detecção em todas as superfícies tratadas, provando que o revestimento tem uma boa atividade antimicrobiana.

Contudo, após a adição de um cocktail de *Salmonella* a matrizes alimentares, de forma a recriar condições reais numa cozinha, o revestimento não se mostrou tão eficaz. Os valores de sobrevivência bacteriana apresentados pelas superfícies após o contacto com as matrizes contaminadas, não apresentaram diferenças significativas entre superfícies tratadas e não tratadas ($P > 0,05$), assim como os valores obtidos na transmissão de bactérias para os alimentos após o contacto com as superfícies contaminadas. O tempo de permanência da matriz na superfície não foi um fator determinante, uma vez que não demonstrou diferenças, ao contrário do material das superfícies, onde a rugosidade e a sua capacidade hidrofóbica interferiram com a sobrevivência e transferência de *Salmonella*. Contudo, o fator que mais peso teve na sobrevivência bacteriana foi a incorporação do inóculo nas diferentes matrizes, pois verificou-se que todas elas conferiram proteção ao patogénico *Salmonella* quando em contacto com o revestimento.

Após a realização deste estudo, pode ser concluído que a utilização da norma ISO 22196: 2011 para averiguar a eficácia de um revestimento dá apenas uma ideia da sua atividade antimicrobiana. Isto porque os métodos utilizados não se assemelham ao que acontece na realidade, levando a que os resultados da atividade antimicrobiana se alterem quando testados noutras circunstâncias. É o caso do uso de uma matriz alimentar, circunstância possível de acontecer em qualquer ambiente de preparação de alimentos, que confere proteção às bactérias e diminui a eficácia do revestimento, não impedindo possíveis contaminações cruzadas.

6. Trabalho futuro

Para completar este estudo, algumas sugestões para futuros trabalhos que poderão ser consideradas são:

- Realizar as experiências com outros patógenos alimentares importantes, como *Listeria monocytogenes*, por exemplo, para verificar se os resultados se assemelham aos obtidos para o patógeno *Salmonella*.
- Utilizar outro tipo de superfícies, como vidro ou plástico, que também são materiais bastante utilizados nas cozinhas, para testar se influenciam de forma diferente a sobrevivência de bactérias.
- Para obter um estudo mais completo sobre revestimentos antimicrobianos, outros revestimentos com diferentes agentes devem ser testados e, seria também interessante, avaliar combinações entre estes.
- Neste estudo foi verificado que a transferência de *Salmonella* foi menor na matriz sólida, mas foram utilizadas poucas amostras. Futuramente, seria interessante estudar esta diferença entre matrizes sólidas e líquidas em amostras mais variadas.

Bibliografia

- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 22, Issue 2, pp. 110–121). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Azelmad, K., Hamadi, F., Mimouni, R., Amzil, K., Latrache, H., Mabrouki, M., & el Boulani, A. (2017). Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus xylosus* to materials commonly found in catering and domestic kitchens. *Food Control*.
- Cardoso, M. J., Ferreira, V., Truninger, M., Maia, R., & Teixeira, P. (2020). Cross-contamination events of *Campylobacter* spp. in domestic kitchens associated with consumer handling practices of raw poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108984>
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. In *Food Research International* (Vol. 45, Issue 2, pp. 545–556). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>
- Chousalkar, K., Khan, S., & McWhorter, A. R. (2021). Microbial quality, safety and storage of eggs. *ScienceDirect*.
- Cloutier, M., Mantovani, D., & Rosei, F. (2015). Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives and Opportunities. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 33, Issue 11, pp. 637–652). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.002>
- Cvetkovski, S. (2012). STAINLESS STEEL IN CONTACT WITH FOOD AND BEVARAGE. In *Association of Metallurgical Engineers of Serbia AMES Scientific*.
- Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C., & Simmons, L. (2007). Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: Testing the five-second rule. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 945–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03171.x>
- de Jong, A. E. I., Verhoeff-Bakkenes, L., Nauta, M. J., & de Jonge, R. (2008). Cross-contamination in the kitchen: Effect of hygiene measures. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 615–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03778.x>
- DeFlorio, W., Liu, S., White, A. R., Taylor, T. M., Cisneros-Zevallos, L., Min, Y., & Scholar, E. M. A. (2021). Recent developments in antimicrobial and antifouling coatings to reduce or prevent contamination and cross-contamination of food contact surfaces by bacteria.

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 3093–3134.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12750>
- Djekic, I., Nikolić, A., Uzunović, M., Marijke, A., Liu, A., Han, J., Brnčić, M., Knežević, N., Papademas, P., LEMONIATI, K., Witte, F., Terjung, N., Papageorgiou, M., Zinoviadou, K. G., Dalle Zotte, A., Pellattiero, E., Sołowiej, B. G., Guiné, R. P. F., Correia, P., ... Tomasevic, I. (2021). Covid-19 pandemic effects on food safety - Multi-country survey study. *Food Control*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107800>
- EFSA. (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (n.d.-a). *Campylobacteriosis*. ECDC. Retrieved November 20, 2021, from <https://www.ecdc.europa.eu/en/campylobacteriosis>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (n.d.-b). *Facts about salmonellosis*. Retrieved November 20, 2021, from <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-diseases-and-public-health/salmonellosis/facts>
- Fearnley, E., Raupach, J., Lagala, F., & Cameron, S. (2011). Salmonella in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.004>
- Fink, R., Okanovič, D., Dražič, G., Abram, A., Oder, M., Jevšnik, M., & Bohinc, K. (2017). Bacterial adhesion capacity on food service contact surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 27(3), 169–178. <https://doi.org/10.1080/09603123.2017.1310188>
- Fung, F., Wang, H. S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century. In *Biomedical Journal* (Vol. 41, Issue 2, pp. 88–95). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>
- Gkana, E., Lianou, A., & Nychas, G. J. E. (2016). Transfer of Salmonella enterica serovar typhimurium from beef to tomato through kitchen equipment and the efficacy of intermediate decontamination procedures. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1252–1258. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-531>
- Gunther, N. W., Abdul-Wakeel, A., Reichenberger, E. R., Al-Khalifa, S., & Minbiole, K. P. C. (2018). Quaternary ammonium compounds with multiple cationic moieties (multiQACs)

- provide antimicrobial activity against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, *94*, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.038>
- Guyard-Nicodème, M., Tresse, O., Houard, E., Jugiau, F., Courtillon, C., el Manaa, K., Laisney, M. J., & Chemaly, M. (2013). Characterization of *Campylobacter* spp. Transferred from naturally contaminated chicken legs to cooked chicken slices via a cutting board. *International Journal of Food Microbiology*, *164*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.009>
- Hsieh, Y. H., Simpson, S., Kerdahi, K., & Sulaiman, I. M. (2018). A Comparative Evaluation Study of Growth Conditions for Culturing the Isolates of *Campylobacter* spp. *Current Microbiology*, *75*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1351-6>
- Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. In *Virulence* (Vol. 4, Issue 3, pp. 230–240). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.23753>
- Iulietto, M. F., & Evers, E. G. (2020a). Modelling and magnitude estimation of cross-contamination in the kitchen for quantitative microbiological risk assessment (QMRA). *EFSA Journal*, *18*(S1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.e181106>
- Iulietto, M. F., & Evers, E. G. (2020b). Modelling and magnitude estimation of cross-contamination in the kitchen for quantitative microbiological risk assessment (QMRA). *EFSA Journal*, *18*(S1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.e181106>
- Jensen, D. A., Friedrich, L. M., Harris, L. J., Danyluk, M. D., & Schaffner, D. W. (2013). Quantifying transfer rates of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 between fresh-cut produce and common kitchen surfaces. *Journal of Food Protection*, *76*(9), 1530–1538. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-098>
- JIS. (2000). *Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy (JIS Z 2801)*.
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global epidemiology of campylobacter infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Kaden, R., Ferrari, S., Jinnerot, T., Lindberg, M., Wahab, T., & Lavander, M. (2018). *Brucella abortus*: Determination of survival times and evaluation of methods for detection in several matrices. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3134-5>
- Kang, I.-B., Kim, D.-H., Jeong, D., Park, J.-H., Lim, H.-W., & Seo, K.-H. (2018). Heat resistance of *Salmonella* Enteritidis in four different liquid egg products and the performance and equivalent conditions of Ministry of Food and Drug Safety of South Korea and US Department of Agriculture protocols. *Food Control*.

- Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing*.
- Kim, I., Viswanathan, K., Kasi, G., Thanakkasaranee, S., Sadeghi, K., & Seo, J. (2020). ZnO Nanostructures in Active Antibacterial Food Packaging: Preparation Methods, Antimicrobial Mechanisms, Safety Issues, Future Prospects, and Challenges. In *Food Reviews International*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1737709>
- King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabaras, D., Fox, E. M., & Hill, J. P. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 68, pp. 160–175). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014>
- Knetsch, M. L. W., & Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. In *Polymers* (Vol. 3, Issue 1, pp. 340–366). <https://doi.org/10.3390/polym3010340>
- Kusumaningrum, H. (2003). *Behaviour and cross-contamination of pathogenic bacteria in household kitchens-relevance to exposure assessment*.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85(3), 227–236. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00540-8)
- Lee, J., & Pascall, M. A. (2020). Reduction in microbial survival on food contact surfaces by a spray coated polymerized quaternary ammonium compound. *Food Science and Nutrition*, 8(5), 2472–2477. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1537>
- Li, Z., Wang, S., Yang, X., Liu, H., Shan, Y., Xu, X., Shang, S., & Song, Z. (2020). Antimicrobial and antifouling coating constructed using rosin acid-based quaternary ammonium salt and N-vinylpyrrolidone via RAFT polymerization. *Applied Surface Science*.
- Miranda, R. C., & Schaffner, D. W. (2016). Longer contact times increase cross-contamination of *Enterobacter aerogenes* from surfaces to food. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6490–6496. <https://doi.org/10.1128/AEM.01838-16>
- Møretro, T., Martens, L., Teixeira, P., Ferreira, V. B., Maia, R., Maugesten, T., & Langsrud, S. (2020). Is visual motivation for cleaning surfaces in the kitchen consistent with a

- hygienically clean environment? *Food Control*, 111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107077>
- Nguyen, H. D. N., Yang, Y. S., & Yuk, H. G. (2014). Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.022>
- Oh, E., McMullen, L., & Jeon, B. (2015). Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00295>
- Poverenov, E., & Klein, M. (2018). Formation of contact active antimicrobial surfaces by covalent grafting of quaternary ammonium compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- Priyadarshi, R., & Rhim, J. W. (2020). Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102346>
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., & Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1908–1913. <https://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>
- Rocha, A. (2016). *Characterization of cells that survived to disinfection in food processing areas of retail facilities Universidade do Minho Escola de Engenharia*.
- Ryan, M. P., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. In *BioMed Research International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>
- Salwiczek, M., Qu, Y., Gardiner, J., Strugnell, R. A., Lithgow, T., McLean, K. M., & Thissen, H. (2014). Emerging rules for effective antimicrobial coatings. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 32, Issue 2, pp. 82–90). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.008>
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. In *Food Chemistry* (Vol. 343). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>
- Smith, J. L., & Fratamico, P. M. (2010). *Fluoroquinolone Resistance in Campylobacter*. http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/73/6/1141/1679514/0362-028x-73_6_1141.pdf

- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2005). Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. In *Letters in Applied Microbiology* (Vol. 41, Issue 4, pp. 297–302). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01788.x>
- Soares, V. M., Pereira, J. G., Viana, C., Izidoro, T. B., Bersot, L. dos S., & Pinto, J. P. de A. N. (2012). Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. *Food Microbiology*, *30*(2), 453–456. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.028>
- Sun, G., Ge, H., Luo, J., & Liu, R. (2019). Highly wear-resistant UV-curing antibacterial coatings via nanoparticle self-migration to the top surface. *Progress in Organic Coatings*, *135*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.018>
- Tang, J. Y. H., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., Ghazali, F. M., Saleha, A. A., & Son, R. (2011). Transfer of *Campylobacter jejuni* from raw to cooked chicken via wood and plastic cutting boards. *Letters in Applied Microbiology*, *52*(6), 581–588. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03039.x>
- Teixeira, P., Rodrigues, D., Romeu, M. J., & Azeredo, J. (2015). *O impacto de biofilmes microbianos na higiene e segurança alimentar*.
- Tiwari, A. (2018). *Handbook of Antimicrobial Coatings*. Elsevier. https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=xbpvDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=A.+tiwari+coating&ots=cKPS1x1zGE&sig=G1CaKklhEP8G3KkYT68I4DU1swQ&redir_esc=y#v=onepage&q=A.%20tiwari%20coating&f=false
- Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.013>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among campylobacter. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- World Health Organization (WHO). (2017). *THE BURDEN OF FOODBORNE DISEASES IN THE WHO EUROPEAN REGION*.
- Yagci, M. B., Bolca, S., Heuts, J. P. A., Minga, W., & Witha, G. (2011). Antibacterial polyurethane coatings based on ionic liquid quaternary ammonium compounds. *ELSEVIER*.
- Yemmireddy, V. K., & Hung, Y. C. (2017a). Using Photocatalyst Metal Oxides as Antibacterial Surface Coatings to Ensure Food Safety—Opportunities and Challenges.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(4), 617–631.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12267>

Yemmireddy, V. K., & Hung, Y.-C. (2017b). Photocatalytic TiO₂ coating of plastic cutting board to prevent microbial cross-contamination. *Food Control*.

Yuan, Y., Hays, M. P., Hardwidge, P. R., & Kim, J. (2017). Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances*, 7(23), 14254–14261.
<https://doi.org/10.1039/c7ra01571b>