

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL POR NITRETAÇÃO A  
PLASMA E IMPLANTAÇÃO IÔNICA DE PRATA (AG<sup>+</sup>) A BAIXAS ENERGIAS:  
ALTERNATIVAS PARA REDUÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM  
SUPERFÍCIES METÁLICAS**

REGINA ZILIO

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Sopeña Casarin

Porto Alegre

Agosto/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL POR NITRETAÇÃO A  
PLASMA E IMPLANTAÇÃO IÔNICA DE PRATA (AG<sup>+</sup>) A BAIXAS ENERGIAS:  
ALTERNATIVAS PARA REDUÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM  
SUPERFÍCIES METÁLICAS**

REGINA ZILIO  
NUTRICIONISTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de pesquisa: Microbiologia Agrícola

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Sopeña Casarin

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Agosto/2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Zilio, Regina

Modificação da superfície de aço inoxidável por nitretação a plasma e implantação iônica de prata a baixas energias: alternativas para redução de patógenos alimentares em superfícies metálicas / Regina Zilio. -- 2016.

62 f.

Orientador: Eduardo César Tondo.

Coorientadora: Leticia Sopena Casarin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Modificação de superfícies metálicas. 2. Patógenos alimentares. 3. Nitretação a plasma. 4. Implantação iônica de prata. I. Tondo, Eduardo César, orient. II. Casarin, Leticia Sopena, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

É graça divina começar bem.  
Graça maior, persistir na caminhada certa.  
Mas graça das graças é não desistir nunca.

D. Helder Câmara

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ter mostrado o caminho certo e ter aberto esta oportunidade de realizar o mestrado.

Ao orientador, Dr. Eduardo Cesar Tondo, pela dedicação, paciência, apoio, incentivo e tempo despendido na realização deste trabalho. Sem o qual este projeto nunca haveria sido realizado.

À co-orientadora, Dra. Leticia Sopeña Casarin, pela valiosa orientação e por compartilhar de seu vasto conhecimento científico, que foi indispensável na realização deste trabalho. Pela amizade, dedicação, paciência, apoio, incentivo e tempo despendido na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Raul e Janete, à minha irmã Tais, e ao meu namorado, Marcos, por terem me guiado e apoiado nesta jornada.

Às professoras e amigas, Crislaine Aparecida Paludo e Leticia Schmidt, que sempre acreditaram em mim.

Às minhas amigas, Valdirene Titton, Janete Nodari, Lilian Treviso, que com alegria contagiante trouxeram-me momentos de descontração e felicidade.

À Vera, pela ajuda que não foi nos experimentos, mas foi fundamental e, principalmente, pela convivência que tornou o dia a dia melhor.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Microbiologia dos Alimentos pela amizade e carinho, em especial, Caroline Kothe, onde juntas iniciamos uma valiosa jornada de trabalho e estudos, formando um círculo de amizade e companheirismo.

Ao professor Cesar Aguzolli, Universidade de Caxias do Sul, pelas implantações de prata e nitretações por plasma nas superfícies de aço inoxidável.

À Tatiana Pacheco Soares, Universidade de Caxias do Sul, pela paciência e grandiosa colaboração neste trabalho: RBS, GD-OES e implantação de prata e nitretação por plasma nos cupons de aço inoxidável.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e ao Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do mestrado e pelo aprendizado.

Enfim, agradecimentos são inúmeros, pois várias pessoas fizeram parte desta conquista. Agradeço a todos pelo carinho e por terem acreditado no meu potencial.

Muito obrigada!

# MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL POR NITRETAÇÃO A PLASMA E IMPLANTAÇÃO IÔNICA DE PRATA (AG<sup>+</sup>) A BAIXAS ENERGIAS: ALTERNATIVAS PARA REDUÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM SUPERFÍCIES METÁLICAS<sup>1</sup>

Autor: Regina Zilio

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Sopeña Casarin

## RESUMO

A adesão e a formação de biofilme bacterianos em superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com alimentos, além de contaminar o produto durante o processamento, podem ocasionar doenças de origem alimentar, que acarretam em perdas econômicas e, principalmente em problemas de saúde pública. O aço inoxidável AISI (*American Iron and Steel Institute*) 304 é o material mais utilizado na fabricação de equipamentos e utensílios. Por esse motivo, a modificação da superfície de aços inoxidáveis pode ser uma alternativa promissora para evitar ou, ao menos, diminuir a adesão bacteriana e a formação de biofilmes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos tratamentos de nitretação a plasma e de implantação iônica de prata (Ag<sup>+</sup>) a baixas energias em aço inoxidável AISI 304 sobre a adesão e redução de um patógeno alimentar Gram-negativo (*Salmonella* Enteritidis) e um Gram-positivo (*Listeria monocytogenes*) sobre essa superfície. Os corpos de prova de aço inoxidável AISI 304 foram tratados por nitretação a plasma, variando as condições (tempo, temperatura e composição de gases), ou tratados pela implantação iônica de prata (Ag<sup>+</sup>) variando a baixa energia (2 e 4 KeV) no equipamento *Ion Plating Diversified* (IPD) e a adesão bacteriana foi comparada com os corpos de prova não tratados. Os resultados mostraram que as duas técnicas de modificação da superfície propiciaram redução no número de células aderidas no aço inoxidável em quase 1 log para as duas bactérias, no entanto, as reduções foram maiores quando o aço inoxidável foi alterado pela técnica de nitretação a plasma. Este trabalho mostra-se como um importante passo na pesquisa de novas tecnologias que podem ser empregadas para reduzir ou impedir a adesão e a formação de biofilmes bacterianos em aço inoxidável.

Palavras-chaves: adesão, biofilmes, propriedades antimicrobianas, íons de prata, nitretação, aço inoxidável, indústria de alimentos, microorganismos

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (62 p.) agosto, 2016.

# **MODIFICATION OF STAINLESS STEEL SURFACES BY PLASMA NITRIDING AND SILVER (Ag<sup>+</sup>) ION IMPLANTATION AT LOW ENERGY: ALTERNATIVES TO REDUCE FOOD PATHOGENS IN METAL SURFACES<sup>2</sup>**

Author: Regina Zilio

Advisor: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-Advisor: Prof. Dr. Letícia Sopeña Casarin

## **ABSTRACT**

Both adhesion and formation of bacterial biofilms on surface of equipments and items in contact with food can cause contamination on the product during its processing and foodborne diseases as well, resulting in economic losses and, most significant, serious issues on public health. The AISI 304 (American Iron and Steel Institute) stainless steel is the most used material to equipment and utensils' manufacture. For this reason, the surface modification of stainless steel may be a useful alternative to either avoid or, at least, reduce both bacterial adhesion and biofilm formation. This study intended to evaluate both plasma nitriding and silver (Ag<sup>+</sup>) ion implantation treatments' effects at low energies in AISI 304 stainless steel, on adherence and reduction of a Gram-negative food pathogens (*Salmonella Enteritidis*) and a Gram-positive (*Listeria monocytogenes*) on that surface. The AISI 304 stainless steel tested parts were treated by plasma nitriding, modifying silver (Ag<sup>+</sup>) ion implantation, changing low energy in a range between (2 and 4 keV) at Ion Plating Diversified (IPD) equipment, besides that bacterial adhesion was compared with not treated parts. The results showed that both surface modification techniques reduced the number of adhered cells at stainless steel about 1 log for both bacteria, however the reductions were larger when stainless steel has been modified by plasma nitriding technique. This work presents itself as an important step in new technologies' research, which can be employed to either reduce or avoid the stainless steel bacterial biofilms adhesion and formation.

Keywords: adhesion, biofilms, antimicrobial properties, ions of silver, nitriding, stainless steel, food industry, microorganisms

---

<sup>2</sup> Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (62 p.) august, 2016.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1. Adesão microbiana e formação de biofilmes .....	4
3.2. Adesão microbiana às superfícies de materiais utilizados nas indústrias de alimentos.....	5
3.3. Fatores que influenciam na adesão microbiana .....	8
3.4. Estratégias para controle da adesão bacteriana e formação de biofilmes.....	9
3.5. Alteração de superfícies utilizando nitretação a plasma .....	10
3.6. Alteração de superfícies utilizando implantação iônica de Ag <sup>+</sup> a baixas energias.. .....	11
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1. Bactérias utilizadas.....	15
4.2. Preparações dos inóculos .....	15
4.3. Elaboração dos corpos de prova .....	15
4.4. Tratamento de nitretação a plasma .....	15
4.5. Tratamento de implantação iônica de prata (Ag <sup>+</sup> ) a baixas energias.....	17
4.6. Simulação das trajetórias e perdas de energia dos íons implantados .....	18
4.7. Determinação do perfil de profundidade das superfícies tratadas .....	18
4.8. Preparação dos corpos de prova.....	19
4.9. Tratamento de desoxidação .....	19
4.10. Contaminação experimental dos corpos de prova e avaliação da adesão bacteriana .....	19
4.11. Avaliação da resistência térmica dos melhores tratamentos .....	20
4.12. Avaliação da resistência dos tratamentos a produtos químicos utilizados na higienização de indústrias de alimentos.....	21
4.13. Análise estatística .....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
5.1. Influência do tratamento de nitretação a plasma na adesão de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> .....	22
5.2. Influência do tratamento de implantação iônica de íons de prata (Ag <sup>+</sup> ) a baixas energias na inativação de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> .....	28
5.3. Resistência térmica (121°C) e resistência a produtos químicos (NaClO e NaOH) do aço inoxidável AISI 304 tratado por nitretação a plasma .....	35
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos de nitretação a plasma com diferentes condições (potência, tempo, composição dos gases e temperatura) utilizados na seleção inicial das amostras .....	16
Tabela 2 – Condições do processo de implantação iônica de Ag <sup>+</sup> a baixas energias aplicados aos corpos de prova de aço inoxidável AISI 304.....	17
Tabela 3 – Taxas de redução para <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Listeria monocytogenes</i> em superfícies de aço inoxidável AISI 304 submetidas a diferentes condições de tratamento por nitretação a plasma.....	22
Tabela 4 – Taxa de redução da adesão de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> em aço inoxidável AISI 304 submetidos a quatro tratamentos de nitretação a plasma	25
Tabela 5 – Taxa de redução da adesão (1 hora) e da inativação (24 horas) de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> em aço inoxidável AISI 304, tratado por implantação iônica de Ag <sup>+</sup> a baixas energias .....	29
Tabela 6 – Taxa de redução de <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> em aço inoxidável AISI 304 tratado por implantação iônica de Ag <sup>+</sup> a baixas energias .....	32
Tabela 7 – Resistência térmica (121°C por 15 minutos) e resistência a produtos químicos (NaClO e NaOH) do tratamento de nitretação a plasma de aço inoxidável AISI 304 com adesão de <i>L. monocytogenes</i> e da <i>S. Enteritidis</i> .....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil de implantação de N <sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 1) e seus principais constituintes .....	23
Figura 2 – Perfil de implantação de N <sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 3) e seus principais constituintes .....	24
Figura 3 – Perfil de implantação de N <sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 13) e seus principais constituintes .....	24
Figura 4 – Perfil de implantação de N <sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 14) e seus principais constituintes .....	25
Figura 5 – Resultado da simulação das trajetórias e perdas de energia dos íons de prata implantados a 2 KeV em aço inoxidável AISI 304 (Tratamento 2) .....	30
Figura 6 – Perfil da implantação de Ag <sup>+</sup> na amostra no AISI 304 (Tratamento 2) com seus principais constituintes.....	31
Figura 7 – Representação do alcance da profundidade dos íons de prata implantados no aço inoxidável AISI 304 (Tratamento 2) com base nas informações obtidas na simulação de Monte Carlo.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Ampere
AISI	American Iron and Steel Institute
Ag	Prata
Ag <sup>+</sup>	Íons prata
Ar	Argônio
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EFSA	European Food Safety Authority
EPS	Extracellular Polymeric Substances
KeV	Quilo elétrons-volt
H	Hidrogênio
Ig	Imunoglobulina
IPD	Ion Plating Diversified
PPM	Parte por milhão
N	Nitrogênio
GD-OES	Glow-Discharge Optical Emission Spectroscopy
RF	Rádiofrequência
SRIM	Stopping and Range of Ions in Matter
TR	Taxa de redução
TD	Tratamento de desoxidação
VIM	Fusão de indução a vácuo
UFC	Unidade Formadora de Colônias
FDA	Food and Drug Administration

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação de superfícies que entram em contato com os alimentos tem sido cada vez mais enfatizada, uma vez que a higienização dessas superfícies pode não inativar ou remover completamente os micro-organismos aderidos, favorecendo a formação de biofilmes e a contaminação cruzada. Nesse sentido, o *design* higiênico de equipamentos e a utilização de materiais fáceis de higienizar ou que diminuam a adesão bacteriana assumem grande importância.

O aço inoxidável é o material mais utilizado na fabricação de equipamentos para indústrias de alimentos, uma vez que apresenta propriedades mecânicas favoráveis, boa resistência à corrosão e custo acessível. Apesar de sua superfície lisa, vários tipos de aços inoxidáveis permitem a deposição de material orgânico, a adesão bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes.

Uma das melhores alternativas para o controle de biofilmes é prevenir a adesão e a posterior multiplicação microbiana, o que pode ser realizado através de diferentes técnicas de alteração da superfície do aço inoxidável. Essas técnicas podem alterar as características físico-químicas das superfícies através do uso de plasmas, *lasers*, feixes de íons e de elétrons, ou incorporação de substâncias antimicrobianas às superfícies metálicas. Nesse campo, o tratamento de nitretação a plasma e a implantação iônica de metais, como a prata ( $\text{Ag}^+$ ), podem ser utilizados nas superfícies de aços inoxidáveis, oferecendo um avanço significativo na qualidade e segurança dos alimentos.

O processo de nitretação a plasma é um tratamento termoquímico que promove modificações na composição química das superfícies metálicas, modificando várias propriedades físicas das peças tratadas, como energia livre da superfície, rugosidade e hidrofobicidade. Os poucos estudos existentes têm demonstrado redução no número de micro-organismos aderidos nas superfícies tratadas. No entanto, este tratamento altera apenas as propriedades de superfície, mantendo as demais características desejáveis dos materiais.

A implantação iônica consiste em introduzir espécies de elementos químicos em regiões relativamente próximas à superfície, ao mesmo tempo em que preserva o volume e as propriedades físico-químicas do material original. Dentre os elementos químicos incorporados, a prata (Ag) é o mais utilizado quando o objetivo

é a inativação microbiana, uma vez que apresenta baixo efeito tóxico para as células humanas.

Nos últimos anos, os materiais modificados superficialmente têm sido aplicados, principalmente, nas áreas da medicina e odontologia, porém ainda não nas indústrias de alimentos. No entanto, se superfícies de aço inoxidável forem alteradas, permitindo a redução da adesão microbiana e a inativação de microrganismos aderidos, essas podem ser estratégias promissoras para o aumento da segurança de alimentos.

Considerando estes fatos o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento de aço inoxidável AISI 304 com implantação iônica de  $\text{Ag}^+$  a baixas energias e com nitretação a plasma no controle da adesão e inibição de *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*.

## OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento de aço inoxidável AISI 304 com nitretação a plasma e implantação iônica de  $\text{Ag}^+$  a baixas energias no controle da adesão e inibição de *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*.

### 1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a adesão de *Salmonella* Enteritidis SE86 e *Listeria monocytogenes* J11 em superfície de aço inoxidável AISI 304 tratado por nitretação a plasma;
- Avaliar a adesão e a inibição de *Salmonella* Enteritidis SE86 e *Listeria monocytogenes* J11 em superfície de aço inoxidável AISI 304 tratado por implantação iônica de prata ( $\text{Ag}^+$ ) a baixas energias;
- Determinar as melhores condições dos tratamentos que propiciem a menor adesão e a maior redução de biofilmes bacterianos;
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos aços inoxidáveis tratados com o auxílio da técnica espectroscopia de emissão ótica por descarga luminescente (GD-OES);
- Avaliar a resistência térmica e a resistência a produtos químicos comumente utilizados em indústrias de alimentos dos melhores tratamentos identificados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Adesão microbiana e formação de biofilmes

Um biofilme é formado por um complexo ecossistema microbiológico altamente organizado, formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sejam bactérias, fungos e ou protozoários, pode existir de modo isolado ou em combinação, associados a seus produtos extracelulares, constituindo uma matriz de polímeros orgânicos, e se encontram aderidos a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica) (Davey & O'toole, 2000). Estima-se que mais de 90% dos micro-organismos vivam sob a forma de biofilmes na natureza (Bridier et al., 2015; Phillips et al., 2010; Stepanovic et al., 2004). As bactérias associadas em biofilmes são menos susceptíveis a agressões ambientais do que as bactérias encontradas em sua forma planctônica (Stewart, 2014).

A colonização microbiana e consequente formação de biofilmes são controladas por processos químicos, físicos e microbiológicos (Garrett et al., 2008). A adesão microbiana é a primeira etapa desse processo resulta no acúmulo de biomassa e materiais extracelulares na superfície de um substrato (Hori & Matsumoto, 2010; Kokare, 2009).

Sob determinadas condições, tais como a presença de matéria orgânica, o tipo e as propriedades do material, o pH, a temperatura do meio, a hidrofobicidade do micro-organismo e a presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), os micro-organismos aderem e interagem com as superfícies, iniciando a multiplicação celular (Bridier et al., 2015; Arciola et al., 2012; Monteiro et al., 2009). Essa multiplicação dá origem a microcolônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, estabelece-se o biofilme (Cieplik et al., 2014). O biofilme forma-se a partir da produção de EPS, o qual fica aderido às células (Behlau & Gilmore, 2010). Os EPS são compostos de carboidratos e proteínas, os quais são altamente hidratados (98% de água) e consistem principalmente de polissacarídeos, tendendo a ser a principal substância que permite a fixação dos micro-organismos à superfície (Flemming et al., 2011; Flemming & Wingender, 2010; Shi & Zhu, 2009). Segundo Costerton et al. (2003), o EPS é excretado para além das membranas externas das células Gram negativas e do peptidoglicano das Gram positivas. Esses polímeros envolvidos na aderência

das células dentro dos biofilmes podem agir como receptores de novas células, sendo importantes na adesão de colônias secundárias (Finn et al., 2013; Marques et al., 2007).

Na maior parte das superfícies sólidas, os biofilmes se formam com espessuras da ordem dos milímetros ou mesmo micrômetros (Xavier et al., 2005). A densidade populacional é um fator importante que influencia no desenvolvimento de um biofilme. O aumento da densidade populacional gera alterações na estrutura do biofilme, elevando a complexidade e a resistência microbiológica contra agressões externas (Stewart, 2014).

Segundo Andrade et al. (1998), para ser considerado um biofilme, são necessárias um mínimo de  $10^7$  células aderidas por  $\text{cm}^2$  de superfície. Por outro lado, Ronner e Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram como biofilme um número de células aderidas de  $10^5$  e  $10^3$  por  $\text{cm}^2$ , respectivamente.

Uma vez instalados, biofilmes microbianos são uma das principais causas de bloqueios mecânicos, impedimento de processos de transferência de calor, corrosão microbiologicamente induzida de componentes de sistemas metálicos e poliméricos (Gutiérrez et al., 2012). Em consequência, há perdas de energia e aumento nas despesas, acrescidas de manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos (Van Houdt & Michiels, 2010; Chmielewski & Frank, 2003).

Além disso, a adesão de patógenos às superfícies que entram em contato com os alimentos é uma das principais fontes de contaminação nas áreas de produção de alimentos, uma vez que os micro-organismos aderidos podem não ser inativados ou removidos pela higienização das superfícies, promovendo a contaminação cruzada e possibilitando a ocorrência de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (Bonsaglia et al., 2014; Shi & Zhu, 2009; Frank & Chmielewski, 2003).

## **2.2. Adesão microbiana às superfícies de materiais utilizados nas indústrias de alimentos**

Diversas bactérias patogênicas têm sido isoladas da superfície de equipamentos e utensílios utilizados em empresas de alimentos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella*

spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Kim et al., 2016; Yang et al., 2016; Gambino et al., 2015; Gauthier et al., 2015; Maurer et al., 2015; Casarin et al., 2014; Giaouris et al., 2013; Steenackers et al., 2011; Bong et al., 2009; Boari et al., 2009; Sharma & Anand, 2002). *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. são dois dos patógenos humanos mais graves que afetam a indústria de alimentos (Gauthier et al., 2015). Ambos têm a capacidade de aderir aos equipamentos e superfícies dentro das indústrias, aumentando, assim, o risco de contaminação cruzada do produto (Carpentier, 2011; Chia et al., 2009). Essa contaminação pode também contribuir para a formação de biofilmes, o qual pode resistir a processos de higienização, persistindo no ambiente. Esses dois micro-organismos foram identificados mundialmente como a causa de muitos surtos dispendiosos relacionados com o consumo de alimentos e são considerados pela indústria, como importantes agentes patogênicos que devem ser controlados (Gauthier et al., 2015).

*Salmonella* é um patógeno alimentar Gram-negativo e mesófilo, que tem sido identificado como o principal causador de DTA em vários países (Abdelhaseib et al., 2016; Forsythe, 2013; Giaouris et al., 2013; *European Food Safety Authority – EFSA*, 2011; Chia et al., 2009). Durante a última década, a salmonelose tem sido relatada como a doença de origem alimentar mais frequente no Brasil e é o principal agente causador de DTA no RS desde 1997 (Brasil, 2015; Tondo & Ritter, 2012; Mürmann et al., 2008; Oliveira et al., 2007; RS/DVS, 2006). Mais de 90% das cepas causadoras de salmoneloses alimentares no RS, de 1999 a 2008, foram sorotipificadas como *Salmonella* Enteritidis com o mesmo perfil genotípico (Oliveira et al., 2009). Segundo Casarin et al. (2015), Casarin et al. (2014) e Tondo et al. (2010), a *S. Enteritidis* adere ao polietileno, ao aço inoxidável e às soldas MIG (*Metal Inert Gas*) e TIG (*Tungsten Inert Gas*).

*Listeria monocytogenes* é um micro-organismo Gram-positivo, mesófilo, com características psicrótróficas (Doijad et al., 2015; Scallan et al., 2011; Gandhi & Chikindas, 2007; Wilks et al., 2006), que apresenta importância mundial como patógeno de alimentos, pois tem provocado diversos surtos com consequências graves (Carpentier & Cerf, 2011; Rivoal et al., 2010; Takahashi et al., 2009). Esse micro-organismo possui dose infectante baixa e pode causar altas taxas de mortalidade, variando de 20% a 30% (Szlavik et al., 2012; Buchanan et al., 2004).

Esse patógeno tem ganhado importância na última década devido à ocorrência de muitos surtos em todo o mundo (Zhao et al., 2013; Jensen et al., 2010; Goulet et al., 2008) e tem sido isolado em diversos locais dentro de indústrias de alimentos (Izquierdo et al., 2012; Carpentier & Cerf, 2011; Scallan et al., 2011; Berang et al., 2010; Ortiz et al., 2010; Bong et al., 2009). Muitas pesquisas têm demonstrado a capacidade dessa bactéria em aderir e formar biofilme em vidro, aço inoxidável e borracha (Casarin et al., 2015; Alonso et al., 2014; Casarin et al., 2014; Bonsaglia et al., 2014; Zhao et al., 2013; Chavant et al., 2002; Lunden et al., 2002; Chae & Schraft, 2000; Leriche & Carpentier, 2000).

Essas bactérias podem se aderir em um número considerável de materiais utilizados nas indústrias de alimentos, tais como aço inoxidável, vidro, ferro fundido, borracha, polipropileno, polietileno de baixa densidade e policarbonato (Olszewska et al., 2016; Yang et al., 2016; Goh et al., 2014; O'Leary et al., 2013; Malheiros et al., 2010; Tondo et al., 2010; Bong et al., 2009; Chia et al., 2009). Praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser colonizada por bactérias (Arciola et al., 2012; Characklis et al., 1981).

Sabe-se que os aços inoxidáveis são os materiais mais utilizados na fabricação de equipamentos e utensílios para o processamento de alimentos devido à sua resistência à corrosão e oxidação, por ter uma maior durabilidade, por ser de fácil fabricação e, também, por terem uma maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção quando comparados com cobre, alumínio e os polímeros (Hedberg et al., 2014; Chen et al., 2013). Os aços inoxidáveis são divididos de acordo com a sua microestrutura, sendo as principais as dos aços austeníticos, ferríticos e martensíticos. O que caracteriza cada um é a composição química, sendo a do austenítico composta basicamente por ferro, cromo e níquel. Os aços inoxidáveis com as especificações *American Iron and Steel Institute* (AISI) 304 e AISI 316 são os mais utilizados na fabricação dos mais diversos tipos de equipamentos para a indústria de alimentos (Martins et al., 2014). A liga 304 de aço inoxidável é um aço austenítico, pois possui um mínimo de 18% de cromo, 8% de níquel e até 0,08% de carbono (Martins et al., 2014; Baddoo, 2008). O que essencialmente distingue o tipo de aço inoxidável 316 do AISI 304 é a adição de molibdênio. Esse componente aumenta a resistência à corrosão em vários ambientes (salmouras, branqueamento, fluidos biológicos, etc.), e, em particular, reduz ou inibe a corrosão localizada

induzida por cloretos (Martins et al., 2014). Apesar dessa maior resistência química, o custo mais elevado do AISI 316 faz com que esse aço seja menos utilizado na fabricação de equipamentos para alimentos, tornando o aço inoxidável tipo 304 o mais utilizado pelos fabricantes de equipamentos para indústria alimentícia (Sinde & Carballo, 2000).

A microtopografia dos aços inoxidáveis demonstra a presença de ranhuras e fendas, ao contrário de sua aparência macroscópica (Bonsaglia et al., 2014; Malheiros et al., 2010; Andrade, 2008; Garrett et al., 2008; Chae & Scharaft, 2000). Em virtude disso, e outras propriedades, diversos estudos têm demonstrado a adesão e formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável (Casarin et al., 2016; Casarin et al., 2014; Arciola et al., 2012; Fernebro et al., 2011; Monteiro et al., 2009; Whitehead et al., 2006).

### **2.3. Fatores que influenciam na adesão microbiana**

A adesão de micro-organismos nas superfícies é influenciada por fatores como: a fase metabólica da célula, a presença de matéria orgânica, o tipo e as propriedades do material, o pH, a temperatura do meio, a hidrofobicidade do micro-organismo e a presença de EPS (Jakubovics et al., 2010; Van Houdt & Michiels, 2010; Simões et al., 2010; Widgerow et al., 2008; Palmer et al., 2007).

A hidrofobicidade celular pode afetar a taxa e a extensão da adesão microbiana nas superfícies, já que interações hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza não polar das superfícies envolvidas na etapa de adesão (Simões et al., 2010). Dessa forma, as superfícies hidrofóbicas parecem propiciar a colonização, provavelmente porque essas superfícies favorecem a aproximação do micro-organismo pela eliminação da camada de água presente na interface (Zeraik & Nitschke, 2010). Para a maior parte dos micro-organismos, a taxa de adesão em superfícies sólidas aumenta com o aumento da hidrofobicidade da superfície e, sendo assim, a diminuição da hidrofobicidade pode diminuir a adesão de micro-organismos (Nitschke et al., 2009; Shakerifard et al., 2009).

A presença de estruturas celulares como flagelo, pili ou glicocálix pode auxiliar no processo de adesão dos micro-organismos nas superfícies (Simões et al., 2010). Isso se deve ao fato da célula microbiana, uma vez aderida à superfície, ter a capacidade de superar a força repulsiva comum a todos os materiais, e, assim,

essas estruturas celulares habilitam a célula a aderir e permanecer fixa (Dolan & Costerton, 2002). As propriedades aderentes da célula são influenciadas pelo envelope celular, cuja química se altera de acordo com estímulos ambientais (Totorá, 2013; Van Houdt & Michiels, 2010).

A disponibilidade de nutrientes tem grande influência na estrutura do biofilme e na composição da comunidade microbiana (Chmielewski & Frank, 2003). A aderência em superfícies durante a limitação de nutrientes pode ser uma forma de sobrevivência da célula microbiana (Jakubovics et al., 2010). Sendo assim, a limitação de nutrientes e água é fundamental na formação dos biofilmes na indústria de alimentos (Chmielewski & Frank, 2003).

A microtopografia da superfície também é importante, pois pode favorecer a adesão bacteriana, particularmente se a superfície apresentar canais fundos, ranhuras e fendas (Bonsaglia et al., 2014; Marques et al., 2007; Chavant et al., 2002).

#### **2.4. Estratégias para controle da adesão bacteriana e formação de biofilmes**

Nas últimas duas décadas, tem sido observado um grande avanço nas pesquisas para reduzir a adesão ou inibir as bactérias presentes em superfícies que entram em contato com alimentos. Existem alternativas que vêm sendo estudadas para o controle da adesão e formação de biofilmes e umas dessas estratégias é a alteração de propriedades físico-químicas das superfícies para diminuir a adesão microbiana inicial (Casarin et al., 2016; Trentin et al., 2014). Outra estratégia é a utilização de agentes antimicrobianos incorporados nas superfícies, os quais provocam a morte das células bacterianas presentes nesta superfície (Maurrer et al., 2015; Greulich et al., 2012).

Dentre os métodos de controle da adesão e formação de biofilmes, podem ser citados os que utilizam enzimas com o objetivo de degradar a matriz de EPS envolvida na adesão e na integridade estrutural do biofilme (Jabbouri & Sadovskaya, 2010; Lequette et al., 2010); o uso de bacteriófagos que proporcionam a ação lítica e tem a capacidade de induzir a síntese de enzimas capazes de degradar polímeros (Simões et al., 2010); utilização de compostos naturais extraídos de plantas aromáticas que podem exercer um elevado nível de atividade letal contra agentes patogênicos e serem eficientes em penetrar a estrutura de um biofilme

(Nostro et al., 2007); a incorporação de agentes antimicrobianos, como sais de quaternário de amônio, antibióticos sintéticos, nanopartículas e íons metálicos (Baier et al., 2013; Lemire et al., 2013; Froehling et al., 2012; Hajipour et al., 2012); e a alteração das características físico-químicas das superfícies através do uso de plasmas, *lasers*, feixes de íons e feixes de elétrons (Casarin et al., 2016; Trentin et al., 2014, Poncin-Epaillard et al., 2013; Alves Jr., 2001).

## **2.5. Alteração de superfícies utilizando nitretação a plasma**

A nitretação por plasma é um processo de tratamento termoquímico que promove modificações na composição química das superfícies metálicas, que consiste em endurecimento superficial pela incorporação de nitrogênio, formando, geralmente, uma camada de nitretos na superfície do material (Allestein, 2011; Araújo et al., 2007). No processo, a amostra é bombardeada pelas espécies do plasma (espécies excitadas, íons, átomos e moléculas) produzidas por uma descarga elétrica, em regime anormal, em mistura gasosa, normalmente constituída de N<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (Krauss, 1990). Essa técnica é empregada com o propósito de aumentar a resistência a desgaste, fadiga, corrosão, e melhora da resistência superficial ao calor (Moskalioviene et al., 2011; Kaestner et al., 2008). No entanto, as propriedades como hidrofobicidade, molhabilidade e permeabilidade também podem ser modificadas (Wang et al., 2009; Zhao et al., 2008), sendo a alteração da hidrofobicidade a de maior importância com referência à prevenção da adesão bacteriana. Muitos estudos mostraram a influência da hidrofobicidade das superfícies e das células na adesão microbiana e pesquisas têm demonstrado redução no número de micro-organismos aderidos nas superfícies tratadas por plasma (Poncin-Epaillard et al., 2013; Hung et al., 2012; Kim et al., 2003).

A modificação da superfície por plasma apresenta vantagens como custo relativamente baixo, que corresponde a aproximadamente R\$10,00/kg de aço, dependendo do tamanho, da geometria e da quantidade de peças que podem ser colocadas de uma só vez dentro do reator. Além de ser um tratamento que respeita o ambiente, tem aplicabilidade a diversos materiais de formatos complexos, alterando apenas as propriedades da superfície e preservando características favoráveis dos materiais (Trentin et al., 2014). A baixa pressão utilizada na modificação da superfície por nitretação a plasma tem demonstrado uma vasta

gama de aplicações em materiais (Kim et al., 2003), como aços inoxidáveis, principalmente para melhorar a dureza da superfície, dando resistência à corrosão (Moskaliuviene et al., 2011; Kaestner et al., 2008; Li et al., 2008). Outros estudos têm demonstrado que as superfícies modificadas por plasma podem apresentar hidrofobicidade alterada, evitando ou diminuindo a fixação bacteriana (Casarin et al., 2015; Trentin et al., 2014; Dong et al., 2011).

Casarin et al. (2016) observaram redução no número de *Salmonella* Enteritidis e *L. monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 e 316 utilizado em equipamentos na indústria de alimentos, após nitretação a plasma. Poncin-Epaillard et al. (2013) também obtiveram redução no número de células de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em polipropileno e poliestireno utilizados em materiais médicos, após o tratamento com plasma. Considerando tais características, essa tecnologia pode ser útil para tratar as superfícies de aço inoxidável utilizadas em equipamentos das indústrias de alimentos.

## **2.6. Alteração de superfícies utilizando implantação iônica de Ag<sup>+</sup> a baixas energias**

A implantação iônica é um processo caracterizado pela transferência de massa, por meio do bombardeamento de um material com átomos ou moléculas ionizadas com energia suficiente para penetrar além das camadas superficiais do material-alvo (Seidel, 1983). Resumidamente, é um processo em que íons são acelerados em direção a uma superfície-alvo e todo o processo ocorre em alto vácuo para garantir a pureza do feixe implantado (Oliveira, 2007; Dearnaley, 1974). Esses íons formam um feixe energético de uma determinada espécie química e é extraído de uma fonte, em seguida purificado por um analisador de massa (espectrômetro), acelerado a uma determinada velocidade por um campo elétrico, direcionado por lentes eletrostáticas e, por fim, incidido em uma superfície-alvo.

Durante muitos anos, a implantação iônica foi direcionada ao processo químico de *dopping* (adição de íons) de semicondutores, especialmente silício, que ainda hoje é de grande interesse para a indústria eletrônica (Pesenti, 2004). Depois dos dispositivos microeletrônicos, a segunda maior categoria em que há modificação de superfícies empregando processos com feixes iônicos é a de biomateriais (Feng

et al., 2006) médicos ou odontológicos (Tang et al., 2007a). Entre essas superfícies, incluem-se metais, cerâmicas, vidros e polímeros (Feng et al., 2006).

Posteriormente, a implantação iônica também foi utilizada no estudo de alterações de materiais metálicos, principalmente para reduzir corrosão e oxidação dos mesmos (Rangel & Paiva, 1996; Williams et al., 1991) e para reduzir a carga microbiana, como, por exemplo, em superfícies de aço inoxidável (Zhao et al., 2008; Wan et al., 2007; Dan et al., 2005), titânio (Wan et al., 2007) e poli (etileno) (Li et al., 2007).

A implantação iônica consiste em introduzir espécies de elementos químicos em regiões relativamente próximas à superfície, ao mesmo tempo em que preserva o volume e as propriedades físico-químicas do material original (Lemire et al., 2013; Jain & Agarwal, 2011). Tais elementos, como prata ( $\text{Ag}^+$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), ouro ( $\text{Au}^+$ ), zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e estanho ( $\text{Sn}^+$ ), apresentam ação contra uma ampla faixa de microorganismos. Dentre os elementos químicos incorporados, a prata ( $\text{Ag}^+$ ) é o mais utilizado quando o objetivo é a redução microbiana, uma vez que não apresenta efeito tóxico para as células humanas quando utilizada em baixas concentrações, em comparação com os outros íons de metais pesados (Goh et al., 2014; Martínez-Abad et al., 2014a; Rai et al., 2009; Percival et al., 2005). Portanto, uma grande variedade de materiais utilizados na vida diária tem sido recentemente incorporada com sais de prata ou prata como componente-chave para controlar a multiplicação microbiana, que vão desde tecidos para roupas (Yuranova et al., 2003), revestimentos de aço inoxidável em eletrodomésticos (Kampmann et al., 2008) e materiais de contato com alimentos (Bouwmeester et al., 2009; Galeano et al., 2003). Entretanto, o mecanismo de ação dos íons de prata não está totalmente elucidado (Rai et al., 2009; Li et al., 2008). Segundo Kulthong et al. (2010) e Feng et al. (2000), íons  $\text{Ag}^+$  são capazes de interagir com grupos tióis de proteínas, o que resulta na inativação de enzimas respiratórias do metabolismo microbiano e conduzem à síntese de espécies de oxigênio reativas. Outro estudo também demonstrou que os íons  $\text{Ag}^+$  evitam a replicação do DNA e afetam a estrutura e permeabilidade da membrana celular (Krishnan et al., 2015; Bovenkamp et al., 2013). Diferentemente dos antibióticos, que têm sítio de ação específico e são empregados em concentrações próximas à inibitória mínima (MIC), os biocidas, como a prata, apresentam espectro de ação mais amplo, atingindo muitos alvos na

célula microbiana para sua ação antimicrobiana e são empregados em concentrações superiores à mínima dose inibitória. Por isso, a resistência à sua ação é bem menor do que a encontrada para os antibióticos (Taglietti et al., 2014; Percival et al., 2005). Em concentrações entre ( $10^{-9}$  e  $10^{-6}$ ) mol.L<sup>-1</sup>, íons Ag<sup>+</sup> são efetivos contra bactérias, fungos e vírus (Russel & Hugo, 1994).

Nos EUA, o Centro de Segurança de Alimentos e Nutrição Aplicada, da *Food and Drug Administration* (FDA/CFSAN), aceita o uso de nitrato de prata como aditivo alimentar em águas engarrafadas e, na UE, a prata é aceita nos termos da Diretiva 94/36/CE como corante (E-174), sem restrições (Martínez-Abad et al., 2014b). Além disso, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) emitiu pareceres positivos para zeólitos de prata, fosfatos de zircônio e prata em sua lista provisória de aditivos para materiais em contato com alimentos apresentando uma restrição geral de  $\leq 0,05$ mg/kg de alimento (EFSA, 2006). Independentemente dos regulamentos, a prata continua sendo o aditivo antimicrobiano mais amplamente utilizado em aplicações alimentares (Martínez-Abad et al., 2014b; Appendini & Hotchkiss, 2002; Quintavalla & Vicini, 2002).

Segundo Lansdown (2007) e Venugopal e Luckey (1978), os valores de dose letal (DL50) oral para a ingestão de prata coloidal e nitrato de prata, em camundongos, foram de 100 mg.kg<sup>-1</sup> e 129 mg.kg<sup>-1</sup>. A dose de referência (RfD), quando em exposições crônicas e subcrônicas, é de 0,005 mg/kg/dia, sendo calculada a partir do menor efeito adverso observado (LOAEL) de 0,014 mg/kg/dia, em pacientes que receberam injeções de arsfenamina de prata.

Chiang et al. (2010) demonstraram que a implantação de Ag<sup>+</sup> no aço inoxidável pode inibir bactérias. Segundo esse autor a inibição de bactérias nas superfícies com Ag<sup>+</sup> deve-se à liberação de níveis tóxicos de Ag<sup>+</sup> da superfície, que pode destruir as paredes celulares e membranas celulares das bactérias, inibindo a sua reprodução. O mesmo estudo comparou o efeito de Ag<sup>+</sup> implantada no aço inoxidável e da Ag em pó. As amostras tratadas com as duas formas de Ag foram colocadas em solução de caldo nutriente com uma concentração de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *E. coli*. Os autores verificaram que nas duas formas a Ag<sup>+</sup> tiveram um alto efeito na redução bacteriana. Além disso, Chen et al. (2013) demonstraram que Ag<sup>+</sup> implantada no aço inoxidável se mantém com boa atividade antibacteriana (> 90%) por no mínimo um ano em exposição ao ar ou à água da torneira.

A implantação iônica é uma técnica promissora, pois apresenta confiabilidade e reprodutibilidade. Na técnica de implantação iônica convencional, os íons são tipicamente acelerados a energias da ordem de 10 a 500 keV, sendo que essa técnica apresenta limitações porque não pode ser aplicada em larga escala industrial. Isso porque a área superficial implantada é de apenas 4 cm<sup>2</sup> e o tempo de duração de 12 a 14 horas (Jain & Agarwal, 2011). No entanto, o método de implantação iônica a baixa energia, em um equipamento de *Ion Plating*, apresenta vantagens em comparação com o método convencional, tais como: alto grau de ionização, baixas energias de polarização (< 4 keV) na etapa de aceleração dos íons, redução no tempo de processo (menos do que 1 hora) e aumento da área superficial do material a ser modificado (cerca de 200 cm<sup>2</sup>). A versatilidade desse equipamento permite que o processo seja realizado em escala industrial, sem restrições, com um custo aproximado de R\$ 0,90 a R\$ 1,00 por cm<sup>2</sup> tratado (Echaverrigaray, 2014; Pezzagna & Meijer, 2012). Além disso, estudos indicaram que menos bactérias aderiram à superfície de aço inoxidável tratado com Ag<sup>+</sup> (Chen et al., 2013; Chiang et al., 2010; Liao et al., 2010).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Bactérias utilizadas

Dois patógenos alimentares foram utilizados neste estudo, um Gram-negativo e outro Gram-positivo. Eles estão descritos abaixo:

- *Salmonella* Enteritidis (SE86), isolada de repolho envolvido em surto alimentar no Rio Grande do Sul (Tondo & Ritter, 2012);
- *Listeria monocytogenes* (J11), isolada de abatedouro frigorífico com inspeção federal (SIF) do Rio Grande do Sul.

#### 3.2. Preparações dos inóculos

Para a preparação dos inóculos, *S. Enteritidis* SE86 foi cultivada em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (OXOID, Basingstoke, England), a 37°C, por aproximadamente 18 horas, e *L. monocytogenes* foi cultivada em BHI adicionado de 0,6% de extrato de levedura (OXOID, Basingstoke, England), incubado a 37°C, por aproximadamente 30 horas. Ambas foram diluídas em água peptonada 0,1% até  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, imediatamente antes da contaminação dos corpos de prova.

#### 3.3. Elaboração dos corpos de prova

Os corpos de prova de aço inoxidável AISI 304 foram elaborados pela Metalúrgica Ralf Winter (Alvorada, RS). Os corpos de prova passaram por acabamento superficial, realizado pelos fabricantes e apresentavam superfícies polidas, lisas e brilhantes. Eles foram cortados nas dimensões de 2,0cm x 2,0cm e 0,20cm (espessura). A limpeza dos mesmos foi realizada por imersão em acetona P.A. (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), em banho ultrassônico, durante 30 minutos. Em seguida, os corpos de prova foram submetidos aos tratamentos de modificação superficial, descritos a seguir.

#### 3.4. Tratamento de nitretação a plasma

Os corpos de prova de aço inoxidável foram tratados utilizando o equipamento de nitretação a plasma do Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamento Térmico (LESTT) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). A nitretadora

é composta por uma câmara de vácuo com 250mm de diâmetro e 400mm de altura, um sistema de vácuo e uma fonte de potência.

As amostras foram tratadas em bateladas de duas amostras cada e o processo se deu em duas etapas. A primeira consistiu em uma limpeza da superfície por *etching* a plasma, utilizando argônio (Ar<sup>+</sup>) e hidrogênio (H<sub>2</sub>) por 30min; com a finalidade de remover possíveis óxidos ainda existentes e a camada externa passiva característica dos aços inoxidáveis. Na segunda etapa, foi realizada a nitretação, utilizando uma mistura de gases contendo H<sub>2</sub> e nitrogênio (N<sub>2</sub>), variando a composição de gases, o tempo de tratamento e a fonte de potência de rádio frequência (RF) ou corrente contínua (DC), conforme descrito na Tabela 1. Ambos os lados das amostras foram tratados ao mesmo tempo. Os tratamentos mostrados na Tabela 1 referem-se aos utilizados em uma seleção inicial das amostras com diversas variações, para obter tratamentos com melhores taxas de redução bacteriana.

Após o tratamento, as amostras foram removidas da câmara de vácuo e imediatamente armazenadas numa embalagem que não foi aberta até a realização dos testes microbiológicos e de caracterização da superfície.

Tabela 1 – Tratamentos de nitretação a plasma com diferentes condições (potência, tempo, composição dos gases e temperatura) utilizados na seleção inicial das amostras

Tratamento	Etching				Nitretação			
	Potência	tempo (min)	Composição	Temperatura	Potência	Composição	tempo (min)	Temperatura
1	DC 50W	30	90% Ar + 10% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	95% N <sub>2</sub> + 5% H <sub>2</sub>	90	>600°C
2	RF 100W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	70% N <sub>2</sub> + 20% H <sub>2</sub> + 10% AR	90	~210°C
3	DC 50W	30	90% Ar + 10% H <sub>2</sub>	>600°C	RF 100W	10% N <sub>2</sub> + 90% H <sub>2</sub>	120	~210°C
4	RF 100W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	90% N <sub>2</sub> + 10% H <sub>2</sub>	50	>600°C
5	DC 50W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	100 N <sub>2</sub>	90	>600°C
6	0	0	0	0	DC 50W	80% N <sub>2</sub> + 20% H <sub>2</sub>	60	~195°C
7	DC 50W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	0	0	0	0
8	0	0	0	0	RF 100W	90% N <sub>2</sub> + 10% H <sub>2</sub>	50	~195°C
9	RF 100W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	80% N <sub>2</sub> + 20% H <sub>2</sub>	60	~195°C
10	RF 100W	30	90% Ar + 10% H <sub>2</sub>	>600°C	RF 100W	77% N <sub>2</sub> + 23% H <sub>2</sub>	120	~210°C
11	DC 50W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	95% N <sub>2</sub> + 5% H <sub>2</sub>	90	>600°C
12	RF 100W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	0	0	0	0
13	DC 50W	30	90% Ar + 10% H <sub>2</sub>	>600°C	RF 100W	10% N <sub>2</sub> + 90% H <sub>2</sub>	240	~210°C
14	RF 100W	30	95% Ar + 5% H <sub>2</sub>	>600°C	RF 100W	23% N <sub>2</sub> + 77% H <sub>2</sub>	40	~195°C
15	DC 50W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	RF 100W	23% N <sub>2</sub> + 77% H <sub>2</sub>	60	~195°C
16	RF 100W	30	90% Ar + 10% H <sub>2</sub>	>600°C	RF 100W	40 %N <sub>2</sub> + 60% H <sub>2</sub>	80	~210°C
17	RF 100W	30	80% Ar + 20% H <sub>2</sub>	>600°C	DC 50W	80% N <sub>2</sub> + 20% H <sub>2</sub>	240	>600°C

Notas: Ar+ = argônio  
H<sub>2</sub> = hidrogênio  
N<sub>2</sub> = nitrogênio

DC = corrente contínua  
RF = rádio frequência

### 3.5. Tratamento de implantação iônica de prata (Ag<sup>+</sup>) a baixas energias

O processo de Implantação Iônica a Baixas Energias (IIBE) utilizado neste trabalho foi realizado em um equipamento do tipo *Ion Plating diversified* (Echeverrigaray, 2014; Chen et al., 2013; Feng & Chu, 2006). Esse equipamento foi projetado, construído e adaptado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos (LESTT) da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

O equipamento é composto por uma câmara de vácuo, construída em aço inoxidável AISI 304, com diâmetro de 600mm e altura de 900mm, um sistema de alto vácuo e um painel de controle.

O método foi escolhido por permitir que as modificações químicas e físicas promovidas pelas espécies implantadas ocorram em regiões próximas à superfície tratada (ASTM A 240, 2012). Além disso, existe a possibilidade de se utilizar esse processo na indústria, uma vez que diversas empresas possuem equipamentos de *Ion Plating* que poderiam ser facilmente adaptáveis para implantação a baixas energias.

Resumidamente, o porta-amostras, que permite acomodar até cinco corpos de prova, foi acondicionado na câmara de vácuo e o sistema evacuado até uma pressão de base de  $1 \times 10^{-7}$  mbar. Durante o processo de implantação, a pressão foi mantida em  $5 \times 10^{-7}$  mbar. O metal de implantação (Ag<sup>+</sup>) utilizado estava em forma de *pellets*, com pureza de 99,9%, fornecido pela empresa Kurt J. Lesker Company (Estados Unidos). A ventilação da câmara, assim como o resfriamento das amostras, foi feita com gás nitrogênio comercial (AirProduct, Guaíba, Brasil). A dose implantada de prata foi de  $3 \times 10^{16}$  átomos/cm<sup>2</sup>.

O resumo das condições do processo de implantação iônica a baixas energias utilizadas para cada amostra está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições do processo de implantação iônica de Ag<sup>+</sup> a baixas energias aplicados aos corpos de prova de aço inoxidável AISI 304

Parâmetros de implantação		
	Tratamento 1	Tratamento 2
Tensão na fonte de elétrons (kV)	6	6
Corrente de emissão (mA)	25	25
Corrente do filamento (A)	15,1	15,1
Energia de aceleração dos íons (BIAS) (keV)	4	2
Tempo (min)	60	60

Após o tratamento, os corpos de prova foram removidos da câmara de vácuo e imediatamente armazenados numa embalagem individual identificada, a qual não foi aberta até a realização dos testes microbiológicos e de caracterização da superfície.

### 3.6. Simulação das trajetórias e perdas de energia dos íons implantados

As simulações das trajetórias e perdas de energia dos íons foram realizadas nos corpos de prova tratados por implantação iônica de prata (Ag<sup>+</sup>) a baixas energias através do programa *Stopping and Range of Ion in Matter* - (SRIM 2013), pelo método de Monte Carlo. A simulação foi baseada nas aproximações da trajetória, e do perfil de profundidade/concentração dos íons implantados.

As informações resultantes da simulação de Monte Carlo guiaram a execução prática de implantação de íons Ag<sup>+</sup> em aço inoxidável, onde o objetivo foi assegurar que os resultados recebidos pela simulação pudessem ser confiáveis à amostra caracterizada.

### 3.7. Determinação do perfil de profundidade das superfícies tratadas

Os perfis dos elementos químicos constitutivos em profundidade nas amostras tratadas por implantação iônica de prata e por nitretação a plasma foram obtidos pela técnica de GD-OES, utilizando o equipamento da marca Horiba Scientific, modelo GD-Profilers 2, do Laboratório de Propriedades Nanomecânicas (LPN) da UCS. As medidas foram realizadas a uma pressão de 650 Pa, por bombardeamento de íons argônio (Ar<sup>+</sup>) em função do tempo de pulverização com uma potência-RF de 15W (Echeverrigaray, 2014).

A caracterização por GD-OES foi realizada porque viabiliza uma análise qualitativa, representando um perfil de profundidade para os elementos que

compõem as amostras. Os perfis revelados dos elementos químicos presentes na amostra a uma determinada profundidade foram estabelecidos pela tensão aplicada e o tempo de ensaio (tempo de pulverização).

### **3.8. Preparação dos corpos de prova**

Previamente aos ensaios de adesão bacteriana, os corpos de prova foram autoclavados a 121°C, por 15 minutos, e, então, secos a 60°C, por 2 horas (adaptado de Rossoni & Gaylarde, 2000). Os corpos de prova foram mantidos em frascos estéreis individuais e identificados para cada corpo de prova, em temperatura ambiente, até o momento dos experimentos.

### **3.9. Tratamento de desoxidação**

O tratamento de desoxidação foi realizado nas amostras implantadas com prata, a fim de reduzir a ação do oxigênio sobre esse elemento químico. Isso foi realizado para preservar a ação bactericida da  $Ag^+$ , pois a energia de ligação não permite que a  $Ag^+$  se ionize tão facilmente.

Os corpos de prova de aço inoxidável, sem e com a incorporação de íons  $Ag^+$ , foram adicionados a tubos contendo uma solução à base de hidróxido de sódio (15% de acetona e 85% de NaOH 0,1 M). Em seguida, eles foram submersos na solução e, então, aquecidos em banho-maria, durante 15 minutos, com os tubos destampados. Depois disso, os corpos de prova foram retirados dos tubos com auxílio de uma pinça e foram secos com papel toalha não reciclável (Echeverrigaray, 2014).

### **3.10. Contaminação experimental dos corpos de prova e avaliação da adesão bacteriana**

Os corpos de prova tratados por nitretação a plasma foram imersos em 100mL de caldo BHI (OXOID) contendo culturas individuais das bactérias na concentração de aproximadamente  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em temperatura ambiente, por uma hora. Os corpos de prova tratados pela implantação iônica foram contaminados da mesma maneira, porém mantidos em contato com a cultura por uma hora para avaliar a inibição bacteriana e também 24 horas para avaliar as células em biofilme (adaptado de Kusumaningrum et al., 2003).

Em seguida, os corpos de prova foram lavados com 1mL de água destilada estéril para remover as células pouco aderidas. Posteriormente foram imersos em 25mL de água peptonada 0,1% e imediatamente tratados em banho ultrassônico, por 10 minutos, para que as células aderidas se soltassem da superfície (Sinde & Carballo, 2000). Diluições decimais da solução de cada corpo de prova foram preparadas, sendo que 20µL das mesmas foram semeados em TSA (Tryptic Soy Agar, OXOID, Basingstoke, England) e TSA adicionado de 0,6% de extrato de levedura (para *S. Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente), pelo método da gota (Milles & Misra, 1938, da Silva et al., 2010) e então incubados a 37°C, por 18h e 48h, para *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*, respectivamente, para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (Casarin et al., 2014).

A taxa de redução bacteriana foi determinada pela seguinte equação (Lin et al., 2011):

$$RB(\%) = \frac{100(N1 - N2)}{N1}$$

Onde: N1, número de bactérias aderidas nas superfícies não tratadas e N2, número de bactérias aderidas nas superfícies tratadas.

Os experimentos foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes.

### **3.11. Avaliação da resistência térmica dos melhores tratamentos**

Os corpos de prova tratados por nitretação a plasma que demonstraram as maiores reduções bacterianas foram submetidos a testes no intuito de avaliar a resistência dos tratamentos a temperaturas elevadas, normalmente utilizadas nas empresas de alimentos. A resistência térmica do tratamento foi avaliada submetendo os corpos de prova à temperatura de 121°C, por 15 minutos, sendo, em seguida, realizada a avaliação da adesão bacteriana, conforme descrito no item 3.10.

### **3.12. Avaliação da resistência dos tratamentos a produtos químicos utilizados na higienização de indústrias de alimentos**

Os corpos de prova tratados por nitretação a plasma foram colocados em contato com hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, nas concentrações e tempos recomendados pelos fabricantes (hipoclorito de sódio: 400ppm de cloro ativo, 0,5% = 5g.L<sup>-1</sup>, por 4 min e hidróxido de sódio 0,8% = 8g.L<sup>-1</sup>, por 4 min). Os produtos também foram testados em uma concentração duas vezes maior do que a recomendada pelo fabricante e com o dobro de tempo de exposição (800ppm de cloro ativo, 1,0% = 10g.L<sup>-1</sup>, por 8 minutos, e concentração de 1,6% = 16g.L<sup>-1</sup>, por 8 minutos, respectivamente), sendo, em seguida, enxaguados com 1mL de água destilada, secos com papel toalha não reciclado e então realizada a avaliação da adesão bacteriana, conforme descrito no item 3.10. Os testes foram realizados em duplicata e no mínimo duas repetições para cada bactéria.

### **3.13. Análise estatística**

Para a avaliação estatística dos dados obtidos com os testes de adesão (UFC.cm<sup>-2</sup>), os valores foram convertidos em log<sub>10</sub> UFC. Em todos os casos, amostras em duplicata foram utilizadas e o experimento repetido pelo menos duas vezes. Para analisar os dados obtidos com os testes de adesão, foi realizada análise de variância com o *software* SPSS versão 21 e utilizado Teste de *Turkey's* para comparar as médias, e uma p<0,05 foi considerada estatisticamente significativa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Influência do tratamento de nitretação a plasma na adesão de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*

A Tabela 3 apresenta as taxas de redução dos micro-organismos estudados, onde se observa que, para *S. Enteritidis*, essas foram maiores ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos a plasma 1, 6, 8, 11 e 14 (69,7% a 90%). Já para *L. monocytogenes*, as amostras dos tratamentos a plasma mais eficazes na redução da taxa microbiana ( $p < 0,05$ ) foram as 3, 13, 14, 15 e 16 (68,7% a 84%). Também foi observado que os tratamentos que tinham apenas uma etapa (*etching* ou nitretação) não apresentaram boas reduções para as duas bactérias (25%, 34%, 14% e 28%) (Tabela 3). O tratamento de *etching* consiste na remoção da camada estável de óxido de cromo da superfície, através de uma “limpeza” realizada dentro da própria câmara de nitretação. Essa remoção permite a difusão do nitrogênio, facilitando o processo de nitretação a plasma (Dos Reis et al., 2008).

Tabela 3 – Taxas de redução para *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável AISI 304 submetidas a diferentes condições de tratamento por nitretação a plasma

Tratamento	Taxa de redução (%)	
	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Plasma 1	82,50 ± 1,77 *	56,50 ± 7,68
Plasma 2	33,00 ± 10,61	0,00
Plasma 3	55,94 ± 2,21	84,00 ± 1,77 *
Plasma 4	64,06 ± 7,03	0,00
Plasma 5	58,44 ± 4,86	0,00
Plasma 6	80,62 ± 7,95 *	0,00
Plasma 7	34,38 ± 4,42	28,75 ± 5,30
Plasma 8	69,70 ± 1,33 *	0,00
Plasma 9	27,30 ± 5,71	21,42 ± 3,30
Plasma 10	36,40 ± 8,57	54,3 ± 6,16
Plasma 11	90,00 ± 6,53 *	35,71 ± 10,51
Plasma 12	25,00 ± 5,36	14,28 ± 2,20
Plasma 13	58,00 ± 12,02	81,2 ± 7,86 *
Plasma 14	81,40 ± 0,00 *	81,6 ± 2,57 *
Plasma 15	37,10 ± 0,00	74,6 ± 1,28 *
Plasma 16	43,50 ± 6,15	68,75 ± 0,00 *
Plasma 17	46,00 ± 4,14	65 ± 6,43

(\*) houve diferença significativa, quando comparado o aço inoxidável AISI 304 tratado com o aço inoxidável AISI 304 sem tratamento. Nota: as condições dos tratamentos estão descritas na Tabela 1 dos Materiais e Métodos.

Após uma triagem inicial, na qual 17 diferentes tratamentos a plasma foram testados (Tabela 1), variando principalmente o tempo, a temperatura e a composição dos gases, os tratamentos 1, 3, 13 e 14 apresentaram maiores taxas de redução (>55%) para as duas bactérias avaliadas (Tabela 3). Logo, esses tratamentos foram selecionados para serem reproduzidos e testados novamente.

As Figuras 1, 2, 3 e 4 mostram o perfil de profundidade qualitativa de  $N_2$  e os principais constituintes do aço inoxidável, por exemplo, Ferro (Fe), Cromo (Cr), Níquel (Ni). Com base nesses resultados, pode-se observar que o  $N_2$  foi incorporado em todos os substratos. A quantidade de  $N_2$  é mostrada em detalhe nas inserções das Figuras 1, 2, 3 e 4, onde se observa que a maior quantidade de  $N_2$  está concentrada a alguns nanômetros acima da superfície e diminuiu ao longo da profundidade.

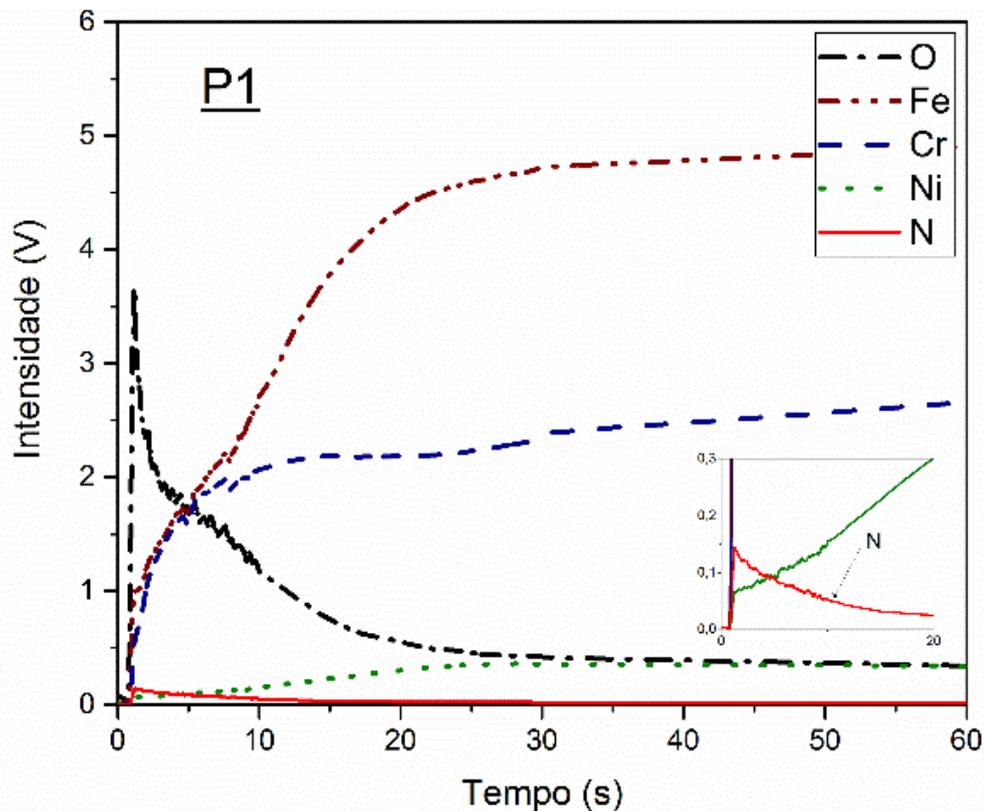


Figura 1 – Perfil de implantação de  $N_2$  na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 1) e seus principais constituintes

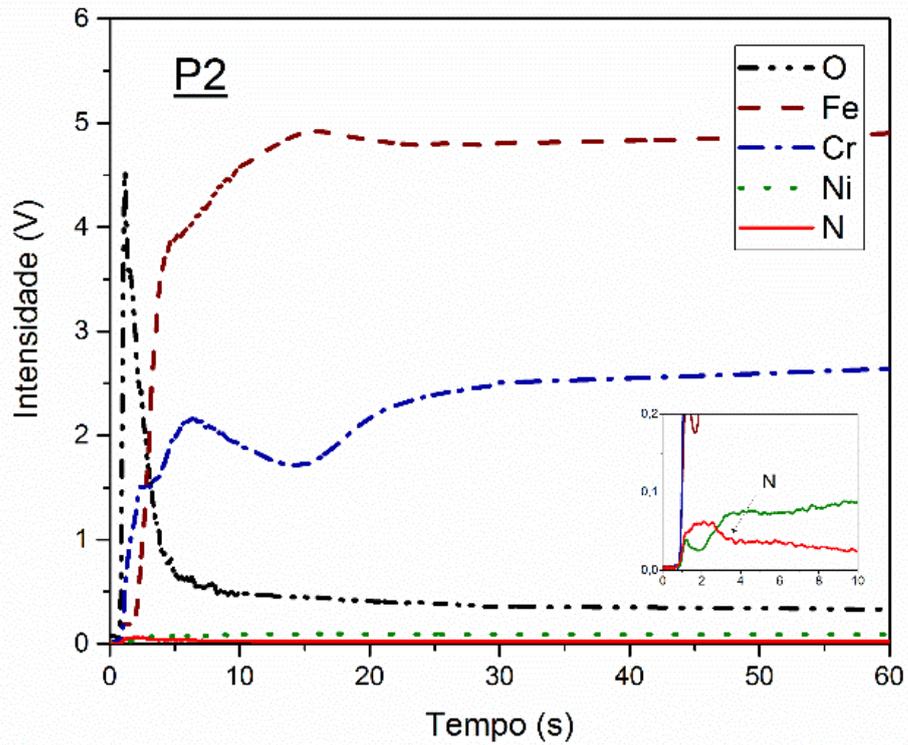


Figura 2 – Perfil de implantação de N<sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 3) e seus principais constituintes

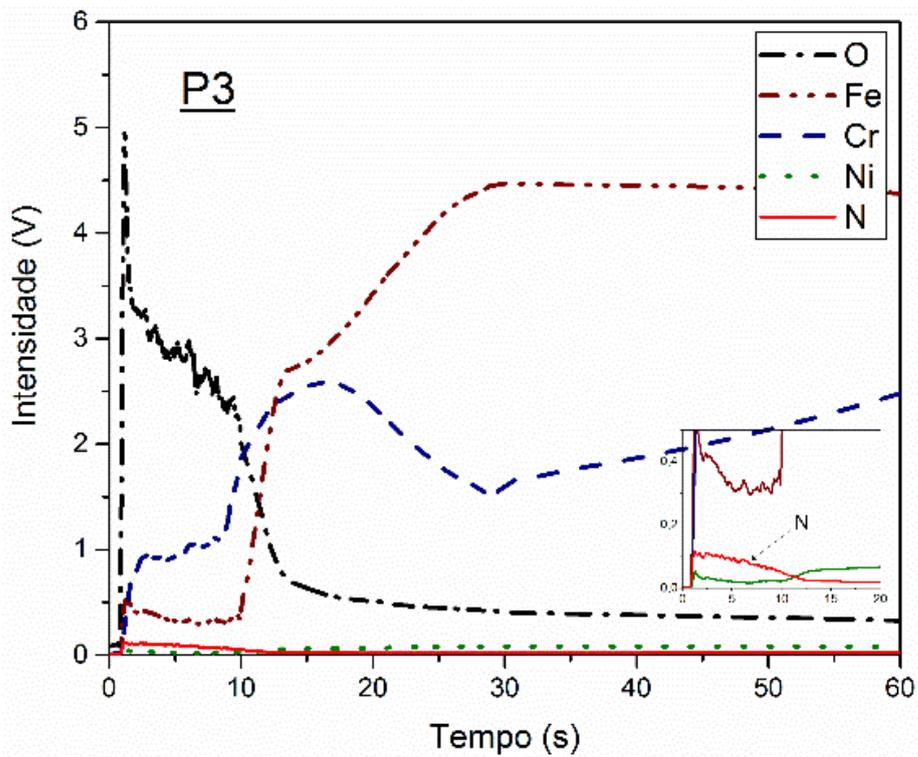


Figura 3 – Perfil de implantação de N<sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 13) e seus principais constituintes

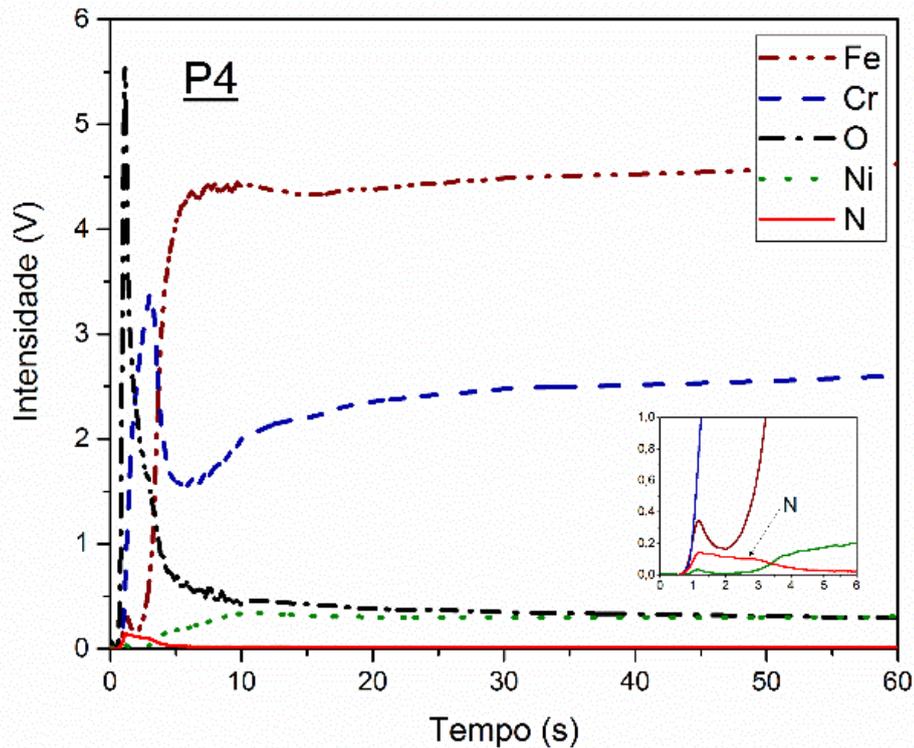


Figura 4 – Perfil de implantação de N<sub>2</sub> na amostra de aço inoxidável AISI 304 (tratamento 14) e seus principais constituintes

A Tabela 5 apresenta as taxas de redução da adesão de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* nos aços tratados com os quatro tratamentos escolhidos. A quantidade de células aderidas sobre aço inoxidável tratado por plasma foi menor ( $p < 0,05$ ) do que o número de células aderidas em aço inoxidável não tratado (controle).

Tabela 4 – Taxa de redução da adesão de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* em aço inoxidável AISI 304 submetidos a quatro tratamentos de nitretação a plasma

% Redução	Tratamento 1	Tratamento 3	Tratamento 13	Tratamento 14
<i>S. Enteritidis</i>	83,99 ± 2,30 aA	55,83 ± 3,75 bC	60,91 ± 1,65 cE	81,42 ± 2,43 aG
<i>L. monocytogenes</i>	56,36 ± 4,76 aB	81,36 ± 3,26 bD	80,13 ± 3,05 bF	82,88 ± 1,31 bG

Tratamento 1 = composição dos gases 95% N<sub>2</sub> e 5% H<sub>2</sub>, tempo 90 min, temperatura 600°C

Tratamento 3 = composição dos gases 10% N<sub>2</sub> e 90% H<sub>2</sub>, tempo 120 min, temperatura 210°C

Tratamento 13 = composição dos gases 10% N<sub>2</sub> e 90% H<sub>2</sub>, tempo 240 min, temperatura 210°C

Tratamento 14 = composição dos gases 23% N<sub>2</sub> e 77% H<sub>2</sub>, tempo 40 min, temperatura 195°C

Mesma letra minúscula dentro de uma linha não apresenta diferença estatística ( $P > 0,05$ )

Mesma letra maiúscula dentro de uma coluna não apresenta diferença estatística ( $P > 0,05$ )

Dentre os tratamentos avaliados, o que apresentou maior taxa de redução da adesão para os dois patógenos alimentares foi o tratamento 14 (81,4% e 82,8%). As condições desse tratamento foram: baixa temperatura (195°C), curto tempo

(40min) e alta concentração de hidrogênio (77%). O tempo e a temperatura de nitretação podem influenciar no comportamento da superfície tratada, uma vez que o número de trincas e a rugosidade aumentam com o incremento da temperatura e tempo de nitretação (Dos Reis et al., 2008). Assim, a rugosidade da superfície pode ter acentuado a retenção de micro-organismos (Verran & Boyd, 2001) nos tratamentos 1, 3 e 13. A rugosidade pode afetar a energia total de ligação entre a bactéria e o substrato. Além disso, o aumento do tempo de nitretação leva à formação de uma camada superficial rica em nitretos a qual inibe a progressiva entrada de nitrogênio para o interior da amostra (Dos Reis et al., 2013). Essa entrada do nitrogênio para o interior da superfície metálica altera algumas propriedades como rugosidade e hidrofobicidade (Zhao et al, 2008).

Ao contrário do que foi observado no presente estudo, Dong et al. (2011) não observaram redução no número de *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis* aderidos à superfície de aço inoxidável AISI 316 tratado com nitretação a plasma, utilizando uma pressão de 4mbar a 430°C, durante 15 horas. Esse resultado pode ser explicado pelo maior tempo (15 horas) e maior temperatura (430°C) utilizados no tratamento. É sabido que temperatura e tempo de nitretação mais altos provocam trincas e aumento da rugosidade, podendo abrigar mais micro-organismos e não reduzir as taxas de adesão.

O oxigênio é um elemento contaminante dos reatores a plasma que afeta diretamente o processo de nitretação. Para a remoção do oxigênio, hidrogênio é adicionado no processo, formando espécies fortemente redutoras. Nos aços inoxidáveis, o hidrogênio remove o oxigênio, melhorando a retenção de nitrogênio na superfície, tornando a nitretação mais eficaz. O hidrogênio também ajuda na remoção de óxidos na superfície a ser nitretada (Allestein, 2011). Algumas pesquisas verificaram que o nitrogênio sozinho não é eficaz para a nitretação do aço inoxidável austenítico, indicando que o hidrogênio possui importante função no processo (Gontijo et al., 2007). Esse fato poderia indicar que o hidrogênio na nitretação por plasma, quando em frações volumétricas maiores na mistura gasosa, atuaria de forma mais efetiva no processo de desestabilização da camada óxida presente no aço inoxidável, possibilitando a entrada de nitrogênio atômico para dentro do material via difusão de forma mais efetiva (Dos Reis et al., 2013). Gontijo et al. (2007) observaram que uma maior solubilidade de nitrogênio para dentro do

material contribui para uma maior hidrofiliabilidade da superfície tratada por nitretação a plasma, reduzindo a adesão bacteriana. Alguns estudos (Sharma et al., 2006; Figueroa et al., 2006) mostraram que as amostras processadas com misturas menores de N<sub>2</sub> e maiores de H<sub>2</sub> (5% N<sub>2</sub> + 95% H<sub>2</sub>) permitem uma maior quantidade de nitrogênio na superfície tratada quando comparados com resultados da mistura com maiores quantidades de N<sub>2</sub> e menores quantidades de H<sub>2</sub> (90% N<sub>2</sub> + 10% H<sub>2</sub>). Por fim, Sharma et al. (2006), estudando a nitretação de aços inoxidáveis austeníticos, demonstraram que a concentração maior de nitrogênio não é eficaz para a nitretação desse tipo de aço quando a finalidade foi alteração da hidrofobicidade, uma vez que é necessária uma quantidade maior de H<sub>2</sub> na mistura para que haja uma maior concentração de N<sub>2</sub> dentro da superfície, e, então, esse N<sub>2</sub> possa alterar as características da superfície tratada para uma possível redução da adesão bacteriana.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que os aços tratados por nitretação a plasma apresentaram um menor número de células aderidas ( $P < 0,05$ ) quando comparados com os mesmos aços não tratados. A redução do número de células aderidas variou de 55,8% a 83,9% para *S. Enteritidis* e 56,3% a 82,8% para *L. monocytogenes*. Resultados semelhantes foram encontrados por Trentin et al. (2014), que observaram reduções na adesão de 83% para *Klebsiella pneumoniae*, de 77%, para *Serratia marcescens*, 65%, para *Staphylococcus aureus*, e 48%, para *Enterobacter cloacae*, em poliestireno tratado por nitretação a plasma com condições diferentes (24% de H<sub>2</sub> e 76% de N<sub>2</sub>) das utilizadas no Tratamento 14.

Segundo Trentini et al. (2014), tratamentos com plasma são efetivos para inibir a adesão bacteriana, porém sem efeito biocida. Casarin et al. (2016) demonstraram uma redução de 20,0% e 37,5% para *L. monocytogenes* e de 31,7% e 65,8% para *S. Enteritidis* em aço inoxidável dos tipos 304 e 316, respectivamente, tratados com nitretação a plasma nas condições de 9% de H<sub>2</sub> e 91% de N<sub>2</sub>, 90 minutos de tempo de nitretação e temperatura de 400°C, condições diferentes as do presente estudo.

Hung et al. (2012) e Lin et al. (2011) obtiveram reduções maiores do que observadas no presente estudo (98,8% e 99,9%, respectivamente), contudo, esses autores utilizaram um sistema complexo, com mais etapas, pela técnica de

nitretação a plasma com micro-ondas. Essa maior redução observada por esses autores pode ser explicada pela diferente técnica de nitretação a plasma, com mais etapas, e pela pressão (133,3 Pa) e potência (>500 W), já que as demais condições foram semelhantes (tempo de 60 minutos e composição dos gases de 40% N<sub>2</sub> e 60% H<sub>2</sub>). No entanto, a escolha das condições utilizadas no presente estudo foi feita com o objetivo de proporcionar um processo menos complexo, mais rápido e com custos baixos para aplicação industrial.

Os valores das taxas de redução mostram que o tratamento de nitretação a plasma foi capaz de reduzir a adesão bacteriana em aproximadamente 1 log. Resultados semelhantes foram demonstrados por outros estudos (Casarin et al., 2016; Trentin et al., 2014). Reduções dessa ordem podem não ser suficientes quando os alimentos apresentam alta contaminação bacteriana e podem ser consideradas baixas se comparadas às reduções obtidas por sanitizantes (cerca de 2 a 3 log de bactérias) e processos térmicos (5 a 6 log de bactérias) (Forsythe, 2013). No entanto, alimentos de boa qualidade e em condições de processamento reais geralmente apresentam baixas contagens de patógenos, e uma redução de 1 log na adesão pode ser o suficiente para prevenir surtos alimentares, principalmente quando se consideram micro-organismos como a *L. monocytogenes* que apresenta doses infectantes muito baixas.

#### **4.2. Influência do tratamento de implantação iônica de íons de prata (Ag<sup>+</sup>) a baixas energias na inativação de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes***

Os resultados dos testes microbiológicos para os diferentes tratamentos de implantação iônica de prata avaliados são mostrados na Tabela 5. Nos corpos de prova tratados por implantação iônica de Ag<sup>+</sup> a baixas energias, o objetivo foi avaliar a redução da adesão inicial das células (1 hora) e a inativação das células aderidas (24 horas).

Observa-se que o Tratamento 2 apresentou uma significativa ( $p < 0,05$ ) redução bacteriana quando comparado com o mesmo aço sem tratamento. Já o Tratamento 1 não apresentou diferença significativa quando comparado com o aço não tratado. O que diferiu entre os dois tratamentos avaliados foram as condições de energia, sendo que o Tratamento 1 utilizou 4 KeV e o Tratamento 2 utilizou 2 KeV.

Tabela 5 – Taxa de redução da adesão (1 hora) e da inativação (24 horas) de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* em aço inoxidável AISI 304, tratado por implantação iônica de Ag<sup>+</sup> a baixas energias

Tratamento	Taxa de redução (%)			
	<i>S. Enteritidis</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	1 h	24 h	1 h	24 h
1	46,90 ± 8,84	43,64 ± 5,14	0,00	10,00 ± 14,14
2	68,60 ± 2,44 *	67,89 ± 1,36 *	51,05 ± 3,06 *	66,71 ± 1,68 *

(\*) houve diferença significativa quando comparado o número de células aderidas no aço inoxidável AISI 304 tratado com o número de células aderidas no aço inoxidável sem tratamento.

Segundo Novello (2012), que comparou amostras tratadas com diferentes condições de energia (70 e 200 keV), nos corpos de prova com tratamento de 200 keV a prata foi implantada a uma profundidade de 25 nm da superfície, enquanto que para as amostras tratadas a 70 keV a prata ficou a 15 nm da superfície. A implantação com 70 keV resultou em uma maior ação antimicrobiana devido ao fato dos íons de prata estarem implantados mais superficialmente e, com isso, serem liberados mais rapidamente.

Após a seleção do melhor tratamento (2), novos corpos de prova foram submetidos às mesmas condições do tratamento escolhido e testados quanto à inibição bacteriana. A profundidade de implantação dos íons de prata na superfície (Tratamento 2) é mostrada na Figura 5, e os resultados da taxa de redução são apresentados na Tabela 6.

Com os resultados da simulação das trajetórias e perdas de energia dos íons implantados (Figura 5), observa-se que a implantação iônica de prata a baixas energias atingiu uma introdução de íons de até 5 nm, a partir da superfície. Além disso, a maior concentração de íons implantados encontra-se em aproximadamente 1,7 nm de profundidade, sendo o perfil de implantação representado por uma curva do tipo Gaussiana.

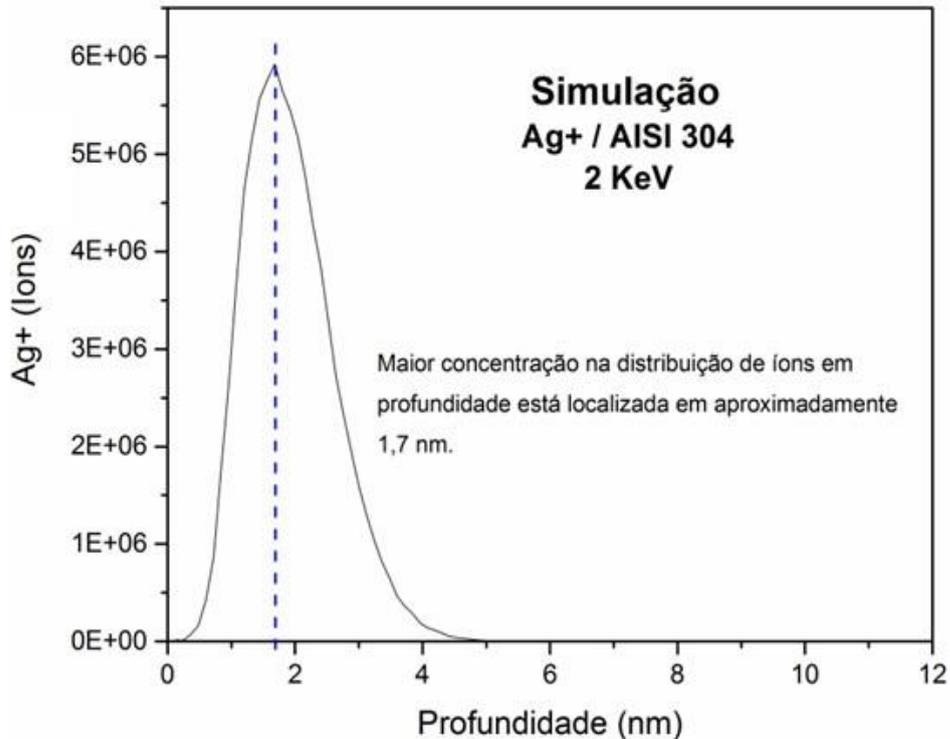


Figura 5 – Resultado da simulação das trajetórias e perdas de energia dos íons de prata implantados a 2 KeV (Tratamento 2) em aço inoxidável AISI 304

Nos resultados das análises de GD-OES (Figura 6), são demonstrados elementos característicos do aço inoxidável, ferro e cromo. Esses resultados corroboram com os resultados das simulações de Monte Carlo, pois as curvas dos elementos não apresentam um crescimento abrupto, o que indica que não há formação de uma película de prata na superfície do aço, mas, sim, que a prata está, de fato, implantada. Na Figura 6, também foi constatada a presença de oxigênio na superfície do aço inoxidável. Esse oxigênio, que aparece na superfície das amostras, corresponde à camada de óxido que se forma pela exposição ao ambiente, bem como átomos adsorvidos à superfície das amostras.

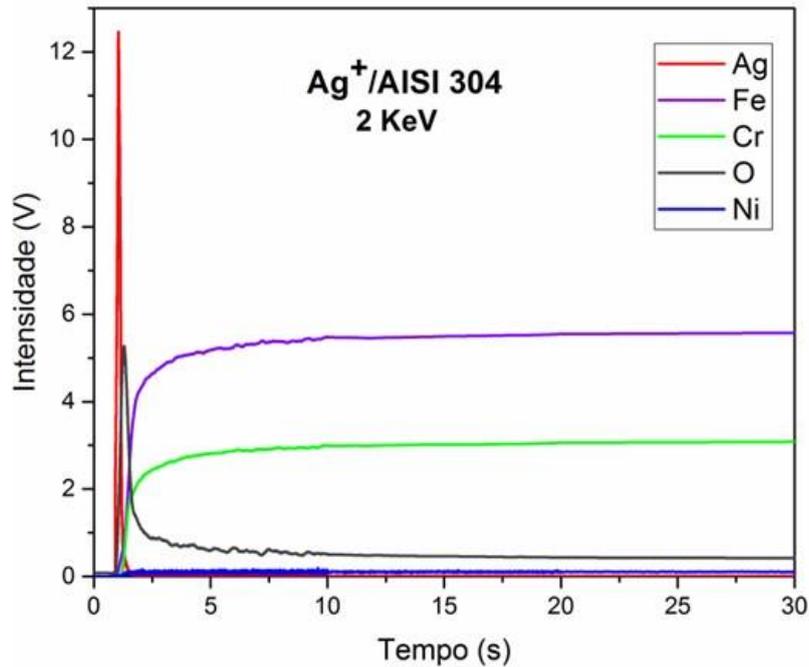


Figura 6 – Perfil de implantação de  $\text{Ag}^+$  na amostra de aço inoxidável AISI 304 (Tratamento 2) e seus principais constituintes

A representação do alcance da profundidade dos íons de prata no aço inoxidável para este estudo, com base nas informações obtidas na simulação de Monte Carlo, está ilustrada na Figura 7.

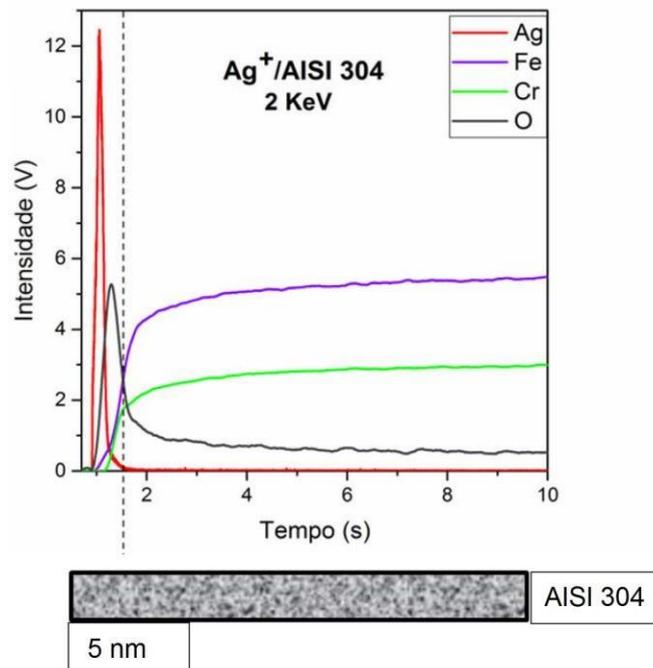


Figura 7 – Representação do alcance da profundidade dos íons de prata implantados no aço inoxidável AISI 304 (Tratamento 2) com base nas informações obtidas na simulação de Monte Carlo

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que houve uma redução para ambas as bactérias ( $\geq 50\%$ ). A taxa de redução variou de 53,8% a 65,9% para *L. monocytogenes* e 69,8% e 70% para *S. Enteritidis* quando a concentração de íons de  $Ag^+$  implantado no aço inoxidável foi de  $3 \times 10^{16} Ag.cm^{-2}$ . Chiang et al. (2010) observaram que superfícies de aço inoxidável AISI 316 com adição de íons de prata em uma concentração de 0,03% (peso/peso) implantados pelo método de derretimento repetido em forno ( $1050^{\circ}C$ ) por uma fusão de indução a vácuo (VIM) por 5 minutos exibiram um efeito antibacteriano com uma taxa de redução de *E. coli* de 89,9%. Já Liao et al. (2010) encontraram taxa de redução maior (99,9%) para *E. coli* e *S. aureus* com a mesma concentração de prata do estudo de Chiang et al. (2010), porém, no aço inoxidável AISI 304, preparado em um forno de indução de ar, sob uma atmosfera protetora a  $1200^{\circ}C$ , durante 4 horas. No nosso estudo, foram encontradas taxas de reduções mais baixas do que no estudo de Chiang et al. (2010) e Liao et al. (2010). Isso pode ter ocorrido devido ao método e condições utilizados para a adição da  $Ag^+$  na superfície, já que, naqueles estudos, a  $Ag^+$  foi introduzida na composição do aço inoxidável, diferente do presente estudo, onde a  $Ag^+$  foi implantada na superfície do aço inoxidável.

Tabela 6 – Taxa de redução de *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* em aço inoxidável AISI 304 tratado por implantação iônica de  $Ag^+$  a baixas energias

% Redução	1h	24h
<i>S. Enteritidis</i>	$70,0 \pm 3,58$ aA	$69,8 \pm 3,22$ aA
<i>L. monocytogenes</i>	$53,8 \pm 3,34$ aB	$65,9 \pm 2,23$ bA

Notas: Mesma letra minúscula dentro de uma linha não possui diferença estatística ( $P > 0,05$ ).

Mesma letra maiúscula dentro de uma coluna não possui diferença estatística ( $P > 0,05$ ).

Na Tabela 6, observa-se que para *S. Enteritidis* não houve diferença significativa entre os tempos de adesão de uma e 24 horas. Embora não seja possível afirmar que a prata não tenha inativado a *S. Enteritidis* já em uma hora, o tratamento com prata foi suficiente para reduzir a adesão de *S. Enteritidis* em 70 %, porém não houve redução adicional desse micro-organismo após 24 horas. Por outro lado, para *L. monocytogenes*, a taxa de redução foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) após 24 horas, indicando que houve inativação adicional da *L. monocytogenes*, devido à ação da prata, após esse período. Isso pode ser explicado pelo fato das paredes celulares das bactérias Gram-positivas diferirem

acentuadamente das Gram-negativas. O peptidoglicano na parede celular de bactérias Gram-positivas é muito mais espesso do que aquele em bactérias Gram-negativas (Tortora, 2013); com isso, a parede celular mais espessa da *L. monocytogenes* pode ser mais resistente contra a penetração de íons de prata na célula (Krishnan et al., 2015; Greulich et al., 2012; Rai et al., 2009; Feng et al., 2000). Isso confirma os resultados encontrados no estudo de Ni et al. (2012) que avaliaram a adesão com 24 horas de contato e relataram que a prata implantada nas amostras de aço inoxidável AISI 420 mostrou excelente propriedade antibacteriana para *E. coli* com uma dose de implantação de  $2 \times 10^{17}$  Ag.cm<sup>-2</sup>. No entanto, a atividade antibacteriana em relação a *Staphylococcus aureus* não foi satisfatória, com taxas antibacterianas de apenas 50%. Osés et al. (2014) observaram no teste de atividade antimicrobiana uma eficácia no tratamento de implantação de íons de prata ( $1 \times 10^{17}$  Ag.cm<sup>-2</sup>), porém, para *E. coli*, a eliminação foi maior do que para *S. aureus*.

Os resultados também demonstraram que a taxa de redução de *S. Enteritidis* foi maior do que a de *L. monocytogenes* em uma hora ( $p < 0,05$ ). Os valores observados para o número de células aderidas aos aços inoxidáveis não tratados (dados não mostrados) mostraram que *S. Enteritidis* também aderiu mais do que a *L. monocytogenes* nos aços inoxidáveis não tratados; isto pode ocorrer devido à influência de outras características da *S. Enteritidis*, como a presença de fímbrias, pilis e cápsula que podem estar envolvidas no processo de adesão.

No entanto, não houve diferença significativa entre as bactérias avaliadas quando os testes foram feitos em 24 horas, sugerindo que o tempo não foi fator determinante para o efeito da prata (efeito residual) em bactérias Gram negativas. Por outro lado, foi observada diferença significativa entre os dois tempos (1 hora e 24 horas) para *L. monocytogenes*, que pode ter ocorrido devido às características da estrutura celular, indicando que o tempo tem influência no efeito da prata em bactérias Gram positivas. No entanto, cabe ressaltar que, para ambas as bactérias, os íons de prata implantados foram capazes de inibir as células aderidas inicialmente e no biofilme maduro.

Resultado semelhante à da nossa pesquisa foi encontrada por Chen et al. (2013), que observaram boa atividade antibacteriana contra *E. coli* no aço inoxidável 420 (77,7%), onde a prata foi implantada utilizando um equipamento de implantação

de íons, com uma dose semelhante à nossa ( $5 \times 10^{16}$  Ag.cm<sup>-2</sup>). Contudo, quando foi aumentada a dose de prata implantada ( $1000 \times 10^{16}$  Ag.cm<sup>-2</sup>), a atividade antibacteriana aumentou (98,4%). Em outro estudo, Wan et al. (2007) testaram implantação de íons prata em dois materiais (aço inoxidável 317 e titânio). A taxa de redução bacteriana para as amostras de aço inoxidável 317 e titânio, tratadas com prata, foi de 80% e 83%, respectivamente, com uma dose maior de íons do que a do presente trabalho ( $0,5 \times 10^{17}$  Ag.cm<sup>-2</sup>). Quando íons de prata foram aumentados para a dose de  $1,5 \times 10^{17}$  Ag.cm<sup>-2</sup>, houve um excelente efeito antibacteriano, de 99,9% e 100%, para as amostras de aço inoxidável e titânio, respectivamente.

Segundo Echaverrigaray (2014), as amostras de aço inoxidável AISI 304 com a implantação de prata apresentaram uma alta redução bacteriana (>95%) em relação às amostras não tratadas para *E. coli* e *S. aureus*, sendo que a concentração usada foi maior do que a utilizada em nossa pesquisa ( $1 \times 10^{17}$  Ag.cm<sup>-2</sup>). É, portanto, compreensível que o efeito antibacteriano aumente com o aumento da dose de íons implantados na superfície. A prata, ao ser liberada da superfície, adquire a forma ionizada e, ao se ligar às proteínas das células bacterianas, possivelmente deve danificar a estrutura da parede celular, ocasionando a morte das células (Echaverrigaray, 2014).

Contudo, essas considerações são questionadas pela ocorrência e predominância das células aderidas irreversivelmente à superfície. É provável que essas células se tornem uma barreira contra a ação dos íons Ag<sup>+</sup>. Nessas circunstâncias, o biofilme poderia se desenvolver sobre as células aderidas, estando elas mortas ou vivas, sem sofrer os efeitos dos íons Ag<sup>+</sup> (Echaverrigaray, 2014).

Nossos resultados sugerem que o aço inoxidável AISI 304, tratado por implantação iônica de Ag<sup>+</sup> a baixas energias, pode ser utilizado como alternativa aos aços inoxidáveis tradicionais para ajudar a reduzir a ocorrência de contaminação bacteriana. No entanto, mostrou uma redução de bactérias em aços inoxidáveis tratados com Ag<sup>+</sup> de aproximadamente 1 log, e, embora seja considerada uma baixa redução, isso já pode ser suficiente para prevenir surtos alimentares, principalmente quando considera-se *L. monocytogenes*, que apresenta doses infectantes muito baixas (<10<sup>2</sup> células) (Forsythe, 2013).

Entretanto, alguns estudos (Chiang et al., 2010; Hjelm et al., 2002) demonstraram que microcolônias bacterianas podem ser formadas mesmo em

superfícies tratadas com  $\text{Ag}^+$ , em períodos de incubação mais longos. Portanto, se a superfície de aço inoxidável tratada com  $\text{Ag}^+$  for utilizada em áreas relacionadas com higiene e saúde, onde é necessário evitar o crescimento e multiplicação de bactérias, as práticas de higienização apropriadas precisam ser aplicadas.

#### **4.3. Resistência térmica (121°C) e resistência a produtos químicos (NaClO e NaOH) do aço inoxidável AISI 304 tratado por nitretação a plasma**

Com o objetivo de testar a resistência do tratamento de nitretação a plasma frente às condições reais de uso dos equipamentos e utensílios de aço inoxidável nas empresas de alimentos, os corpos de prova tratados foram expostos à temperatura elevada e a produtos químicos amplamente utilizados na higienização.

Com relação à redução da adesão de *S. Enteritidis*, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a amostra controle (sem nenhuma exposição às condições de uso) quando comparada com os corpos de prova expostos ao tratamento térmico (121°C, por 15 minutos) e aos produtos químicos (NaClO e NaOH). Por outro lado, para *L. monocytogenes*, após os corpos de prova serem expostos ao hidróxido de sódio (0,8% e 1,6%), a taxa de redução desse micro-organismo foi menor ( $p < 0,05$ ) quando comparada com os corpos de prova tratados com nitretação a plasma, mas que não foram expostos ao hidróxido de sódio (Tabela 7). Embora o hidróxido de sódio tenha afetado os corpos de prova tratados com nitretação a plasma, quando avaliada a taxa de redução para *L. monocytogenes* continuaram, estas continuaram acima de 70%.

Este resultado sugere que o uso de hidróxido de sódio durante a higienização das superfícies de aço inoxidável influencia negativamente no efeito de redução da adesão bacteriana causada pela nitretação a plasma, provavelmente devido à adsorção de íons na superfície tratada. No entanto, outros estudos precisam ser realizados para elucidar tal influência.

Tabela 7 – Resistência térmica (121°C por 15 minutos) e resistência a produtos químicos (NaClO e NaOH) do tratamento de nitretação a plasma de aço inoxidável AISI 304 com adesão de *L. monocytogenes* e da *S. Enteritidis*

Condições Taxa de redução (%)						
% Redução	Controle	Temperatura (121°C)	Hipoclorito de sódio (400 ppm)	Hipoclorito de sódio (800 ppm)	Hidróxido de sódio (0,8%)	Hidróxido de sódio (1,6%)
<i>L. monocytogenes</i>	84,28±1,33 <sup>aA</sup>	82,92±1,12 <sup>aA</sup>	82,17±0,78 <sup>aA</sup>	82,19±0,70 <sup>aA</sup>	74,05±1,08 <sup>bA</sup>	72,22±1,46 <sup>bA</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	82,09±1,39 <sup>aA</sup>	81,33±2,80 <sup>aA</sup>	81,01±2,47 <sup>aA</sup>	80,59±1,38 <sup>aA</sup>	79,70±1,29 <sup>aB</sup>	78,77±1,02 <sup>aB</sup>

Notas: Mesma letra minúscula dentro de uma linha não possui diferença estatística (P>0,05).

Mesma letra maiúscula dentro de uma coluna não possui diferença estatística (P>0,05).

Na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho que avaliou a resistência do tratamento de nitretação a plasma em superfícies de aço inoxidável após exposição a altas temperaturas e produtos químicos. No entanto, a exposição frequente a estas condições na indústria de alimentos indica a necessidade da realização de mais estudos.

Neste trabalho, um dos objetivos foi avaliar o tratamento quanto à resistência térmica e à resistência a produtos químicos nos corpos de prova de aço inoxidável tratados pelas duas técnicas de modificação da superfície. No entanto, não foi realizada a avaliação do tratamento por implantação iônica de Ag<sup>+</sup> a baixas energias, uma vez que não havia corpos de prova, com este tratamento, suficientes para fazer os experimentos e que a realização de um número significativo de amostras para testar todas as variáveis demanda tempo e disponibilidade do equipamento. Por isso, foi escolhido o tratamento por nitretação a plasma, já que este demonstrou melhores taxas de redução bacteriana para as duas bactérias avaliadas.

Os tratamentos com plasma e com implantação iônica de prata a baixas energias são promissores para a alteração de superfícies com objetivo de reduzir o processo de adesão e promover a inativação de bactérias aderidas. Não apenas em materiais médicos, mas, também, em superfícies metálicas que entram em contato com alimentos. No entanto, são necessários mais estudos para obter as melhores condições de tratamento necessárias para atingir maiores taxas de redução da adesão bacteriana e, também, avaliar mais profundamente a estabilidade desses tratamentos às condições utilizadas pela indústria de alimentos.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- O tratamento do aço inoxidável AISI 304 por nitretação a plasma reduziu a adesão de *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11);
- A implantação de íons  $\text{Ag}^+$  a baixas energias apresentou-se como uma alternativa para a inibição de *S. Enteritidis* (SE86) e *L. monocytogenes* (J11) em aço inoxidável AISI 304;
- O tratamento por nitretação a plasma com temperatura baixa ( $195^\circ\text{C}$ ), baixo tempo de nitretação (40min) e alta porcentagem de hidrogênio (77%) apresentou maior taxa de redução para ambos os micro-organismos avaliados;
- O tratamento pela técnica de implantação iônica com  $\text{Ag}^+$  apresentou melhor taxa de redução com utilização de menor energia de implantação dos íons (2 KeV);
- O  $\text{N}_2$  foi incorporado em todos os quatro tratamentos com as melhores taxas de reduções, sendo que a maior quantidade de  $\text{N}_2$  foi concentrada a alguns nanômetros da superfície e diminuiu ao longo da profundidade;
- Os perfis de profundidade das superfícies tratadas comprovam que a prata foi implantada na superfície de aço inoxidável AISI 304 e o alcance de profundidade dos íons no interior da superfície foram de até 5 nm;
- O tratamento de nitretação por plasma apresentou taxas de redução bacteriana maiores do que o tratamento de implantação iônica com  $\text{Ag}^+$  a baixas energias;
- O tratamento de nitretação por plasma quando expostos a produtos químicos e temperatura elevada ( $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos), manteve boas taxas de redução bacteriana (acima de 70%), embora a exposição ao hidróxido de sódio tenha influenciado negativamente na redução da adesão de *L. monocytogenes*.

## **PERSPECTIVAS**

Alguns estudos podem ser propostos como trabalhos futuros:

- Avaliar a ação da prata implantada, principalmente após contato com soluções ácidas e básicas, que apresentem o mesmo pH que alguns alimentos industrializados ou soluções para higienização, diferentes temperaturas, concentrações de sal;
- Avaliar o tratamento de nitretação a plasma para diferentes temperaturas, pH, concentrações de sal;
- Avaliar os tratamentos de nitretação a plasma e a ação da prata implantada em diferentes substratos (polietileno, vidro, AISI 316) e sobre diferentes micro-organismos;
- Determinar por quanto tempo a quantidade de prata implantada continua a fazer efeito.

## REFERÊNCIAS

- Abdelhaseib MU, Singh AK, Bailey M, Singh M, Khateib TE, Bhunia AK. 2016. Fiber optic and light scattering sensors: Complimentary approaches to rapid detection of *Salmonella enterica* in Food samples. **Food Control**. 61:135-45.
- Allestein AN. 2011. **Modificação da Superfície Pela Introdução de Nitrogênio no Aço Inoxidável Martensítico Utilizado em Componentes Hidráulicos**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) — Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR.
- Alonso AN, Perry KJ, Regeimbal JM, Regan PM, Higgins DE. 2014. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. **PLoS One**, 9:9-11.
- Alves Jr. C. 2001. **Nitreção a Plasma: Fundamentos e Aplicações**. Natal: UFRN.
- Andrade NJ. 2008. **Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela.
- Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA. 1998. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, 61(7):833-8.
- Appendini P, Hotchkiss JH. 2002. Review of antimicrobial food packaging. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol**. 3:113-26.
- Araújo FO, Sousa RS, Araújo AKG, Ribeiro KJB, Alves Jr C. 2007. Nitreção a plasma de aço inoxidável austenítico AISI 316: uniformidade da camada nitretada. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, 26(1):31-5.
- Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, 33:5967-82.
- ASTM A 240. 2012. **Standard Specification for Chromium and Chromium-Nickel Stainless Steel Plate, Sheet, and Strip for Pressure Vessels and for General Applications**.
- Baddoo NR. 2008. Stainless steel in construction: a review of research, applications, challenges and opportunities. **Journal of Constructional Steel Research**, 64:1199-206.
- Baier M, Foerster J, Schnabel U, Knorr D, Ehlbeck J, Herppich WB, Schlueter O. 2013. Direct non-thermal plasma treatment for the sanitation of fresh corn salad leaves: evaluation of physical and physiological effects and antimicrobial efficacy. **Postharvest Biol. Technol**. 84:81-7.

Behlau I, Gilmore MS. 2010. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infections Disease. **Archives of Ophthalmology**, 126:1572-81.

Berrang ME, Frank JF, Meinersmann RJ. 2010. *Listeria monocytogenes* biofilm formation on silver ion impregnated cutting boards. **Food Protection Trends**, 30:168-71.

Boari CB, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. 2009. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29(4):886-95.

Bong JP, Travis H, Nehal IA. 2009. A correlation between the virulence and the adhesion of *Listeria monocytogenes* to silicon nitride: An atomic force microscopy study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 73:237-43.

Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernandes Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, 35:386-91.

Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam MY, Hagens WI, Bulder AS, De Heer C, Ten Voorde SECG, Wijnhoven SWP, Marvin HJP, Sips AJAM. 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 53:52-62.

Bovenkamp GL, Zanzen U, Krishna KS, Hormes J, Prange. 2013. X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy study of the interaction of silver ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(20):6385-90.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Atualizado em 2015. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2015.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2015.pdf)>. Acesso em: 16 set. 2016.

Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard JC, Naitali M. 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, 45:167-78.

Buchanan R, Lindqvist R, Ross T, Smith M, Todd E, Whiting R. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In: **Microbiological Risk Assessment Series**, v. 4. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 5-14.

Carpentier B, Cerf O. 2011. Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, 145:1-8.

Casarin LS, Brandelli A, Casarin FO, Soave PA, Wanke CH, Tondo EC. 2014. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. **International Journal of Food Microbiology**.

Casarin LS, Casarin FO, Soares TP, Aguzzoli C, Figueroa CA, Soares GV, Brandelli A, Tondo EC. 2016. Effect of plasma nitriding surface modification on the adhesion of food pathogens to stainless steel AISI 316 and AISI 304. **Journal of Food Safety**, 36:341-7.

Chae MS, Scharaft H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, 62:103-11.

Characklis WG. 1981. Fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnology Bioengineering**, 23:1923-60.

Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M-N, Hebraud M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, 68:728-37.

Chen M, Yu Q, Sun H. 2013. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, 14:18488-501.

Chen R, Ni H, Zhang H, Yue G, Zhan W, Xiong P. 2013. A preliminary study on antibacterial mechanisms of silver ions implanted stainless steel. **Vacuum**, 89:249- 53.

Chia TWR, Goulter RM, Mcmeekin T, Dykes GA, Fegan N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, 26:853-9.

Chiang WC, Tseng IS, Moller P, Hilbert LR, Nielsen TT, Wu JK. 2010. Influence of silver additions to type 316 stainless steels on bacterial inhibition, mechanical properties, and corrosion resistance. **Materials Chemistry and Physics**, 119:123- 30.

Chmielewski RAN, Frank JF. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Food Sci. Food Saf.**, 2:22-32.

Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. 2014. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 5, article 405.

Dan ZG, Ni HW, Xu BF, Xiong J, Xiong PY. 2005. Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted copper ions. **Thin Solid Films**, 492:93-100.

Dearnaley G. 1974. Ion implantation. **Annual Review of Materials Science**, 4:93-123.

Doijad SP, Barbuddhe SB, Garg S, Poharkar KV, Kalorey DR, Kurkure NV, Rawool DB, Chakraborty T. 2015. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. **PLoS ONE**, 1-14.

Dong Y, Li X, Tian L, Bell T, Sammons RL, Dong H. 2011. Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. **Acta Biomaterialia**, 7:447-57.

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, 15(2):167-93.

Dos Reis RF, Borges PC, Pandolfo V. 2013. Nitretação por plasma do aço ISO 5832-1 em alta temperatura: Influência do tempo de tratamento e sua aplicação no processo "SHTPN". **Revista Matéria**, 18(04):1525-40.

Dos Reis RF, Maliska AM, Borges PC. 2008. Nitretação à plasma do aço inoxidável austenítico ISO 5832-1: influência do tempo de tratamento. **Revista Matéria**, 13(2):304-15.

Echeverrigaray FG. 2014. **Estudo da ação antimicrobiana pela modificação de regiões próximas à superfície de aço inoxidável**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) — Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2006. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request related to a 12th list of substances for food contact materials. **EFSA Journal**, 1(21):395-401.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2011. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. **EFSA Journal**, 8(1):1496.

Feng H, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, 52(4):662-8.

Feng H, Yu Z, Chu PK. 2006. Ion implantation of organisms. **Materials Science and Engineering Research**, 54:49-120.

Fernebro J. 2011. Fighting bacterial infections – Future treatment options. **Drug Resistance Updates**, 14:125-39.

Figuroa CA, Alvarez F. 2006. On the Hydrogen Etching Mechanism in Plasma Nitriding of Metals. **Applied Surface Science**, 253:1806-9.

Finn S, Händler K, Condell O, Colgan A, Cooney S, McClure P, Amezcua A, Hinton JCD, Fanning S. 2013. Prop is required for the survival of desiccated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells on a stainless steel surface. **Appl. Environ. Microbiol.**, 79:4376-84.

Flemming HC. 2011. The perfect slime. *Coll. Surf. B Biointerfaces*, 86:251-9.

Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. **Nature. Review. Microbiol.**, 8:623-33.

Forsythe SJ. 2013. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed.

Frank JF, Chmielewski RAN. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 2:22-32.

Froehling A, Durek J, Schnabel U, Ehlbeck J, Bolling J, Schlueter O. 2012. Indirect plasma treatment of fresh pork: decontamination efficiency and effects on quality attributes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 16:381-90.

Galeano B, Korff E, Nicholson WL. 2003. Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver- and zinc- containing zeolite formulation. **Applied and Environmental Microbiology**, 69:4329-31.

Gambino M, Marzano V, Villa F, Vitali A, Vannini C, Landini P, Cappitelli F. 2015. Effects of sublethal doses of silver nanoparticles on *Bacillus subtilis* planktonic and sessile cells. **Journal of Applied Microbiology**, 118:1103-15.

Gandhi M, Chikindas ML. 2007. Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, 113(1):1-15.

Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, 18:1049-56.

Gauthier GL, Quessy S, Fournaise S, Letellier A, Fravallo P. 2015. Different types of stainless steel used in equipment in meat plants do not affect the initial microbial transfer, including pathogens, from pork skin. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 79:255-9.

Giaouris E, Samoilis G, Chorianopoulos N, Ercolini D, Nychas GJE. 2013. Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. **International Journal of Food Microbiology**, 162:105-13.

Goh SG, Leili AH, Kuan CH, Loo YY, Lye YL, Chang WS, Soopna P, Najwa MS, Tang JYH, Yaya R, Nishibuchi M, Nakaguchi Y, Son R. 2014. Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. **Food Control**, 37:51-5.

Gontijo LC, Machado R, Casteletti LC, Kuri SE, Nascente PAP. 2007. Comparação entre os comportamentos dos aços inoxidáveis AISI 304I e AISI 316I nitretados a plasma. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, 26(3):145-50.

Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, De Valk H. 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, 14:734–40.

Greulich C, Braun D, Peetsch A, Diendorf J, Siebers B, Epple M, Köller M. 2012. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. **RSC Advances**, 2:6981-7.

Gutiérrez D, Delgado S, Sánchez-Vázquez D, Martínez B, Cabo ML, Rodríguez A, Herrera JJ, García P. 2012. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(24):8547-54.

Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Aberasturi DJ, Larramendi IR, Rojo T, Serpooshan V, Parak W, Mahmoundi M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, 30(10):499-511.

Hansen LT, Vogel BF. 2011. Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products. **International Journal of Food Microbiology**, 146:88-93.

Hatada R, Flege S, Bobrich A, Ensinger W, Baba K. 2014. Surface modification and corrosion properties of implanted and DLC coated stainless steel by plasma based ion implantation and deposition. **Surface & Coatings Technology**, 256:23-9.

Hedberg Y, Karlsson ME, Blomberg E, Wallinder IO, Hedberg J. 2014. Correlation between surface physicochemical properties and the release of iron from stainless steel AISI 304 in biological media. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, 122:216-22.

Hjelm M, Hilbert LR, Moller P, Gram L. 2002. Comparison of adhesion of the food spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens* to stainless steel and silver surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, 92:903-11.

Hori K, Matsumoto S. 2010. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, 48:424-34.

Hung CF, Wu CZ, Lee WF, Ou KL, Liu CM, Peng PW. 2012. The Effect of Nitrided Layer on Antibacterial properties for Biomedical Stainless Steel. **Physics Procedia**, 32:914- 9.

Izquierdo VYM, Vázquez DIS, Jerez JJR. 2012. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phages P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless surfaces. **Food Control**, 23:470-7.

Jabbouri S, Sadovskaya I. 2010. Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, 59:280-91.

Jain IP, Agarwal G. 2011. Ion beam induced surface and interface engineering. **Surface Science Reports**, 66:77-172.

Jakubovics NS. 2010. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. John Wiley & Sons. **Molecular Oral Microbiology**, 25:4-14.

Jensen AK, Ethelberg S, Smith B, Nielsen EM, Larsson J, Mølbak K, Christensen JJ, Kemp M. 2010. Substantial increase in listeriosis, Denmark 2009. **Euro Surveillance**, 15(12). Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19522>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shim S, Kim SH, Park YH. 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2171-8.

Kaestner P, Michler T, Weidner H, Rie K, Bräuer G. 2008. Plasma nitride austenitic stainless steels for automotive hydrogen applications. **Surface & Coatings Technology**, 203:897-900.

Kampmann Y, De Clerck E, Kohn S, Patchala DK, Langerock R, Kreyenschmidt J. 2008. Study on the antimicrobial effect of silver-containing inner liners in refrigerators. **J. Appl. Microbiol.**, 104:1808-14.

Kim M, Park SY, Ha SD. 2016. Synergistic effect of a combination of ultraviolet C irradiation and sodium hypochlorite to reduce *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and eggshell surfaces. **Food Control**, 70:103-9.

Kim SK, Yoo JS, Priest JM, Fewell MP. 2003. Characteristics of martensitic stainless steel nitrided in a low-pressure RF plasma. **Surface and Coatings Technology**, 163-4:380-5.

Knetsch MLW, Koole LH. 2011. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. **Polymers**, 3:340-66.

Kokare CR. 2009. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, 8:159-68.

Krauss G. 1990. **Steels, Heat Treatment and Processing Principles**. second edition. Ohio: ASM International.

Krisshnan SK, Prokhorov E, Iturriaga MH, Morales JDM, Lepe MV, Kovalenko Y, Sanchez IC, Bárcenas GL. 2015. Chitosan-silver nanocomposites: Synergistic

antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, 67:242-52.

Kulthong K, Srisung S, Boonpavanitchaku K, Kangwansupamonkon W, Maniratanachote R. 2010. Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. **Part Fibre Toxicol.**, 7:8-10.

Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, 83(3):227-36.

Lansdown ABG. 2007. Critical observations on the neurotoxicity of silver. **Crit Rev Toxicol**, 37:237-50.

Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates samples in the food industry. **Biofoul**, 4:421-31.

Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, 11:371-84.

Leriche V, Carpentier B. 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, 88:594--605.

Li G, Peng Q, Li C, Wang Y, Jgao J, Chen S, Wang J, Shen B. 2008. Effect of DC plasma nitriding temperature on microstructure and dry-sliding wear properties of 316L stainless steel. **Surface and Coatings Technology**, 202:2749-54.

Li JX, Wang J, Shen LR, Xu ZJ, Li Wan PGJ, Huang N. 2007. The influence of polyethylene terephthalate surfaces modified by silver ion implantation on bacterial adhesion behavior. **Surface and Coatings Technology**, 201:8155-9.

Liao KH et al. 2010. Effect of Silver on Antibacterial Properties of Stainless Steel. **Applied Surface Science**, 256:3642-6.

Lin L-H, Chen S-C, Wu C-Z, Hung J-M, Ou K-L. 2011. Microstructure and antibacterial properties of microwave plasma nitrided layers on biomedical stainless steels. **Applied Surface Science**, 257:7375-80.

Lunden JM, Autio TJ, Korkeala HJ. 2002. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, 65:1129-33.

Malheiros PS, Passos CT, Casarin LS, Serraglio L, Tondo EC. 2010. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, 21:298-301.

Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. 2013. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. **ACTA Biochimica Polonica**, 60(4):523-30.

Marques SC, Rezende JGOSR, Alves LAF, Silva BC, Alves E, Abreu RL. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38:538-43.

Martins CMB, Moreira JL, Martins JI. 2014. Corrosion in water supply pipe stainless steel 304 and a supply line of helium in stainless steel 316. **Engineering Failure Analysis**, 39:65-71.

Martínez-Abad A, Lagarón JM, Ocio MJ. 2014a. Antimicrobial beeswax coated polylactide films with silver control release capacity. **International Journal of Food Microbiology**, 174:39-46.

Martínez-Abad A, Lagarón JM, Ocio MJ. 2014b. Characterization of transparent silver loaded poly (L-lactide) films produced by melt-compounding for the sustained release of antimicrobial silver ions in food applications. **Food Control**, 43:238-44.

Maurer AA, Bérion CS, Briandet R, Zannai S. 2015. Plasma-deposited nanocomposite polymer-silver coating against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Antibacterial properties and ageing. **Surface & Coatings Technology**, 281:1-10.

Milles AA, Misra SS. 1938. Estimation of the bactericide power of the bloods. **Journal of Hygiene**, 38:732-49.

Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, De Camargo ER, Barbosa DB. 2009. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 34:103-10.

Moskaliuviene T, Galdikas A, Rivière JP, Pichon L. 2011. Modeling of nitrogen penetration in polycrystalline AISI 316L austenitic stainless steel during plasma nitriding. **Surface and Coatings Technology**, 205:3301-6.

Mürmann L, Santos MC, Longaray SM, Both JMC, Cardoso M. 2008. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:529-34.

Ni HW, Zhang H, Chen R, Zhan W, Huo K, Zuo Z. 2012. Antibacterial properties and corrosion resistance of AISI 420 stainless steels implanted by silver and copper ions. **International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials**, 18: 322-27.

Nitschke M, Araújo V, Costa SGVAO, Pires RC, Zeraik AE, Fernandes ACLB, Freire DMG, Contiero J. 2009. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surface. **Letters in Applied Microbiology**, 49(2):241-7.

Nostro A, Marino A, Blanco AR, Cellini L, Giulio MD, Pizzimenti F, Roccaro AS, Bisignano G. 2009. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. **Journal of Medical Microbiology**, 58:791-7.

Novello JCL. 2012. **Implantação de íons de prata em aço inoxidável e Infecção fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) — Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

O'Leary D, McCabe EM, McCusker MP, Martins M, Fanning S, Duffy G. 2013. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT 104b cultured from the modern pork chain. **International Journal of Food Microbiology**, 161:36-43.

Oliveira FA, Frazzon APG, Brandelli A, Tondo EC. 2007. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, 1:170-6.

Oliveira FA, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Paquali G, Silva WP, Tondo EC. 2009. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, 20:606-10.

Olszewska MA, Zhao T, Doyle MP. 2016. Inactivation and induction of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. **Food Control**, 70:371-9.

Ortiz S, López V, Villatoro D, López PDJ, Carlos MS, Joaquín V. 2010. A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. **Foodborne Pathogens and Disease**, 7(10).

Osés J, Palacio JF, Kulkarni S, Medrano A, García JA, Rodríguez R. Antibacterial PVD coatings doped with silver by ion implantation. 2014. **Applied Surface Science**, 310: 56-61.

Palmer J, Flint S, Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the bedimming of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34(9):577-88.

Percival SL, Bowler PG, Russel D. 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, 60:1-7.

Pesenti GC. 2004. Modificação de características elétricas de estruturas semicondutoras III-V através de bombardeamento com íons. Dissertação (Mestrado em Física) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Pezzagna S, Meijer J. **High-resolution Ion Implantation from KeV to MeV**. Rubion, Ruhr-Universität Bochum, 2012.

- Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. 2010. Biofilms Made Easy. In: **Wounds International**, 1.
- Poncin-Epaillard F, Herry JM, Marmey P, Legeay G, Debarnot D, Bellon-Fontaine MN. 2013. Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface - a potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria? **Materials Science and Engineering C.**, 33:1152-61.
- Quintavalla S, Vicini L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Sci.**, 62:373-80.
- Rai M, Yadav A, Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, 27:76-83.
- Rangel CM, Paiva TIC. 1996. Chromium ion implantation for inhibition of corrosion of aluminium. **Surface and Coatings Technology**, 83:194-200.
- Rio Grande do Sul. 2006. Secretaria Estadual da Saúde. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatórios Anuais de Doenças Transmitidas por Alimentos**. p. 21, Porto Alegre.
- Rivoal K, Queguiner S, Boscher E, Bougeard S, Ermel G, Salvat G. 2010. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, 138:56-62.
- Ronner AB, Wong ACL. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, 56(9):750-8.
- Rossoni EMM, Gaylarde CC. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, 61(1): 81-5.
- Russell AD, Hugo WB. 1994. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, 31:351-70.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Disease Journal**, 17:7e15.
- Seidel TE. 1983. Ion implantation. In: Sze SM. VLSI Technology. New York: McGraw-Hill. p. 219.
- Shakerifard P, Gancel F, Jacques P, Faille C. 2009. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. **Biofouling**, 25:533-41.

Sharma M, Anand SK. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, 13(6-7):469-77.

Sharma MK, Saikia BK, Phukan A, Ganguli B. 2006. Plasma Nitriding of Austenitic Stainless Steel in N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> dc Pulsed Discharge. **Surface & Coatings Technology**, 201:2407-13.

Shi X, Zhu X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. **Food Science and Technology**, 20:407-13.

Simões M, Simões L, Vieira MJ. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, 43:573-83.

Sinde E, Carballo J. 2000. Attachment of *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, 17(4):439-47.

Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ. 2011. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, 45:502-31.

Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, 38:428-32.

Stewart PS. 2014. Biophysics of biofilm infection. **Pathogens and Disease**, 70:212-8.

Szlavik J, Paiva DS, Mørk N, Van Den Berg F, Verran J, Whitehead K, Knøchel S, Nielsen DS. 2012. Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. **International Journal of Food Microbiology**, 152:181-8.

Taglietti A, Arciola CR, Agostino AD, Dacarro G, Montanaro L, Campoccia D, Cucca L, Vercellino M, Poggi A, Pallavicini P, Visai L. 2014. Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. **Biomaterials**, 35:1779-88.

Takahashi H, Miya S, Igarashi K, Suda T, Kuramoto S, Kimura B. 2009. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. **Journal of Food Protection**, 72(7):1476-80.

Tang HQ, Feng HJ, Zheng JH, Zhao J. 2007a. A study on antibacterial properties of Ag<sup>+</sup> implanted pyrolytic carbon. **Surface Coatings and Technology**, 201:5633-6.

Tang HQ, Liu T, Liu X, Gu HQ, Zhao J. 2007b. A study on biocompatibility and bactericidal properties of pyrolytic carbon by silver ion implantation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, 255:304-8.

Tondo EC, Machado TRM, Malheiros PS, Padrão DK, De Carvalho AL, Brandelli A. 2010. Adhesion and biocides inactivation of Salmonella on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41(4):1027-37.

Tondo EC, Ritter AC. 2012. Salmonella and Salmonellosis in Southern Brazil: A Review of the Last Decade. In: **Salmonella Classification, Genetics and Disease Outbreaks**. Nova Iorque: Nova Science Publishers Inc. p. 175-181.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2012. Microbiologia. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed.

Trentin DS, Bonatto F, Zimmer KR, Ribeiro VB, Antunes ALS, Barth AL, Soares GV, Krug C, Baumvol IJR, Macedo AJ. 2014. N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. **Surface & Coatings Technology**, 245:84-91.

Van Houdt R, Michiels CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal Applied Microbiology**, 109(4):1117-31.

Venugopal B, Luckey TD. 1978. **Metal Toxicity in Mammals: 2**. Chemical Toxicity of Metals and Metalloids. New York: Plenum Press. p. 32-36.

Wang J, Xiong J, Peng Q, Fan H, Wang Y, Li G, Shen B. 2009. Effects of DC plasma nitriding parameters on microstructure and properties of 304L stainless steel. **Materials Characterization**, 60:197-203.

Wan YZ, Raman S, He F, Huang Y. 2007. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper. **Vacuum**, 81:1114-8.

Widgerow S. 2008. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. In: **Wound Healing Southern Africa**, 1(2):05-07.

Williams JM, Gonzales A, Quintana J, Lee IS, Buchanan RA, Burns FC, Culbertson RJ, Levy M, Treglio JR. 1991. Ion implantation for corrosion inhibition of aluminum alloys in saline media. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, 59-60(2):845-50.

Wilks SA, Michels HT, Keevil CW. 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. **International Journal of Food Microbiology**, 111:93-8.

Wirtanen G, Husmark U, Mattila-Sandholm T. 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, 59(7):727-33.

Whitehead KA, Verran J. 2006. The effect of surface topography on the retention on microorganisms. **Food and Bioproducts Processing**, 84(C4):253-9.

Xavier JB, Piciooreanu C, Almeida JS, Loosdrecht MCM. 2005. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, 1:1-12.

Yang SM, Chena YC, Pan YT, Lin DY. 2016. Effect of silver on microstructure and antibacterial property of 2205 duplex stainless steel. **Materials Science and Engineering C**, 63:376-83.

Yuranova T, Rincon AG, Bozzi A, Parra S, Pulgarin C, Albers P, Kiwi J. 2003. Antibacterial textiles prepared by RF-plasma and vacuum-UV mediated deposition of silver. J. Photochem. **Photobiol. A Chem.**, 161:27-34.

Zeraik AN, Nitschke M. 2010. Biosurfactants as Agents to Reduce Adhesion of Pathogenic Bacteria to Polystyrene Surfaces: Effect of Temperature and Hydrophobicity. **Current Microbiology**, 61:554-9.

Zhao Q, Liu Y, Wang C, Wang S, Peng N, Jeynes C. 2008. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Medical Engineering & Physics**, 30:341-9.

Zhao T, Podtburg TC, Zhao P, Chen D, Baker DA, Cords B. 2013. Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, 76:601-7.