



UNICAMP

MARIA AMELIA DE JESUS PITON

**“FORMAÇÃO DE BIOFILMES E PRODUÇÃO DE  
MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM*  
*SENSING* POR CEPAS DE *Salmonella* spp.  
ISOLADAS DE PROCESSAMENTO DE FRANGO”**

**CAMPINAS  
2012**





UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIA AMELIA DE JESUS PITON

**“FORMAÇÃO DE BIOFILMES E PRODUÇÃO DE  
MOLÉCULAS SINALIZADORAS DE *QUORUM SENSING*  
POR CEPAS DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE  
PROCESSAMENTO DE FRANGO”**

**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA AMELIA DE JESUS PITON  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. ARNALDO YOSHITERU KUAYE

PROF. DR. ARNALDO YOSHITERU KUAYE

**CAMPINAS  
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

P683f Piton, Maria Amelia de Jesus  
Formação de biofilmes e produção de moléculas  
sinalizadoras de *quorum sensing* por cepas de *Salmonella*  
spp. isoladas de processamento de frango / Maria Amelia  
de Jesus Piton. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Salmonella*. 2. Biofilme. 3. Quorum-sensing. 4.  
Indústria de frangos. 5. Segurança alimentar. I. Kuaye,  
Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês:

Biofilm formation and production of quorum sensing signaling molecules by  
strains of *Salmonella* spp. isolated from chicken processing.

Palavras-chave em inglês:

*Salmonella*

Biofilm

Quorum-sensing

Poultry industry

Food safety

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Arnaldo Yoshiteru Kuaye [Orientador]

Ernani Porto

José Luiz Pereira

Lucia Regina Durrant

Luciana Maria Ramires Esper

Data da defesa: 03-12-2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Orientador (Presidente)

---

Prof. Dr. Ernani Porto  
(Membro Titular)

---

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
(Membro Titular)

---

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant  
(Membro Titular)

---

Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper  
(Membro Titular)

---

Profa. Dra. Karen Signori Pereira  
(Membro Suplente)

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Borges  
(Membro Suplente)

---

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira  
(Membro Suplente)



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

*Albert Einstein*



## AGRADECIMENTOS

*A Deus, que me acompanha sempre e me dá sabedoria e forças para vencer os desafios de cada dia.*

*À minha mãe Itací, ao meu pai Antônio Ângelo, à minha irmã Siméia e ao meu cunhado Henrique, pelo apoio, incentivo e carinho demonstrados em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu querido marido Marcos, pelas muitas e futuras conquistas, companheirismo, amor, compreensão e paciência nos momentos difíceis e pela ajuda na elaboração deste trabalho.*

*Ao Prof. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela confiança e orientação e pelos ensinamentos que me transmitiu durante estes anos de trabalho.*

*À Profa. Dirce Kabuki, pelas sugestões, amizade, convívio e ensinamentos, fundamentais para a realização deste trabalho.*

*Aos colegas do laboratório: Aninha, Graci, Isa, Juliana, Luciana Esper, Marcília, Marisa, Meg, pela amizade, generosidade e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.*

*Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Ernani Porto, Prof. Dr. José Luiz Pereira, Profa. Dra. Lucia Regina Durrant, Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper, Profa. Dra. Karen*

*Signorí Pereira, Profa. Maria de Fátima Borges e Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira, pelas importantes sugestões para a elaboração do trabalho final.*

*Ao Eng. Ettore Cortese, representante da BMG Labtech, pela generosidade em emprestar o “FLUOStar Ômega” para a realização dos testes de bioluminescência e por tornar a aquisição do equipamento uma realidade.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo recurso concedido para a aquisição de materiais, reagentes e equipamento.*

*Às empresas fabricantes dos discos de antimicrobianos, CEFAR® e CECON®, pela doação das amostras para os testes de resistência.*

*Às empresas Veros Produtos Químicos Ltda. e Farmabase Saúde Animal Ltda. pela doação das amostras de dióxido de cloro estabilizado e FARMASEPT PLUS®, respectivamente, para a realização dos testes de eficiência.*

*A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho,*

*Muito obrigada!*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>XIX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>5</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
3.1 A cadeia produtiva de frangos de corte .....	7
3.2 O gênero <i>Salmonella</i> .....	12
3.3 Sorotipos de <i>Salmonella</i> .....	13
3.3.1 Antígeno somático (O).....	15
3.3.2 Antígeno flagelar (H) .....	15
3.3.3 Antígeno capsular (Vi) .....	17
3.4 Fagotipos de <i>Salmonella</i> .....	18
3.5 Resistência de <i>Salmonella</i> spp. a antimicrobianos .....	19
3.6 <i>Salmonella</i> spp. e a formação de biofilmes .....	21
3.6.1 Etapas da formação de biofilmes.....	22
3.6.2 Biofilmes formados por multiespécies.....	25
3.7 Ação de sanitizantes no controle de <i>Salmonella</i> spp.....	27
3.7.1 Hipoclorito de Sódio .....	29
3.7.2 Dióxido de cloro.....	30
3.7.3 Ácido peracético.....	31
3.7.4 Compostos de amônio quaternário .....	31
3.7.5 Glutaraldeído.....	32
3.8 Sistemas <i>Quorum sensing</i> .....	33
3.8.1 <i>Quorum sensing</i> em <i>Salmonella</i> spp. ....	37
3.9 Sistemas <i>Quorum quenching</i> .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Cepas bacterianas .....	41
4.2 Determinação da resistência a antimicrobianos .....	42
4.3 Determinação da formação de biofilme .....	43

4.3.1	Superfície de aço inoxidável .....	43
4.3.2	Obtenção do inóculo.....	44
4.3.3	Formação de biofilme e determinação de células sésseis .....	45
4.3.4	Microscopia eletrônica de varredura .....	46
4.4	Avaliação da eficiência dos sanitizantes sobre biofilmes.....	47
4.4.1	Preparo das soluções de sanitizantes .....	47
4.4.2	Ação dos sanitizantes sobre os biofilmes .....	48
4.5	Análises estatísticas.....	49
4.6	Avaliação da presença dos genes <i>sdia</i> e <i>luxs</i> .....	49
4.6.1	Primers utilizados .....	49
4.6.2	Extração do DNA.....	49
4.6.3	Reação em cadeia da Polimerase (PCR) .....	50
4.6.3.1	Gene <i>sdia</i> .....	50
4.6.3.2	Gene <i>luxs</i> .....	51
4.7	Detecção de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> AI-2 .....	51
4.7.1	Cepas bacterianas.....	51
4.7.2	Preparo dos sobrenadantes e cultivos.....	52
4.7.3	Detecção de AI-2.....	53
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
5.1	Frequência dos sorotipos isolados .....	55
5.2	Avaliação da Resistência a antimicrobianos.....	56
5.3	Avaliação da formação de Biofilmes.....	64
5.3.1	Formação de biofilme em cultivo isolado .....	65
5.3.2	Formação de biofilme em cultivo misto.....	72
5.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	77
5.4	Avaliação da eficiência de sanitizantes .....	83
5.5	Avaliação da presença dos genes <i>sdia</i> e <i>luxs</i> .....	89
5.6	Detecção de moléculas sinalizadoras de <i>quorum sensing</i> AI-2 .....	92
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fluxograma do Processo: cortes de frango e frango congelado ou resfriado com pés, cabeça, fígado e moela definido em abatedouro avícola pertencente à Região Metropolitana de Campinas.....	11
<b>Figura 2.</b>	Estrutura antigênica de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> .....	14
<b>Figura 3.</b>	Principais genes envolvidos na variação de fase flagelar em <i>Salmonella</i> spp. ....	17
<b>Figura 4.</b>	Etapas do desenvolvimento de um biofilme bacteriano. 1. Adesão reversível; 2. Adesão irreversível; 3. Crescimento do biofilme; 4. Maturação do biofilme; 5. Dispersão. ....	23
<b>Figura 5.</b>	Desenvolvimento de um biofilme multiespécie. (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) adesão de células individuais, de células agregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro. ....	27
<b>Figura 6.</b>	Sistemas <i>quorum sensing</i> : sistema AI-2 (direita); sistema AI-1 (meio) e sistema AIP (esquerda). ....	35
<b>Figura 7.</b>	Sistema SdiA de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Typhimurium .....	38
<b>Figura 8.</b>	População (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células sésseis de sorotipos de <i>Salmonella</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivos isolados em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.....	65
<b>Figura 9.</b>	População (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células sésseis de sorotipos de <i>Salmonella</i> sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivos isolados em água peptonada tamponada (APT) 0,1% a 20°C.....	66
<b>Figura 10.</b>	População (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células sésseis de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Enteritidis P1-64 e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivo misto e isolado em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.....	73

- Figura 11.** População (log UFC/cm<sup>2</sup>) de células sésseis de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1- 64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivo misto e isolado em água peptonada tamponada (APT) 0,1% a 20°C..... 74
- Figura 12.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, no aumento de 4000X. a) não submetida ao processo formação de biofilme; b) submetida ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Newport P1-44 a 20°C por 48 horas, em seguida remoção do biofilme formado por agitação constante em vórtex por 2 minutos..... 78
- Figura 13.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium P1-21 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a) e 4000X (b)..... 79
- Figura 14.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Newport P1-44 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a), 4000X (b) e 8000X (c)..... 79
- Figura 15.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Senftenberg P1-50 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a) e 8000X (b)..... 80
- Figura 16.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Infantis P1-59 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a), 4000X (b) e 20000(c)..... 80
- Figura 17.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 2000X (a), 5000X (b) e 8000X (c)..... 81
- Figura 18.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme multiespécie por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 e

- Enterococcus faecalis* ATCC 7080, a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a), 5000X (b) e 8000 (c)..... 82
- Figura 19.** Reduções (log UFC/cm<sup>2</sup>) das contagens de células sésseis de sorotipos de *Salmonella* em biofilmes formados em superfície de aço inoxidável AISI 304 #4 por 48 horas a 20°C, em caldo de soja e tripticaseína (TSB), após tratamento com água destilada estéril e sanitizantes por 15 minutos..... 83
- Figura 20.** Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *sdia* em *Salmonella* spp.. **1.** Marcador de peso molecular 100 pb; **2.** Controle positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC14028; **3.** *S.* Typhimurium (cepa P1-21); **4.** *S.* Newport (cepa P1-44); **5.** *S.* Senftenberg (cepa P1-50); **6.** *S.* Infantis (cepa P1-59); **7.** *S.* Enteritidis (cepa P1-64); **8.** *S.* Agona (cepa P1-27); **9.** *S.* Schwarzengrund (cepa P1-35); **10.** Controle negativo. .... 89
- Figura 21.** Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *luxs* em *Salmonella* spp.. **1 e 17.** Marcador de peso molecular 1Kb; **2 e 18.** Controle negativo; **16 e 32.** Marcador de peso molecular 100 pb; **3 a 15, 19 a 31.** Cepas *Salmonella* spp. (P1-27 a P1-52)..... 91
- Figura 22.** Indução de bioluminescência em amostras de *Vibrio harveyi* BB170 para detecção de autoindutor AI-2 de sobrenadantes de sorotipos de *Salmonella* cultivados em caldo Luria-Bertani (LB) contendo 0,5% de glicose. \*Indução da bioluminescência= RLU amostra/ RLU controle negativo. RLU= *relative light units*..... 93



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Frequência de sorotipos de <i>Salmonella</i> isolados no período de Maio/2004 a Maio/2006, de amostras provenientes de empresa avícola pertencente à região metropolitana de Campinas-SP.....	42
<b>Tabela 2.</b>	Distribuição dos padrões de resistência de <i>Salmonella</i> spp.....	57
<b>Tabela 3.</b>	Sensibilidade a antimicrobianos de 65 cepas de <i>Salmonella</i> isoladas de carcaças e cortes de frango prontos para o consumo e em fezes de aves vivas reprodutoras no período de 2004 a 2006.....	58
<b>Tabela 4.</b>	Percentagem de resistência a antimicrobianos dos sorotipos de <i>Salmonella</i> isolados no produto final e em granjas no período de 2004 a 2006.....	61
<b>Tabela 5.</b>	Percentagem de resistência a antimicrobianos das 39 cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas no produto final (carcaças e cortes de frango) no período de 2004 a 2006. ....	62
<b>Tabela 6.</b>	Percentagem de resistência a antimicrobianos das 26 cepas de <i>Salmonella</i> isoladas nos matrizeiros (aves vivas reprodutoras e farinha de penas) no período de 2004 a 2006.....	63
<b>Tabela 7.</b>	População de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 em biofilmes formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.....	67
<b>Tabela 8.</b>	População de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 em biofilmes formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em água peptonada tamponada a 0,1% (APT) a 20°C.....	68
<b>Tabela 9.</b>	População de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Enteritidis P1-64 e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080, em biofilme multiespécie formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.....	75
<b>Tabela 10.</b>	População de <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Enteritidis P1-64 e <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080, em biofilme multiespécie formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em água peptonada tamponada (APT) 0,1% a 20°C.....	75

<b>Tabela 11.</b> Efeito de sanitizantes sobre biofilme de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> formados a 20°C por 48 horas em cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB).....	84
<b>Tabela 12.</b> Indução de bioluminescência em cepas de <i>Vibrio harveyi</i> BB170 para detecção de autoindutor AI-2 de sobrenadantes de <i>Salmonella</i> spp. cultivadas a 30°C por 6 horas em Luria-Bertani (LB) com 0,5% de glicose.....	94
<b>Tabela 12.</b> Indução de bioluminescência em cepas de <i>Vibrio harveyi</i> BB170 para detecção de autoindutor AI-2 de sobrenadantes de <i>Salmonella</i> spp. cultivadas a 30°C por 6 horas em Luria-Bertani (LB) com 0,5% de glicose (continuação). .....	95

## RESUMO

Apesar da implantação de ferramentas e programas de controle para redução da incidência de *Salmonella* spp. nas granjas e abatedouros avícolas, a prevalência deste patógeno na cadeia produtiva avícola ainda é representativa. A adesão dos micro-organismos à superfície de equipamentos utilizados no processamento de alimentos resulta em graves problemas, pois atua como fonte de contaminação. Estes agregados de células com altas densidades populacionais presentes na superfície podem produzir moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* responsáveis pela expressão de características fenotípicas específicas, dentre elas substâncias envolvidas na formação de biofilme. Uma vez instalado o biofilme, a resistência desses organismos aumenta, dificultando a ação dos sanitizantes, comprometendo a qualidade dos alimentos, além de aumentar os riscos à saúde pública. Um total de 65 cepas de *Salmonella*, sendo 39 isoladas de carcaças e cortes de frango e 26 isoladas de amostras de granjas, foi caracterizado quanto aos sorotipos e resistência a 24 antimicrobianos. O sorotipo Enteritidis foi o predominante representando 67,7% das cepas, seguido do sorotipo Newport com 7,7%. Um total de 10 padrões de resistência foi identificado, sendo que 96,9% das cepas apresentaram resistência a bacitracina, 87,7% a eritromicina, 83% ao ácido nalidíxico. Um total de cinco diferentes sorotipos isolados das aves vivas e também do produto final (Typhimurium, Enteritidis, Newport, Senftenberg e Infantis) foi avaliado quanto à formação de biofilmes à temperatura de 20°C após 2, 4, 8, 16, 24 e 48 horas nos meios de cultivo caldo de soja e tripticaseína (TSB) e água peptonada tamponada (APT) a 0,1%. Após 48 horas, as cepas avaliadas foram capazes de formar biofilmes sobre a superfície de cupons de aço inoxidável nos dois meios de cultivo, sendo Newport, o sorotipo que apresentou maior contagem de células aderidas em meio TSB. Em cultivo misto de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 e *Salmonella* Enteritidis, em meio TSB, verificou-se que ambos são capazes de formar biofilmes sobre a superfície de aço inoxidável de forma independente com predomínio do *Enterococcus faecalis* após 48 horas. Porém, em meio APT 0,1%, em cultivo misto, as células de

*Enterococcus faecalis* aderiram à superfície somente após a adesão inicial das células de *Salmonella* Enteritidis. Os sanitizantes FARMASEPT PLUS® 0,1% e ácido peracético 300 ml.L<sup>-1</sup> foram os mais eficientes, seguido do hipoclorito de sódio a 5 mg.L<sup>-1</sup>. O dióxido de cloro estabilizado a 100 mg.L<sup>-1</sup> se mostrou o menos eficiente com redução de apenas 1 log UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas. Todas as 65 cepas de *Salmonella* também foram submetidas à pesquisa dos genes *luxs* e *sdia* relacionados ao sistema *quorum sensing* e à pesquisa de moléculas autoindutoras AI-2, utilizando o biossensor *Vibrio harveyi* BB170. Todas as cepas apresentaram os genes *luxs* e *sdia* e foram positivas para AI-2 nos testes de bioluminescência, com índices que variaram entre 1,13 a 1,30. Compreender a dinâmica de comunicação intercelular por meio de moléculas autoindutoras de *quorum sensing* e relacionar com a expressão de fatores de virulência pode esclarecer aspectos relevantes e possibilitar o desenvolvimento de estratégias para o controle de patógenos na indústria de alimentos.

## ABSTRACT

In spite of the implementation of control programs for *Salmonella* rating reduction in poultry breeding farms and slaughterhouses, the prevalence of this pathogenic agent, which is considered the main cause of foodborne diseases, is still significant. Microorganism adhesion and biofilm formation on food processing equipment surfaces result in severe problems, since they act as the source of food contamination. These cell aggregates have a high population density on the surface and may produce quorum sensing signaling molecules. These molecules are responsible for the expression of specific phenotypic characteristics, such as the substances involved in biofilm formation. Once the biofilm is present, the resistance of the organisms increases, impairing the action of sanitizing agents and compromising food quality, which raises the risks to public health. 65 strains of *Salmonella*, 39 isolated from broiler carcasses and 26 isolated from poultry breeding farms, had their serotypes and resistance to 24 antimicrobial agents characterized. The predominant serotype was Enteritidis (67.7% of the strains), followed by the Newport serotype (7.7% of the strains). A total of 10 resistance patterns were identified. 96.9% of strains were resistant to bacitracin, 87.7% to erythromycin and 83% to nalidixic acid. 5 different serotypes, isolated from poultry breeding farms and from the final product (Typhimurium, Enteritidis, Newport, Senftenberg and Infantis), had the biofilm formation evaluated at 20° C after 2, 4, 8, 16, 24 and 48 hours, in *Tryptic Soy Broth* (TSB) and 0.1% buffered peptone water (BPW) media. After 48 hours, the strains were able to produce biofilms on the surface of stainless steel coupons in both cultivation media. The Newport serotype, in TSB, presented the highest count of attached cells. *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 and *Salmonella* Enteritidis, in mixed cultivation in TSB, were both able to produce biofilms on the surface of stainless steel independently, with the predominance of *Enterococcus faecalis* after 48 hours. However, the cells of *Enterococcus faecalis* attached to the surface only after the initial adhesion of *Salmonella* Enteritidis cells, in mixed cultivation in BPW. FARMASEPT PLUS® 0.1% and peracetic acid 300 ml.L<sup>-1</sup> were the most efficient sanitizers, followed by

sodium hypochlorite 5 mg.L<sup>-1</sup>. Stabilized chlorine dioxide 100 mg.L<sup>-1</sup> was the least efficient sanitizer, presenting an adhered cell reduction of only 1 log cfu/cm<sup>2</sup>. All 65 *Salmonella* strains were also subjected to gene probing for *luxs* and *sdia* genes, which are related to the quorum sensing system. Biosensor *Vibrio harveyi* BB170 was also used for all these strains to detect autoinducer AI-2 signaling molecules. All strains presented *luxs* and *sdia* genes. The bioluminescence tests were positive for AI-2, with values that ranged from 1.13 to 1.30. Understanding the intercellular communication dynamic, which occurs through quorum sensing signaling molecules, and its relation to the expression of virulence factors may clarify relevant aspects and make the development of pathogen control strategies in the food industry possible.

# 1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) têm sido, nos últimos anos em todo o mundo, motivo de discussões sobre as estratégias que permitam o seu controle e, conseqüentemente, a garantia de produtos seguros no mercado. O rápido crescimento da indústria avícola proporcionou uma fonte de proteína rapidamente disponível e de custo reduzido, porém permitiu o aumento dos índices de infecção das aves e, conseqüentemente a contaminação das carcaças por patógenos (SILVA, 1995; VIEIRA, TEIXEIRA, 1997).

Diversos trabalhos relacionados a programas de segurança dos alimentos relatam a importância do gênero *Salmonella* como um dos principais causadores de doenças veiculadas por alimentos em humanos (COX, HAMMACK, ANDREWS, 1999; PATRICK et al., 2004; GUERIN et al., 2006; BOYLE et al., 2007). O patógeno possui uma ampla gama de reservatórios animais, apresentando a habilidade de sobreviver e persistir no ambiente.

O controle de *Salmonella* spp. na indústria avícola passou a ser implantado em 1994 com a Portaria nº 193, de 19 de Setembro, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que estruturou e consolidou o Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (BRASIL, 1994) e norteou o desenvolvimento de programas sanitários para controle das principais doenças aviárias, dentre elas a salmonelose. Apesar dos esforços para o controle do patógeno na produção avícola e na indústria, os índices de infecções decorrentes do consumo de alimentos contaminados por este gênero continuam altos. No Estado de São Paulo, dados do Centro de Vigilância Epidemiológica correspondentes ao período de 1999 a 2008, demonstram que 43% dos surtos de doenças bacterianas veiculadas por alimentos são causados por *Salmonella*, sendo a *Salmonella* Enteritidis o principal sorotipo envolvido (EDUARDO et al., 2008). Nos Estados Unidos da América, os dados de 2009 do Centers For Disease Control and Prevention apontam o sorotipo Enteritidis como o principal envolvido em DTAs, representando 17,5% dos isolados, seguido do sorotipo Typhimurium (15%) e

Newport (9,3%) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012).

A avicultura apresenta uma cadeia produtiva ampla e complexa com características próprias e pontos críticos vulneráveis à contaminação por *Salmonella*. No sistema de integração, isto é, sistema de parceria entre indústrias e proprietários de granjas, os granjeiros recebem da indústria pintos de corte, insumos, assistência técnica e disponibilizam seus aviários e mão-de-obra para a criação dos frangos de corte. A constante introdução de insumos como ração e também falhas nas boas práticas de manejo durante a criação das aves podem favorecer a disseminação da *Salmonella*. Os níveis de contaminação podem ser altos e difíceis de conter caracterizando uma contaminação persistente no ambiente. Aves contaminadas nas granjas podem introduzir o patógeno na linha de abate, contaminando equipamentos e, subsequentemente, o produto final.

Sob condições favoráveis e quando ocorrem falhas no processo de higienização, bactérias do gênero *Salmonella* são capazes de formar biofilmes (AUSTIN et al., 1998; BONAFONTE et al., 2000), muitas vezes resistentes aos sanitizantes usualmente utilizados nas indústrias (JOSEPH, OTTA, KARUNASAGAR, 2001). Os biofilmes são constituídos de agregados de células em uma matriz extracelular e podem apresentar o fenômeno *quorum sensing*, isto é, processo de comunicação intra e interespecies microbianas por meio de moléculas autoindutoras, que permitem aos micro-organismos, apresentarem alterações fenotípicas como esporulação, formação de biofilmes, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, pigmentação e bioluminescência (WHITEHEAD et al., 2001; WATERS, BASSLER, 2005; CHOI, SHIN, RYU, 2007; BEARSON, B., BEARSON, S., 2008; NADELL et al., 2008). Bactérias do gênero *Salmonella* estão inseridas no grupo de patógenos que utilizam esta via de sinalização *quorum sensing* por meio de moléculas denominadas autoindutor AI-2, produto do gene *luxS*, envolvido na comunicação entre as espécies (AHMER, 2004; WATERS, BASSLER, 2005; WALTERS, SPERANDIO, 2006; CHOI, SHIN, RYU, 2007; BEARSON, B.; BEARSON, S., 2008).

Neste trabalho, foram investigadas 65 cepas de *Salmonella* isoladas da cadeia produtiva de frango, sendo 39 isoladas de carcaças e cortes de frango, 1 isolada de farinha de penas utilizada na produção de ração e 25 isoladas de amostras de fezes de aves vivas reprodutoras. As 65 cepas foram encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro para a determinação dos sorotipos. Também foram caracterizadas fenotipicamente quanto ao padrão de resistência a antimicrobianos utilizando o método de difusão em ágar. A partir dos dados fenotípicos, foram selecionadas cinco cepas de *Salmonella* com perfis distintos, isoladas de amostras dos plantéis e também de produto final. Estas cepas selecionadas foram avaliadas quanto à adesão e formação de biofilme utilizando cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 na presença e na ausência de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 e foram também submetidas à análise de resistência à ação de alguns produtos sanitizantes frequentemente utilizados nos procedimentos de higienização dos abatedouros avícolas. Em uma segunda etapa do trabalho, a capacidade de produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* pelas cepas isoladas, foi investigada utilizando o biossensor *Vibrio harveyi* BB170, que na presença do autoindutor AI-2, produz bioluminescência. Também foi pesquisada a presença dos genes *luxS* e *sdia*, relacionados ao fenômeno *quorum sensing* em *Salmonella* spp.

Compreender esta dinâmica de comunicação intercelular por meio de moléculas autoindutoras sinalizadoras de *quorum sensing* e relacionar com a expressão gênica, principalmente de fatores de virulência, podem esclarecer aspectos relevantes e possibilitar estratégias para o seu controle.



## 2. OBJETIVO GERAL

Pesquisar a adesão, formação de biofilmes e produção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* por cepas de *Salmonella* isoladas de amostras coletadas em granjas e abatedouro avícola, pertencentes à cadeia produtiva de frangos de corte.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as cepas de *Salmonella* isoladas no processamento de frangos, quanto aos sorotipos e determinar o perfil de resistência a antimicrobianos.
- Avaliar e comparar a formação de biofilmes à temperatura de 20°C sobre a superfície de aço inoxidável por diferentes sorotipos de *Salmonella*.
- Avaliar a resistência do biofilme formado aos principais sanitizantes utilizados nos procedimentos de higienização dos abatedouros avícolas: hipoclorito de sódio a 5 mg.L<sup>-1</sup>, ácido peracético a 300 mg.L<sup>-1</sup>, dióxido de cloro estabilizado a 100 mg.L<sup>-1</sup> e FARMASEPT PLUS® a 0,1% (composto de cloreto benzalcônio 7,5% e glutaraldeído 42,5%).
- Avaliar a interação de cepas de *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 na formação de biofilmes.
- Pesquisar a presença dos genes *luxS* e *sdia*, relacionados ao fenômeno *quorum sensing* em *Salmonella* spp., usando a técnica de PCR.

- Pesquisar a presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2 produzidas pelas cepas de *Salmonella* utilizando o biossensor *Vibrio harveyi* BB170.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A cadeia produtiva de frangos de corte

A indústria avícola brasileira está entre as mais produtivas do setor agroindustrial. Segundo a União Brasileira de Avicultura, a produção de carne de frango alcançou 13,05 milhões de toneladas em 2011, um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Foram exportados 3,94 milhões de toneladas de carne de frango, para mais de 150 países, representando um aumento de 3,2% a mais que no ano de 2010. Dentre os produtos, as exportações de cortes somaram 2,06 milhões de toneladas (+4,8%) e receita cambial de US\$ 4.4 bilhões (+26%). As vendas de frango inteiro totalizaram 1,50 milhão de toneladas (+0,9%), com receita de US\$ 2.6 bilhões (+15%) (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2012). A manutenção e o crescimento desse positivo desempenho da indústria avícola brasileira dependem muito dos parâmetros higiênico-sanitários que garantem um produto seguro e de qualidade, exigências cada vez maiores por parte do mercado consumidor.

No Brasil, a implantação do programa “Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle” (HACCP/ APPCC) nos anos 90 na cadeia produtiva, tanto na fase de criação como no abate, contribuiu para a melhoria da qualidade e segurança dos produtos. O programa contempla uma metodologia preventiva, com o objetivo de evitar potenciais riscos que possam causar danos aos consumidores, eliminando ou reduzindo os riscos e perigos em todas as etapas do processamento industrial, desde a matéria-prima até o consumo do alimento (BRASIL, 1998a). As Boas Práticas de Manejo (BPM) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) suprem com informações necessárias os técnicos, granjeiros e colaboradores envolvidos no processo produtivo para um programa efetivo de redução, prevenção ou eliminação do patógeno nas fases que antecedem o abate até o produto final (BRASIL, 1994, BRASIL, 1997, BRASIL, 1998a,b).

Nas granjas e incubatórios, alguns procedimentos são adotados como rotina no manejo das aves com o objetivo de evitar a disseminação da *Salmonella*:

limpeza e desinfecção de galpões, aquisição de aves de linhagens resistentes, monitoramento dos lotes e implantação de programas de vigilância bacteriológica e sorológica, controle de roedores, pássaros e insetos (BRASIL, 1994).

Roedores excretam grande quantidade de *Salmonella* em suas fezes, disseminando-a no ambiente. Snow et al. (2008) e Carrique-Mas et al. (2009), relataram a relação entre presença de roedores, infecção e persistência da *Salmonella* Enteritidis em lotes de aves de postura comercial, demonstrando que o controle de roedores nos estabelecimentos avícolas é imprescindível. Insetos como baratas, besouros e moscas, além de servirem como fontes de contaminação para as aves, facilitam a disseminação de micro-organismos patogênicos entre os lotes, incluindo os do gênero *Salmonella* (KOPANIC, SHELDON, WRIGHT, 1994; OLSEN, HAMMACK, 2000; ROCHE et al., 2009).

A ração também representa um veículo na transmissão de patógenos. As principais fontes de contaminação por *Salmonella* spp. nas fábricas de ração são os ingredientes utilizados (JONES, RICHARDSON, 2004). Em um estudo com 60 amostras de farinha de carne e ossos e 60 de farinha de sangue, constituintes de ração para animais, foram identificadas 25 amostras positivas para *Salmonella* spp. (CALIXTO et al., 2002). Apesar das matérias-primas de origem animal historicamente estarem relacionadas ao aumento do risco de contaminação por *Salmonella* spp., atualmente sabe-se que os ingredientes de origem vegetal como milho, soja, sorgo e outros também podem representar veículos de patógenos (JONES, RICHARDSON, 2004). Desde a proibição, no final dos anos 80, do uso de farinha de carne e ossos na Grã-Bretanha como medida de controle para Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), houve uma maior demanda na utilização de óleos de sementes, o que tem sido associado ao aumento na prevalência de toxinfecções por *Salmonella* spp. em humanos no mesmo período (DAVIES, HILTON, 2000). Tratamentos térmicos aplicados às rações (como a peletização e extrusão) e químicos (utilização de ácidos orgânicos e formaldeídos) são alternativas utilizadas nas fábricas de rações para o controle de patógenos (TORRES et al., 2011).

A vacinação de plantéis tem sido uma medida recomendada para o controle de infecções das aves por *Salmonella* spp. Estudos relatam um decréscimo nos casos de infecção por *Salmonella* Enteritidis em humanos no Reino Unido concomitantemente à introdução de programas de vacinação em aves para postura comercial (COGAN, HUMPHREY, 2003). Em diversos países, a vacinação de aves comerciais tem sido implementada como um programa nacional de controle contra *Salmonella* Enteritidis (OKAMURA et al., 2007).

Entretanto, ao longo das diversas fases de produção avícola, apesar das inúmeras barreiras higiênico-sanitárias, vários elementos são constantemente incorporados ao processo como exemplos, novos lotes de aves, novas camas e ninhos nos galpões (palha de arroz e/ou maravalha), tornando difícil a implantação e a eficácia do programa APPCC na indústria avícola. Além desse aspecto, alguns fatores são considerados críticos para o controle do patógeno ao longo da cadeia produtiva como a presença de lotes de matrizes reprodutoras positivas para *Salmonella* e aproveitamento de seus ovos para incubação, favorecendo a reinfecção e também a aquisição de ovos de várias procedências sem controles sanitários satisfatórios e adequados. Além do uso de antimicrobianos, que contribui para potencializar a distribuição de cepas resistentes.

A busca da otimização econômica dos incubatórios com locação de espaços de incubação, muitas vezes inadequados e a ampliação de turnos de trabalho nos abatedouros dificultam o controle e higienização necessários favorecendo a permanência de patógenos no ambiente. Contaminações cruzadas podem ocorrer nos abatedouros, onde as misturas de aves infectadas e não infectadas possibilitam a distribuição do patógeno em diferentes pontos da linha de abate, causando a contaminação do produto final.

No Brasil, várias medidas foram criadas com o objetivo de controlar a produção dos alimentos e diminuir os riscos aos consumidores. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2001 com a RDC nº12, os padrões microbiológicos para alimentos que determina ausência de *Salmonella* em 25 g em amostra de produtos cárneos; e a RDC nº13, o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves

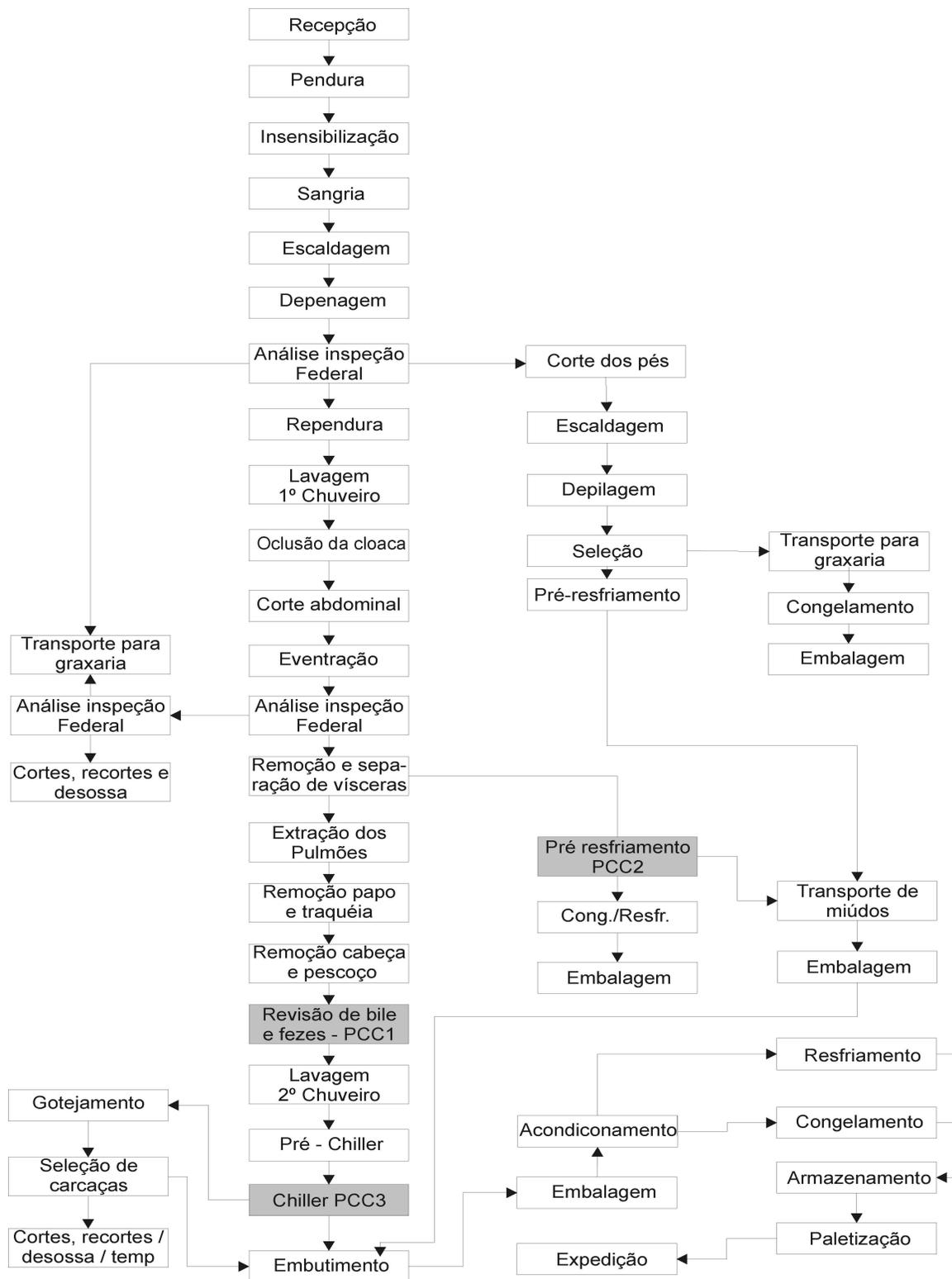
e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados, como medida para auxiliar o consumidor no controle do risco de contaminação por *Salmonella* spp. associado ao consumo destes alimentos (BRASIL, 2001a,b).

Em 2003, O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus. Este programa implementa a análise contínua de carcaças *in natura*, em laboratórios credenciados pelo MAPA, para pesquisa de *Salmonella* spp. em todos os estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal (BRASIL, 2003b).

Nos abatedouros, a implantação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) vem contribuindo para o controle de contaminação por patógenos no processamento de frangos. Essa ferramenta, estabelecida no Brasil em 1993 pela Portaria 1428 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993) e em 1998 pela portaria nº46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998a), tem como objetivo avaliar a eficácia e efetividade dos processos, meios e instalações, assim como dos controles utilizados na produção, armazenamento, transporte, distribuição, comercialização e consumo de alimentos a fim de proteger a saúde o consumidor.

O sistema APPCC recomenda que cada estabelecimento industrial defina seus próprios pontos críticos de controle (PCCs), de acordo com as características de suas instalações, equipamentos, especificidade de operações e recursos disponíveis (BRASIL, 1998a).

Após visita a um abatedouro avícola pertencente à região metropolitana de Campinas, elaborou-se o fluxograma de processo de produção de frango inteiro congelado ou resfriado e cortes de frango. As etapas do processo de produção de carcaças e cortes de frango e os pontos críticos de controle (PCCs) definidos como fundamentais no controle do patógeno no frigorífico são apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma do Processo: cortes de frango e frango congelado ou resfriado com pés, cabeça, fígado e moela definido em abatedouro avícola pertencente à Região Metropolitana de Campinas.

O PCC1 consiste na revisão de bile e fezes, quando as carcaças são inspecionadas externamente. As que estiverem em condições de consumo, continuam na linha. Carcaças contaminadas por fezes e bile são retiradas da linha para realização do toalete. Por se tratar de uma etapa visual, é fundamental o treinamento e constante monitoramento dos colaboradores que realizam a revisão das carcaças.

O PCC2 corresponde à etapa de pré-resfriamento de miúdos (coração, fígado e moela) que consiste em manter estes produtos no *chiller* a uma temperatura de 0 a 4°C, com concentração de cloro entre 3 e 5 mg.L<sup>-1</sup> e renovação de água constante de 1,5L por Kg de miúdos. Os miúdos permanecem neste local por 27 minutos. Falhas no controle de temperatura e na concentração de cloro podem promover o crescimento bacteriano.

O PCC3, etapa do *chiller*, consiste em um equipamento semelhante ao anterior, que utiliza água e gelo contendo cloro na concentração de 3 a 5 mg.L<sup>-1</sup>, e temperatura máxima de 4°C. Após a saída do *chiller*, a temperatura máxima no interior das carcaças deve ser de 7°C. O tempo gasto nesta etapa é de 27 minutos, com renovação de água constante de 1 litro por carcaça. Da mesma forma que o PCC2, falhas no monitoramento da temperatura e concentração de cloro no *chiller* podem favorecer o crescimento de patógenos e promover a contaminação cruzada.

### **3.2 O gênero *Salmonella***

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Possuem forma de bastonetes curtos, sendo predominantemente móveis por flagelos peritríquios (exceção feita à *Salmonella Pullorum* e à *Salmonella Galinarum*, que são imóveis), são intracelulares facultativas, anaeróbias facultativas, não esporuladas, fermentam glicose e outros carboidratos, com exceção da sacarose; geralmente produzindo ácido e gás. São oxidase negativa, catalase e lisina descarboxilase positivas e não hidrolisam uréia.

A temperatura considerada ótima para o crescimento destas bactérias é entre 35°C e 37°C (D'AOUST, 2000; HOLT et al., 2000; KAUFMANN, RAUPACH, FINLAY, 2001; POPOFF, Le MINOR, 2005).

Com a utilização de técnicas moleculares, o gênero *Salmonella* é atualmente classificado em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea* foi descrita por Shelobolina et al. (2004), mas segundo Grimont e Weill (2007) esta não pertence ao gênero *Salmonella*. Com base em reações bioquímicas de utilização de açúcares, proteínas e produção de gases, a espécie *Salmonella enterica* foi subdividida em seis subespécies (Le MINOR, POPOFF, 1987; REEVES et al., 1989; EUZÉBY, 2005; GRIMONT, WEILL, 2007).

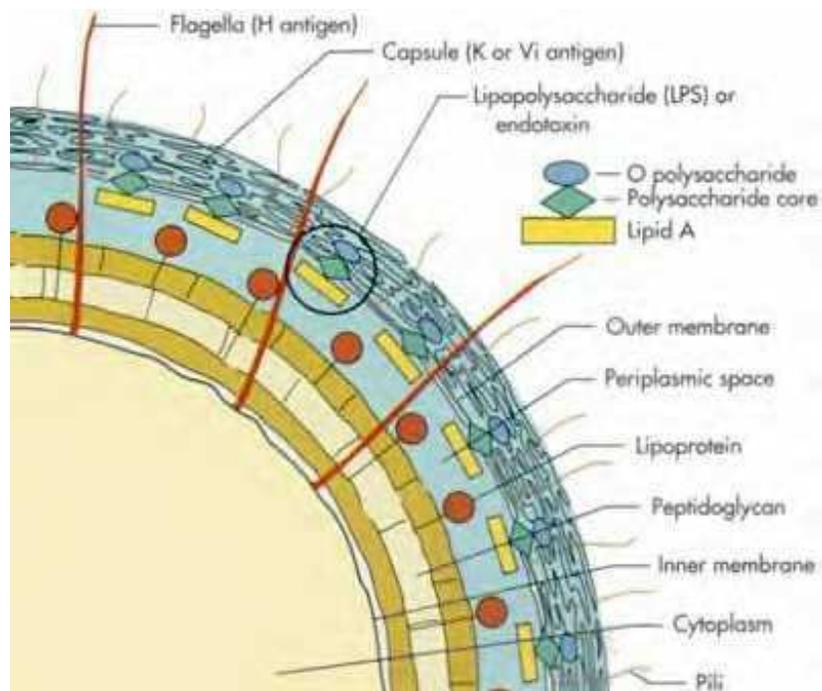
- I - *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
- II - *Salmonella enterica* subsp. *salamae*
- IIIa - *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*
- IIIb - *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
- IV - *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
- VI - *Salmonella enterica* subsp. *indica*

Esta nomenclatura tem sido adotada por vários centros de referência nacional e internacional para sorotipificação de *Salmonella* (BRENNER et al., 2000; POPOFF, Le MINOR, 2005).

### **3.3 Sorotipos de *Salmonella***

A sorotipificação constitui uma importante ferramenta epidemiológica complementar na identificação de cepas de *Salmonella* permitindo determinar a prevalência/emergência ou apontar tendências de um sorotipo em distintas zonas geográficas, bem como identificar surtos, conhecer as fontes de infecção e vias de transmissão.

A sorotipificação é baseada no sistema Kauffmann-White que utiliza os antígenos de superfície: somático (O), flagelares (H) e eventualmente, capsulares (Vi) (FIGURA 2). A combinação dos antígenos somáticos e os antígenos flagelares determina os 2610 sorotipos atualmente descritos, apresentando a seguinte distribuição: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (1547 sorotipos); *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (513 sorotipos); *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (100 sorotipos); *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (341 sorotipos); *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (73 sorotipos); *Salmonella enterica* subsp. *indica* (13 sorotipos); *Salmonella bongori* (23 sorotipos) (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Gast (2007) constatou que aproximadamente 10% do total dos sorotipos descritos foram inicialmente isolados de frangos.



**Figura 2.** Estrutura antigênica de bactérias do gênero *Salmonella*

**Fonte:** Instituto de Salud Pública de Chile, 2012

### 3.3.1 Antígeno somático (O)

O lipopolissacarídeo (LPS), ou endotoxina, é o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas (RICK, 1987). Possui natureza glicolipídica, é termoestável (100 ou 120°C/2h) e essencial à virulência, pois desencadeia resposta imune específica no hospedeiro, tanto humoral (produção de anticorpos) como celular (fagocitose) (MORRISON, RYAN, 1979). O LPS consiste de três partes: Lípideo “A”, constante na família Enterobacteriaceae, corresponde a uma região hidrofóbica, inserida na membrana; “core”, núcleo polissacarídeo, comum a todos os membros de um determinado gênero (formado por glicose, galactose, N-acetilglucosamina, cetodesoxioctonato, outros açúcares com 7 carbonos) e um oligossacarídeo “O”, composto por açúcares com 6 carbonos, como galactose, glucose, ramnose e manose, além de outros açúcares pouco comuns, formando uma sequência de 4 a 5 unidades, cuja repetição confere a característica do oligossacarídeo “O”, região dominante do ponto de vista antigênico. A variação em número, tipo e/ou ligação entre os diferentes açúcares das cadeias determina a especificidade do antígeno (LINDBERG, Le MINOR, 1984; RICK, 1987).

### 3.3.2 Antígeno flagelar (H)

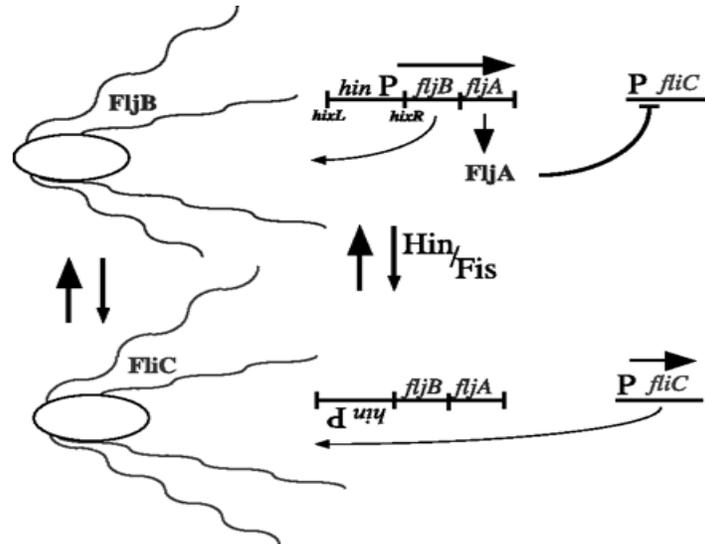
Os antígenos flagelares ou antígeno “H” têm composição protéica, designada flagelina. As diferenças antigênicas surgem devido às variações na estrutura primária, ou conteúdo de aminoácidos das diferentes moléculas de flagelina. Tem como característica importante a termolabilidade podendo ser destruídos a 100°C/10 minutos, bem como após ação lenta do álcool 50°GL e resistentes à solução de formol a 0,5% (MACNAB, 1987a).

A estrutura flagelar é constituída, basicamente, por 3 partes: o filamento helical externo que realiza o trabalho hidrodinâmico em meio aquoso, o gancho conector e o corpo basal constituído de anéis e inserido na membrana celular (LINDBERG, Le MINOR, 1984). O número de flagelos por célula, em cepas de *Salmonella*, varia de 0 a 15, sendo em média 8, distribuídos de forma peritríquia na superfície celular (MACNAB, 1987b). Além da mobilidade conferida às

bactérias, os filamentos flagelares são potentes antígenos que estimulam a produção de anticorpos no hospedeiro (MACNAB, 1987a). Uma característica importante presente na maioria das cepas de *Salmonella* é o fenômeno da variação de fase flagelar. Trata-se de um mecanismo molecular que permite a expressão alternada de duas proteínas do filamento flagelar, a flagelina FliC e a flagelina FliB, que constituem a fase flagelar 1 (H1) e a fase flagelar 2 (H2), respectivamente (MACNAB, 1987a). Os dois genes que codificam estas duas proteínas são homólogos, mas não idênticos, e assim, seus produtos são antigenicamente distintos. O promotor (P) do operon *fljBA* está localizado no segmento contendo o gene *hin* que codifica uma recombinase (Hin) responsável pelo mecanismo de inversão (FIGURA 3) (SILVERMAN, ZIEG, SIMON, 1979; LINDBERG, Le MINOR, 1984).

Em uma orientação, o promotor *fljBA* direciona a transcrição do operon *fljBA* (forma ativa do operon – “ON”) e a flagelina FliB é produzida. O gene *fljA* é co-transcrito com *fljB*, produzindo a proteína inibidora de *fliC*. Nesta orientação, apenas a fase flagelar 2 será expressa. Na orientação alternativa, o operon *fljBA* não é expresso (forma inativa do operon – “OFF”) e a transcrição do gene *fliC* ocorre, uma vez que o mesmo não está bloqueado pela FliA. Assim, apenas a flagelina na fase 1 é expressa (FIGURA 3). Em nível celular, apenas uma fase flagelar é expressa de cada vez e, portanto, uma célula bacteriana possui filamentos homogêneos com uma única especificidade antigênica (ZIEG et al., 1977; ZIEG, SIMON, 1980; LINDBERG, Le MINOR, 1984). A expressão alternada das duas flagelinas ocorre em uma frequência de  $10^3$  a  $10^5$  gerações bacterianas (MACNAB, 1987a). A maioria dos sorotipos de *Salmonella* expressa alternadamente as duas fases flagelares, sendo denominados bifásicos. Aqueles que expressam apenas uma das fases são denominados monofásicos. A maioria dos sorotipos monofásicos não expressa o antígeno flagelar da fase 2. Esses sorotipos monofásicos, teoricamente, não adquiriram um dos genes ou o mecanismo de inversão durante sua evolução, ou então, seriam mutantes das cepas bifásicas que perderam a capacidade de expressar uma das duas fases flagelares (POPOFF, 2001).

A variação de fase confere uma grande vantagem às bactérias. Os micro-organismos podem mudar de fase durante o processo de infecção e assim driblar a ação dos anticorpos do hospedeiro (HERRERA-LEÓN et al., 2004, 2007).



**Figura 3.** Principais genes envolvidos na variação de fase flagelar em *Salmonella* spp.

**Fonte:** ALDRIDGE et al., 2006

### 3.3.3 Antígeno capsular (Vi)

Um terceiro antígeno conhecido é o antígeno capsular. Descoberto em 1934 e nomeado de Vi, devido sua associação com a virulência dos sorotipos. É termolábil, formado por um complexo glicidoprotéico e ocorre somente nos sorotipos Typhi, Paratyphi C e Dublin (GRIMONT, P., GRIMONT, F., BOUVET, 2000). Assim como o antígeno “O”, também confere resistência ao micro-organismo no hospedeiro humano, em especial à fagocitose (IANKOV et al., 2004).

### 3.4 Fagotipos de *Salmonella*

A fagotipagem de *Salmonella* é baseada na diferença de sensibilidade ou resistência das cepas, a uma série de bacteriófagos em determinadas diluições (WARD, DE SA, ROWE, 1987; GRIMONT, P., GRIMONT, F., BOUVET, 2000; DUNKLEY et al., 2009). O padrão de tipagem produzido divide as cepas do sorotipo em questão em variantes resistentes ou sensíveis aos fagos (POPOFF, Le MINOR, 2005). Alguns dos principais sorotipos de *Salmonella* possuem seu esquema específico de fagotipagem, tais como, *Salmonella* Typhimurium (ANDERSON et al., 1977), *Salmonella* Enteritidis (WARD, DE SA, ROWE, 1987), *Salmonella* Heidelberg (DEMCZUK et al., 2003), *Salmonella* Typhi e outros sorotipos (GUINÉE, VAN LEEUWEN, 1978). A fagotipagem representa uma importante ferramenta epidemiológica que permite estudos mais precisos das cepas envolvidas, apontando a flutuação, emergência e re-emergência de alguns fagotipos e possibilitando o reconhecimento daqueles circulantes ao longo do período e também aqueles com características epidêmicas. A distribuição dos fagotipos de *Salmonella* Enteritidis apresenta uma variação geográfica com predomínio dos tipos 4, 1, 6 e 8 na Europa (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2011; BRASIL, 2008) e dos tipos 4, 8 e 13a no Canadá (BRASIL, 2008). Nos Estados Unidos da América há predomínio dos fagotipos 8, 13a, 13 e 14b e uma baixa frequência dos fagotipos 4 e 1 (GILLESPIE et al., 2005; BRASIL, 2008). Estes dados indicam que os isolados pertencentes ao fagotipo 1 são próprios do continente europeu, enquanto o fagotipo 4 pode ser considerado de distribuição mundial (BRASIL, 2008), assumindo importância em surtos de origem alimentar. Com relação à *Salmonella* Typhimurium, destaca-se a relevância do fagotipo DT193 em surtos de doenças veiculadas por alimentos em vários países (BRASIL, 2008).

### 3.5 Resistência de *Salmonella* spp. a antimicrobianos

A resistência bacteriana é o fenômeno biológico que confere aos micro-organismos a capacidade de multiplicação ou persistência de doses terapêuticas do antimicrobiano em questão. Alguns micro-organismos apresentam resistência natural ou intrínseca a certos antimicrobianos, a exemplo da resistência de bacilos Gram-negativos como *Escherichia coli* a penicilina G. A forma mais preocupante de resistência, entretanto, é a resistência adquirida (TRABULSI, TOLEDO, 1996).

A resistência adquirida pode ocorrer por mutação ou transferência de genes de resistência. Esta última pode ser tanto cromossômica como plasmidial e pode ocorrer por Transformação, quando a bactéria incorpora genes de resistência presentes no meio e que foram produzidos por outra bactéria; Transdução, quando o gene de resistência é transferido de uma bactéria para outra através de um bacteriófago; Conjugação, quando a transferência do gene de resistência é feita através de uma ponte citoplasmática estabelecida entre duas bactérias e, uma delas deve possuir o fator F (fertilidade) para que este processo ocorra; Transposição, quando ocorre através de transposons, que são segmentos de DNA que podem transferir-se de uma molécula de DNA para outra. Assim, a transferência de gene de resistência ocorre de um plasmídio para outro, para o cromossomo ou para um bacteriófago. Diferentemente do plasmídio, os transposons não são capazes de replicar-se independentemente (SALYERS, WHITT, 1994).

Dentre os patógenos resistentes mais preocupantes veiculados por alimentos, estão as bactérias do gênero *Salmonella* (PALERMO-NETO, ALMEIDA, 2002; BOYLE et al., 2007; COOKE, THRELFALL, WAIN, 2007; DAVIES, 2007). Vários estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de produtos de origem animal seja uma possível via de transmissão à população humana de bactérias resistentes, constituindo um potencial risco à saúde (EDENS, 2003; CARRAMIÑANA, ROTA, AGUSTÍN, 2004; KIM, WEI, 2007).

Com o objetivo de avaliar os riscos quanto ao uso de medicamentos veterinários na produção de alimentos de origem animal, a ANVISA implantou o

programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) (BRASIL, 2008). A primeira fase do programa foi executada entre Agosto de 2004 a Julho de 2006 em 14 estados brasileiros. Das 250 cepas de *Salmonella* isoladas, 76,8% apresentaram multirresistência a dois ou mais antimicrobianos, com destaque para o sorotipo Enteritidis com 91,8% de cepas multirresistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos (BRASIL, 2008).

No programa, foram utilizados os seguintes antimicrobianos, agrupados em classes e mecanismo de ação (TORTORA, FUNKE, CASE, 1995):

B-Lactâmicos: Atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana: Ampicilina, ceftriaxona, ceftazidina, cefepime, ceftazidima/ác. clavulâmico, cefotaxima/ác. Clavulâmico, Aztreonama, Imipem, meropenem.

Aminoglicosídeos: Interferem na síntese protéica: Gentamicina, Estreptomicina.

Quinolonas: Interferem na síntese de DNA: Ácido Nalidíxico, Enrofloxacina, Ciprofloxacina

Sulfonamidas: Interferem na produção de ácido fólico, competindo com o ácido para-aminobenzóico (PABA) bacteriano: Sulfonamidas, Trimetoprim, sulfametoxazol/trimetoprim.

Cloranfenicol: Interferem na síntese protéica: cloranfenicol, florfenicol

Tetraciclínas: Interferem na síntese protéica: tetraciclina

Nitrofuratoínas: Interferem na síntese protéica: nitrofurantoína

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 26 de 09 de Julho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os anfenicóis, tetraciclínas, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas estão proibidos como aditivos alimentares em rações animais (BRASIL, 2009). Contudo, várias outras drogas são permitidas: 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, sulfato de colistina, enramicina, flavomicina, lincomicina, nitrovin, olaquinox, espiramicina, sulfato de tilosina, virginamicina e bacitracina de zinco (SILVA, DUARTE, 2002).

### 3.6 *Salmonella* spp. e a formação de biofilmes

Dentre os micro-organismos patogênicos envolvidos na formação de biofilmes, estão as bactérias do gênero *Salmonella* que são capazes de formar biofilme sobre diversos tipos de superfícies (HOOD, ZOTTOLA, 1997; GOUGH, DODD, 1998; BONAFONTE et al., 2000; JOSEPH, OTTA, KARUNASAGAR, 2001; BRANDA et al., 2005). Falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos nos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os micro-organismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular (OLIVEIRA et al., 2006). Essa multiplicação dá origem às colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, está formado o biofilme (COSTERTON, 2004; ZOTTOLA, 1994). De acordo com Costerton et al. (1995), biofilme é uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos aderidos entre si e/ou à uma superfície ou interface. Considerando que o micro-organismo é capaz de aderir a uma superfície em minutos, é consenso que um verdadeiro biofilme leva horas ou dias para se desenvolver (HOOD, ZOTTOLA, 1995).

De acordo com Flach, Karnopp e Corcao (2005), existem vários fatores relacionados à formação de biofilmes. Os principais são: características físico-químicas da superfície, expressão de fatores de virulência dos micro-organismos como fímbrias, flagelos, substâncias poliméricas extracelulares e o estado fisiológico das células bacterianas no momento da análise.

Vários estudos revelam que isolados de *Salmonella* são capazes de sintetizar os principais componentes envolvidos na formação dos biofilmes: fímbrias e celulose extracelular, esta última, fundamental na matriz extracelular (SOLANO et al., 2002; ROMLING et al., 2003; ZOGAJ et al., 2003; SOLOMON et al., 2005). Estudos também relatam a capacidade de cepas de *Salmonella* formarem biofilmes em superfícies como plásticos (HURRELL et al., 2009), borrachas (ARNOLD, YATES, 2009), vidros (SOLANO et al., 2002; PROUTY,

GUNN, 2003) e em aço inoxidável (JOSEPH, OTTA, KARUNASAGAR, 2001; GIAOURIS, NYCHAS, 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

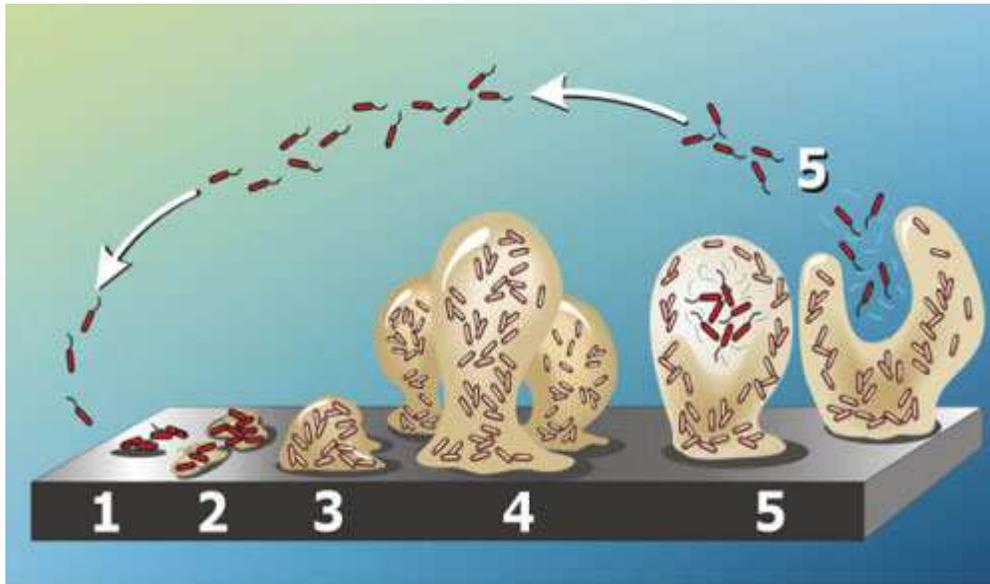
Um estudo sobre adesão de *Salmonella* Enteritidis em superfícies de aço inoxidável, vidro e polietileno, demonstrou que em 2 horas de incubação a 37°C, a contagem de células aderidas na superfícies de aço inoxidável foi de  $8,33 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, na superfície de vidro,  $1,7 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $1,94 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> na superfície de polietileno. Após 20 horas de incubação, a contagem de células aderidas aumentou para  $1,47 \times 10^6$ ,  $1,68 \times 10^7$  e  $2,07 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> nas superfícies avaliadas, respectivamente (MANIJEH, MOHAMMAD, ROHA, 2008).

A presença de oxigênio também é um fator que favorece a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. Giaouris e Nychas (2006) avaliaram a formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável, totalmente submersas no meio de cultivo e também em superfícies parcialmente submersas, em contato com o oxigênio do ar. Observaram um aumento de 2 a 3 log UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas nas superfícies parcialmente expostas comparando com as superfícies totalmente submersas. Estes dados são relevantes, pois a superfície da maioria dos equipamentos e utensílios utilizados nos abatedouros avícolas permanecem constantemente em contato com o ar atmosférico. O processo de formação de biofilmes pode ainda ocorrer quando a higienização do ambiente e equipamentos é ineficiente.

Em muitos casos, o estabelecimento do biofilme é também influenciado pela expressão de moléculas de sistemas *quorum sensing*, liberadas em resposta à limitação de nutrientes, a acumulação de produtos tóxicos e outros fatores (DUNNES, 2002).

### **3.6.1 Etapas da formação de biofilmes**

Muitas teorias têm sido propostas com relação à formação de biofilmes, mas todas elas incluem as etapas de adesão celular, crescimento do micro-organismo, maturação do biofilme e dispersão das células (FIGURA 4) (ZOTTOLA, SASAHARA, 1994).



**Figura 4.** Etapas do desenvolvimento de um biofilme bacteriano. 1. Adesão reversível; 2. Adesão irreversível; 3. Crescimento do biofilme; 4. Maturação do biofilme; 5. Dispersão.

**Fonte:** STOODLEY et al., 2002

A adesão é a primeira etapa do processo de formação de um biofilme, onde as células planctônicas, ou seja, não aderidas, se fixam no substrato. Conforme descrito por Marshall, Stout e Mitchell (1971), a adesão apresenta duas etapas distintas, a adesão inicial, que é considerada reversível, onde atuam apenas forças fracas (van der Waals e interações eletrostáticas), e a adesão irreversível no qual já há a produção de material polimérico extracelular de natureza polissacarídica ou protéica e as forças atuantes são forças consideradas fortes.

O processo inicial de adesão bacteriana pode ser considerado ativo ou passivo dependendo da motilidade das células. A adesão, quando passiva, é influenciada pela gravidade, difusão e dinâmica de fluidos. Na adesão ativa, as estruturas presentes na superfície celular como flagelo, pili, adesina e cápsula facilitam a adesão. Como esta adesão inicial das células à superfície ocorre por meio de interações fracas, esta etapa pode ser facilmente removida nos

procedimentos de higienização (ZOTTOLA, SASAHARA, 1994; ALLISON, 2003; PALMER, FLINT, BROOKS, 2007).

Na etapa da adesão irreversível, inicia-se a produção de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias e as forças atuantes neste estágio são mais potentes (ligações covalentes e ligações de hidrogênio) tornando sua remoção mais difícil e a necessidade de utilizar métodos químicos e físicos mais complexos nos processos de higienização (ZOTTOLA, SASAHARA, 1994; ALLISON, 2003; PALMER, FLINT, BROOKS, 2007).

Após a fixação inicial das células bacterianas, as etapas seguintes definem a estrutura e a atividade do biofilme. Esses processos dependem de fatores físicos e biológicos como crescimento, divisão celular, produção e excreção de exopolissacarídeos (EPS) (XAVIER et al., 2002), além da presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (MATTHEW, GREENBERG, 2005; YOON, SOFOS, 2008; PUMBWE, SKILBECK, WEXLER, 2008).

Dentre os vários fatores relacionados à formação de biofilmes, a produção de exopolissacarídeos (EPS) tem grande importância na fisiologia e persistência do biofilme (KIVES, ORGAZ, SANJOSÉ, 2006). Os exopolissacarídeos, também denominados material polimérico extracelular, polissacarídeo extracelular ou glicocálix são formados por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, fosfolipídios e substâncias húmicas, sendo que os polissacarídeos e proteínas representam 75-89% de sua composição (FLEMMING, WINGENDER, 2010; SIMÕES M., SIMÕES L., VIEIRA, 2010). A composição e quantidade de EPS dependem do micro-organismo envolvido, da temperatura, disponibilidade de nutrientes e biomassa. A estrutura de EPS de bactérias Gram-negativas é geralmente formada de homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos, compostos de unidades repetidas e alinhadas de diferentes dissacarídeos até monossacarídeos e muitos contêm grupos acetila e piruvato (FLEMMING, WINGENDER, 2010).

Os EPS são capazes de proteger os micro-organismos de condições adversas como variações de temperatura e umidade, irradiações, oxidação, presença de antimicrobianos e sanitizantes (FLEMMING, WINGENDER, 2010;

SIMÕES M., SIMÕES L., VIEIRA, 2010). Como os EPS são capazes de manter os micro-organismos imobilizados e próximos uns dos outros, também permitem interações entre as células e estabelecimento de sistemas *quorum sensing*, que correspondem à produção de moléculas autoindutoras pelas bactérias, capazes de influenciar a densidade populacional dos biofilmes, regular a expressão gênica de fatores de virulência e modular outras funções celulares como expressão de flagelos (SPERANDIO, LI, KAPER, 2002; ANNOUS, FRATAMICO, SMITH, 2009; BOYEN et al., 2009; STEENACKERS et al., 2012).

Na etapa de desenvolvimento ou maturação, o biofilme apresenta uma estrutura tridimensional complexa apresentando áreas densas, poros e canais. Esta estrutura é definida pelo crescimento e divisão das células, excreção de EPS e também fatores externos como forças de atrito de processos mecânicos de higienização (STOODLEY et al., 2002). A presença de poros e canais permite a circulação de nutrientes e água para as células do biofilme (CHMIELEWSKI, FRANK, 2003; FLEMMING, WINGENDER, 2010).

A etapa de dispersão ou desagregação corresponde à liberação das células individuais ou microcolônias do biofilme ou do substrato onde se encontram. Nesse momento, as células são transferidas aos alimentos e podem causar prejuízos à qualidade dos produtos e trazer riscos à saúde dos consumidores. Esses micro-organismos livres continuam mantendo as suas características genéticas de resistência, e como se tornam novamente planctônicos, poderão colonizar outros substratos (HOOD, ZOTTOLA, 1995).

### **3.6.2 Biofilmes formados por multiespécies**

Geralmente, nas indústrias de alimentos, a maioria dos micro-organismos não é encontrada isoladamente, mas em comunidades com duas ou mais espécies interagindo entre si (SADOWSKA et al., 2010). A interação entre duas espécies pode caracterizar uma relação harmônica de comensalismo, onde substâncias produzidas por uma espécie podem beneficiar a outra. Por exemplo, os produtos metabólicos de um micro-organismo podem servir para a

multiplicação de outra espécie ou o consumo de oxigênio por uma espécie aeróbica pode facilitar o crescimento de uma espécie microaerofílica (NIKOLAEV, PLAKUNOV, 2007) (FIGURA 5).

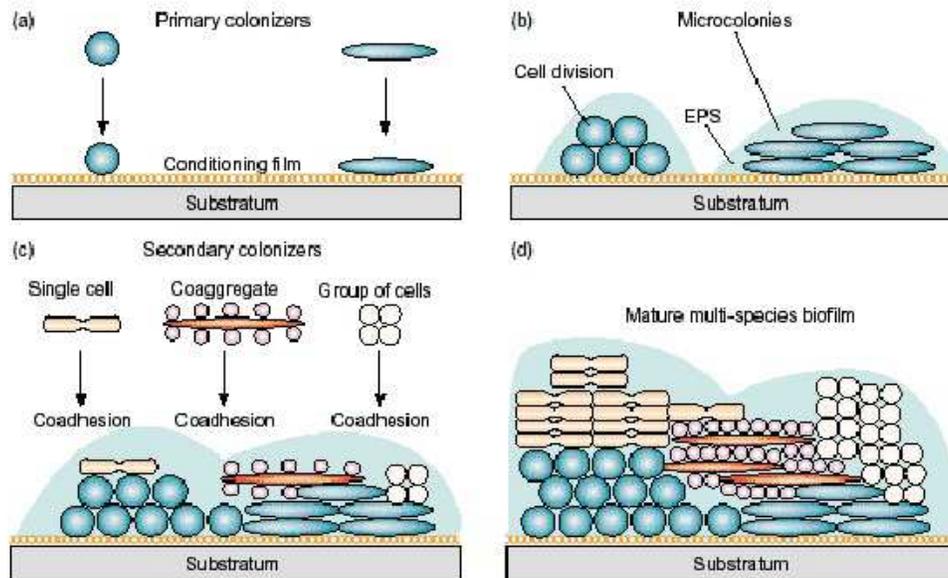
O biofilme multiespécie pode também caracterizar uma relação de competição, onde uma espécie impede ou limita a adesão e multiplicação de outras espécies pela produção de substâncias tóxicas. Boari et al. (2009) avaliaram a formação de biofilmes em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* em cultivo misto e verificaram que a presença de *Aeromonas hydrophila* reduziu o desempenho de *Staphylococcus aureus* nas condições estudadas. Leriche e Carpentier (2000) relataram que a presença de *Staphylococcus sciuri* é capaz de limitar a adesão de *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável.

Num biofilme multiespécie, os micro-organismos envolvidos podem também apresentar comportamento independente não havendo influência de uma espécie sobre a outra. Pinto (2005) avaliou o comportamento de cepas de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em cultivo misto nas temperaturas de 8°C e 30°C e observou que os micro-organismos não apresentaram diferenças nas taxas de crescimento comparando-se com os cultivos isolados.

Em outro estudo, Esper (2010) avaliou a formação de biofilme em superfície de aço inoxidável por cepas de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* em cultivo misto nos meios Luria-Bertani (LB) e em fórmula infantil. De forma geral, estes dois micro-organismos apresentaram contagens de células aderidas que diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si, sendo que as contagens de células sésseis de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) foram superiores às do *Bacillus cereus* nos primeiros 10 dias de avaliação do desempenho em meio LB (ESPER, 2010).

Os biofilmes multiespécies podem representar uma vantagem em ambientes desfavoráveis, pois a presença de diferentes moléculas de EPS tornam os biofilmes mais estáveis e bactérias que não produzem EPS podem se beneficiar destas substâncias produzidas por outros micro-organismos envolvidos.

(McELDOWNEY, FLETCHER, 1987; KUMAR, ANAND, 1998; DUNNES, 2002; CHMIELEWSKI, FRANK, 2003).



**Figura 5.** Desenvolvimento de um biofilme multiespécie. (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) adesão de células individuais, de células agregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro.

**Fonte:** BOARI et al., 2009.

### 3.7 Ação de sanitizantes no controle de *Salmonella* spp.

Células estruturadas em um biofilme apresentam maior resistência à ação de sanitizantes e antimicrobianos do que as células planctônicas em suspensão (NIKOLAEV, PLAKUNOV, 2007; TOMIHAMA, NISHI, ARAI, 2007). Esta resistência é devido à diminuição da difusão dos agentes sanitizantes através da complexa estrutura de EPS, presença de enzimas que degradam as substâncias antimicrobianas e alterações no meio (pH, presença de matéria orgânica) que afetam a atividade dos sanitizantes. (MORTON et al., 1998; DONLAN, COSTERTON, 2002).

A maior resistência aos sanitizantes observada muitas vezes nas bactérias Gram-negativas é atribuída à membrana externa, que atua como uma barreira à entrada de substâncias antimicrobianas (MORTON et al., 1998). Como alguns biofilmes são compostos por diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o estudo da composição do biofilme pode facilitar a escolha de um produto efetivo ou indicar o uso de combinações de produtos sanificantes (SOMERS, WONG, 2004).

Embora os micro-organismos aderidos se mostrem mais resistentes aos sanitizantes do que células livres, isso não significa que os esforços para reduzir a presença de células livres não sejam relevantes. Além disso, a eficiência de alguns sanitizantes é reduzida pela presença de matéria orgânica sendo necessária uma limpeza adequada para remoção de sujidades e células aderidas antes da aplicação do sanitizante (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

Várias medidas e estratégias vêm sendo estudadas com o objetivo de combater a adesão dos micro-organismos nas superfícies de processamento de alimento (RICE et al., 2005; DAVIES, 2007; JANSSENS et al., 2008, ROSENBERG et al., 2008).

Os sanitizantes de uso rotineiro na indústria de alimentos como os compostos à base de cloro, iodo, quaternário de amônia, peróxido de hidrogênio, clorexidina, ácido peracético, muitas vezes são submetidos às avaliações laboratoriais como o teste de suspensão e diluição de uso, que não consideram a formação de glicocálix, fundamental para a adesão, utilizando apenas suspensões microbianas (CREMIEUX, FLEURETTE, 1991).

Nos últimos anos surgiram vários estudos que relacionam a presença do fenômeno *quorum sensing* ao controle da disseminação dos micro-organismos, e conseqüentemente no controle de formação dos biofilmes (ANNOUS, FRATAMICO, SMITH, 2009). Uma das formas de controle consiste em bloquear a comunicação bacteriana utilizando autoindutores a fim de evitar a expressão dos fatores de virulências pelas bactérias (KIEVIT, IGLEWSKI, 2000). Auger et al. (2006) verificaram que células de *Bacillus cereus* na presença de autoindutor AI-2 exógeno, formaram biofilmes com contagens de células aderidas inferiores às dos

biofilmes na ausência deste autoindutor. Também constataram que a adição do autoindutor AI-2 em biofilmes já estabelecidos por estes micro-organismos promove o desprendimento das células aderidas (AUGER et al., 2006). Estudos sobre *quorum sensing* ainda permitem a identificação de novas moléculas efetivas contra micro-organismos resistentes aos antimicrobianos conhecidos (GIACOMETTI et al., 2003).

### **3.7.1 Hipoclorito de Sódio**

O hipoclorito de sódio, comercializado sob a forma líquida em concentrações entre 1 a 10% de cloro residual total (CRT) são amplamente utilizados nos processos de higienização nas indústrias de alimentos. Esta substância apresenta as vantagens de baixo custo, rápida ação e não são afetados pela dureza da água, são efetivos contra grande variedade de micro-organismos, incluindo os esporos. São efetivos em baixas concentrações, são relativamente não tóxicos nas condições de uso e são de fácil aplicação. Entretanto apresentam algumas desvantagens: são instáveis ao armazenamento, são inativados pela matéria orgânica, são corrosivos quando não usados corretamente, causam irritação à pele, apresentam redução da eficiência com o aumento do pH da solução e causam a oxidação de borrachas utilizadas nos equipamento (ANDRADE, PINTO, ROSADO, 2008).

O hipoclorito de sódio, quando em solução aquosa, libera o ácido hipocloroso em sua forma não dissociada responsável pela ação antimicrobiana e são mais efetivos em soluções com pH baixos, onde a presença de ácido hipocloroso é dominante.

Os mecanismos de ação do cloro envolvem sua interação com as proteínas da membrana celular, formando compostos N-cloro tóxicos; é responsável por danos à membrana dificultando o transporte de carboidratos e aminoácidos; reagem com o DNA, oxida as bases dos ácidos nucleicos e paralisa a síntese protéica; provoca a descarboxilação oxidativa de aminoácidos formando nitrilas e

aldeídos; inibe o consumo de oxigênio e afeta a fosforilação oxidativa. (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

### **3.7.2 Dióxido de cloro**

O dióxido de cloro, comparado aos demais compostos clorados inorgânicos, apresenta algumas vantagens: é estável em soluções aquosas e por isso sua ação antimicrobiana se mantém por mais tempo, hidrolisa compostos fenólicos, diminuindo os aromas e odores indesejáveis na água e reagem com menor intensidade à matéria orgânica (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

O dióxido de cloro não se hidrolisa em solução aquosa formando ácido hipocloroso como ocorre com os compostos clorados e a molécula inteira é considerada o agente ativo com ação bactericida, fungicida e algicida. Além de destruir micro-organismos através do rompimento da membrana celular por oxidação, também oxida redutores como sulfatos e óxidos metálicos (ANDRADE, MACÊDO, 1996). Entretanto, apesar de apresentar ação oxidante 2,5 vezes a mais que o cloro, o dióxido de cloro oferece riscos no seu manuseio e armazenagem. Este composto não pode ser comprimido ou armazenado comercialmente como um gás porque é explosivo sob pressão. Desta forma, ele nunca é comercializado na forma gasosa, devendo ser gerado *in loco* pela reação do clorito de sódio com o cloro gás ou com ácidos. O custo da sua produção é elevado, pois requer instalações apropriadas, constante manutenção do sistema gerador e treinamento de pessoal.

Nos últimos anos a utilização do dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa tem aumentado nas indústrias de alimentos como substituto do hipoclorito de sódio e do dióxido de cloro gasoso. Comercializado geralmente a 8% em solução aquosa, este produto é de fácil manipulação, apresenta baixa toxicidade, não é corrosivo nas diluições recomendadas e não deixa resíduos, eliminando a necessidade de enxágue e evitando a contaminação do produto final. Além disso, produz quantidades insignificantes de subprodutos (trihalometanos) em comparação ao hipoclorito de sódio, não forma cloraminas e os fenóis são

oxidados à forma mais simples (ARENSTEIN, 2003; VEROS PRODUTOS QUÍMICOS LTDA, 2012).

### **3.7.3 Ácido peracético**

Os produtos à base de ácido peracético são constituídos de uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético. É produzido na presença de ácido sulfúrico que atua como catalisador da reação (ANDRADE, PINTO, ROSADO, 2008).

É considerado um excelente sanitizante, amplamente usado nas indústrias de alimentos nas concentrações que variam de 0,03 a 0,45% e temperatura entre 7 e 40°C. Temperaturas acima de 43°C diminuem a eficiência como resultado de sua decomposição (TROLLER, 1993).

É um potente agente oxidante, promovendo a oxidação dos componentes celulares de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, vírus e esporos, mesmo em baixas concentrações (KITIS, 2004). Apresentam várias vantagens como sanitizante pela facilidade de implementação nos programas de higienização, amplo espectro de ação contra micro-organismos mesmo na presença de matéria orgânica e ausência de subprodutos tóxicos ou carcinogênicos, apresentam baixo impacto ambiental e são considerados os mais efetivos contra biofilmes (HOLAH et al., 1990; SOUZA, DANIEL, 2005).

Dentre os aspectos negativos, o ácido peracético apresenta baixa estabilidade ao armazenamento, pode ser corrosivo ao aço inoxidável, irritam a pele e mucosas exigindo cuidados na manipulação como a utilização de equipamentos de proteção individual (ANDRADE, PINTO, ROSADO, 2008).

### **3.7.4 Compostos de amônio quaternário**

Os compostos de amônio quaternário são agentes tensoativos catiônicos amplamente usados como sanitizantes nas indústrias de alimentos. Possuem em sua estrutura um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a 4 grupos de

radicais alquil ou aril, resultando em formação de carga positiva no átomo de nitrogênio. Substituições destes radicais resultam em diversos compostos catiônicos com grau variado de atividade antimicrobiana (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

O mecanismo de ação destes compostos está relacionado à inibição enzimática, desnaturação protéica e alteração da permeabilidade celular (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

Dentre os compostos de amônio quaternário, o cloreto benzalcônio é o principal representante. Este composto é muito solúvel em água e é formado por substâncias com cadeias alquilas numa faixa de 8 a 18 átomos de carbono. A atividade antimicrobiana é mais intensa quando 10 a 14 átomos de carbono predominam nas misturas comerciais (ANDRADE, MACÊDO, 1996). Apresentam as vantagens de fácil manuseio, alta estabilidade durante o armazenamento, não é corrosivo, é inodoro, apresenta baixa toxicidade e irritabilidade, é compatível com outros compostos catiônicos, mas incompatíveis com compostos aniônicos e anfóteros (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

### **3.7.5 Glutaraldeído**

O glutaraldeído é um dialdeído, alifático de baixo peso molecular, líquido, miscível em água, álcool e solventes orgânicos. Na temperatura ambiente é incolor com odor pungente. É geralmente comercializado em solução aquosa a 50% e utilizado a 2%, requerendo bicarbonato de sódio para ativar solução por meio de alcalinização em pH 7,5 a 8,5 (BRASIL, 2007). O glutaraldeído tem potente ação biocida. Apresenta rápida e efetiva ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*, alguns fungos e vírus. É lentamente efetivo contra esporos. Uma solução apresenta atividade ótima em pH entre 7,5 e 8,5, sendo quimicamente estáveis por 14 dias. Soluções com valores de pH menores são mais estáveis (BRASIL, 2007). O mecanismo de ação do glutaraldeído está relacionado à capacidade de alteração do DNA, RNA e alteração na síntese de proteínas dos micro-organismos.

O glutaraldeído apresenta as seguintes vantagens: pode ser utilizado na descontaminação de artigos infectados antes do enxágue, pois age na presença de matéria orgânica; não altera materiais como plástico e borracha, não descolora os materiais; se mantém estável em temperatura ambiente; e, por ser menos volátil que o formaldeído, libera menos vapores irritantes e odor forte; não é irritante para pele e mucosas, mas pode provocar dermatite de contato.

Atualmente, vários produtos à base de glutaraldeído formulados com outros compostos como o Cloreto de benzalcônio são comercializados, geralmente na proporção de 42,5% e 7,5%, respectivamente. Estes produtos apresentam um amplo espectro de ação e são amplamente usados na higienização de instalações e equipamentos na criação de aves, suínos e outros animais, pedilúvios, rodolúvios e veículos de transporte. Atuam contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus sp.* e em Gram-negativas como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.* e *Klebsiella sp.* Também são efetivos contra fungos, vírus e esporos (FARMABASE SAÚDE ANIMAL LTDA., 2012).

### **3.8 Sistemas *Quorum sensing***

*Quorum sensing* é um termo utilizado para nomear um sistema de sinalização associado à habilidade das bactérias em responder a moléculas químicas denominadas de autoindutores (AIs). As bactérias produzem, liberam, detectam e respondem a estas moléculas sinais e, quando estas moléculas autoindutoras alcançam uma determinada concentração com o aumento da densidade celular, ocorre uma ativação de fatores transcricionais que acabam alterando a expressão gênica (KAPER, SPERANDIO, 2005).

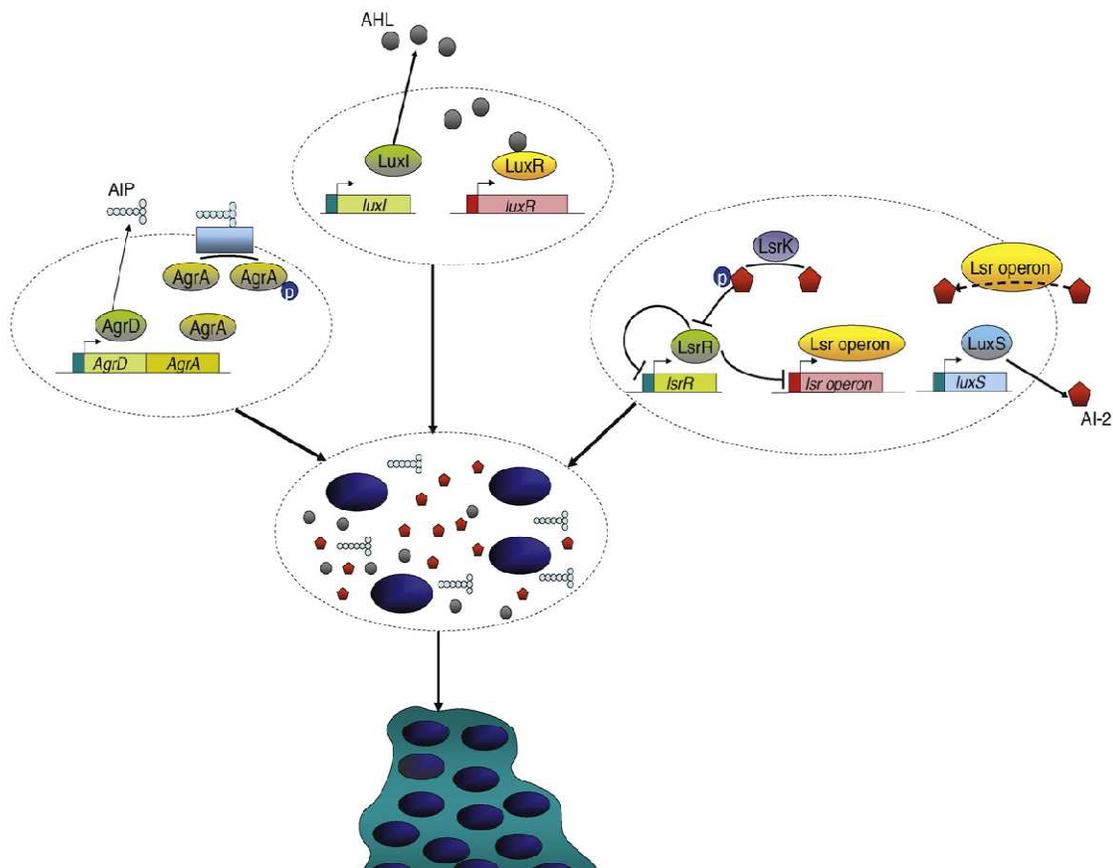
Este mecanismo foi descrito inicialmente nos anos 70 em estudos da expressão de bioluminescência das bactérias *Vibrio fischeri*. O fenômeno de bioluminescência ocorre a partir de uma determinada fase do crescimento bacteriano, quando moléculas autoindutoras são produzidas e acumuladas no meio até atingirem níveis capazes de iniciar uma transdução em cascata

resultando na produção de luciferase (NEALSON, PLATT, HASTINGS, 1970; HASTINGS, GREENBERG, 1999; BASSLER, 1999).

Desde sua descoberta, *quorum sensing* tem sido reconhecido como regulador de uma grande variedade de processos bacterianos, incluindo formação de biofilme (ZHU, MEKALANOS, 2003), expressão de flagelos (KARAVOLOS et al., 2008), indução de fatores de virulência (BASSLER, 2002), diferenciação celular e fluxo de nutrientes dentre outros eventos fisiológicos das bactérias (MARCH, BENTLEY, 2004).

Vários sistemas de *quorum sensing* já foram descritos: os sistemas que utilizam o autoindutor-1 (AI-1) e o autoindutor-3 (AI-3) são encontrados em bactérias Gram-negativas, enquanto que o sistema de autoindução polipeptídico (AIP) é encontrado em bactérias Gram-positivas. O sistema que utiliza o autoindutor-2 (AI-2) é encontrado tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas. Todos estes sistemas iniciam-se com a produção e liberação dos autoindutores no ambiente pelos micro-organismos envolvidos. A detecção destes autoindutores, quimicamente distintos, e as consequentes alterações na expressão gênica, são específicas para cada sistema (PARKER, SPERANDIO, 2009).

O sistema AI-1 é regulado por duas proteínas, a LuxI, responsável pela produção de moléculas de acil homoserina lactona (AI-1) e a LuxR que regula a transcrição de fenótipos quando na presença do autoindutor AI-1 (FIGURA 6). Neste sistema, homólogos de LuxI e LuxR já foram identificados em várias bactérias Gram-negativas. Em *Aeromonas hydrophila*, os homólogos AhyR, AhyI são responsáveis pela produção de protease extracelular e formação de biofilmes. Em *Pseudomonas fluorescens*, os homólogos PhzR, PhzI são responsáveis pela produção de antibiótico fenazina (WHITEHEAD et al., 2001; GRIFFITHS, 2005; READING, SPERANDIO, 2006).



**Figura 6.** Sistemas *quorum sensing*: sistema AI-2 (direita); sistema AI-1 (meio) e sistema AIP (esquerda).

**Fonte:** HOOSHANGI, BENTLEY, 2008

O sistema AI-2 foi identificado inicialmente nos anos 90 em estudos de bioluminescência em bactérias *Vibrio harveyi* (BASSLER, WRIGHT, SILVERMAN, 1994) e tem como autoindutor um furanosil borato diester, sintetizado na presença da proteína LuxS (CHEN et al., 2002).

Este sistema já foi identificado em mais de 70 espécies de bactérias, entre elas, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia sp.*, entre outras (SUN et al., 2004; LOWERY, DICKERSON, JANDA, 2008; ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011; PEREIRA, THOMPSON, XAVIER, 2012). O gene responsável pela produção da proteína envolvida na autoindução foi identificado como *luxS* (SURETTE, MILLER, BASSLER, 1999). A molécula de AI-2 é produzida a partir de 4,5-dihydroxy-2,3-pentaneodine (DPD) com a participação da enzima LuxS. Vários

estudos descrevem alterações de fenótipos em bactérias patogênicas decorrentes da ação do autoindutor AI-2. Em *Shigella flexneri* a presença de AI-2 provoca a diminuição da expressão do gene *virB*; em *Streptococcus pyogenes* ocorre diminuição na produção de lisinas e na taxa de crescimento; em *Helicobacter pylori* ocorre aumento de formação de biofilme (VENDEVILLE et al., 2005).

Em *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, quando a concentração de AI-2 extracelular alcança valores elevados, inicia-se uma reação em cascata onde o AI-2 é internalizado à célula via operon Lsr. A partir daí o AI-2 é fosforilado pela enzima LsrK e seu produto é ligado à região promotora *lsr*, responsável pela expressão de características fenotípicas relacionadas a vários fatores de virulência (ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011) (FIGURA 6).

No sistema AI-3, o autoindutor é um composto aromático cuja estrutura final ainda não é totalmente conhecida. Estudos indicam que a estrutura do AI-3 é semelhante aos hormônios epinefrina e norepinefrina. Isso porque estes hormônios são reconhecidos pelo mesmo receptor do AI-3, o QseC, e apresentam o mesmo efeito do autoindutor AI-3 na expressão de genes de virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (SPERANDIO et al., 2003; CLARKE et al., 2006). Estudos demonstram também que os efeitos da ativação dos fatores de virulência causados por estes três sinais podem ser bloqueados com o uso de propanolol e fentolamina (SPERANDIO et al., 2003).

O AI-3, além de estar envolvido na comunicação interespecíes, também pode apresentar comunicação inter-reino, pelos hormônios epinefrina e norepinefrina presentes no trato gastrointestinal de eucariotos, consolidando a relação entre as células do hospedeiro e as células bacterianas (SPERANDIO et al., 2003, READING, SPERANDIO, 2006).

Alguns aminoácidos e pequenos peptídeos (AIP) são utilizados para comunicação de bactérias Gram-positivas (SMITH, FRATAMICO, NOVACK, 2004). Os AIP regulam a expressão de genes *agr* (gene regulador acessório) (FIGURA 6).

O sistema *agr* em *Staphylococcus aureus* é um dos mais estudados. Vários fatores de virulência deste micro-organismo como produção de hemolisinas,

enterotoxinas e proteínas de superfície são regulados por este sistema. O *agr* em *Staphylococcus aureus* é dividido em 4 grupos: tipo I, II, III e IV. Cada grupo é responsável pela expressão de específicos fatores de virulência. Durante a fase exponencial de crescimento, a presença de AIP de um grupo inibe a expressão de *agr* de outro grupo. Na fase estacionária, a alta atividade de *agr* predominante estimula a expressão dos fatores de virulência (NOVICK, 2003).

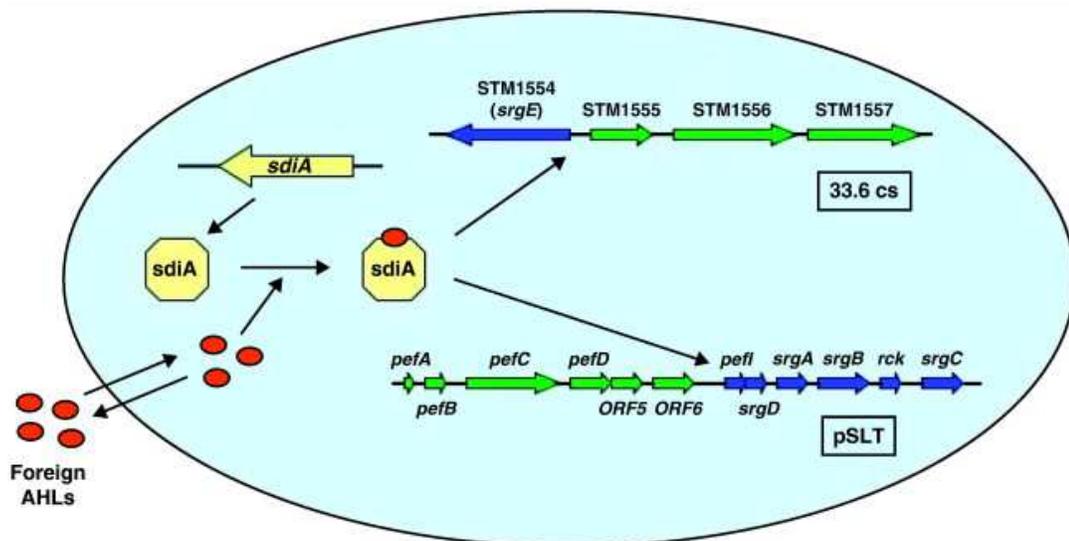
### 3.8.1 *Quorum sensing* em *Salmonella* spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* utilizam dois sistemas de sinalização *quorum sensing*: o sistema AI-2 (TAGA, MILLER, BASSLER, 2003) e o sistema AI-3 (WALTERS, SPERANDIO, 2006). Micro-organismos deste gênero não produzem moléculas de acil homoserina lactona presentes no sistema AI-1, porém vários sorotipos são capazes de detectar este autoindutor produzido por outras espécies, através da proteína SdiA, e assim reconhecer populações de bactérias produtoras de AI-1 presentes no ambiente (HALATSI et al., 2006; SOARES, AHMER, 2011). Em um estudo recente, Dourou et al. (2011) observaram que sobrenadantes de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* 108928 contendo o autoindutor AI-1 provocaram alteração no crescimento de quatro cepas de *Salmonella* (*Salmonella* Enteritidis PT4, *Salmonella* Enteritidis PT7, *Salmonella* Typhimurium DSM554 e *Salmonella* Typhimurium DT193). Outros estudos demonstraram que cepas de *Salmonella* são capazes de detectar AI-1 produzidas por *Aeromonas hydrophila* (SMITH et al., 2008) e *Yersinia enterocolitica* (ATKINSON et al., 2006; DYSZEL et al., 2010).

A proteína SdiA, codificada pelo gene *sdia*, é um homólogo da proteína LuxR que além de reconhecer AI-1 de diferentes espécies, é capaz de regular importantes funções na expressão gênica de fatores de virulência, como a produção de proteínas responsáveis pela colonização da célula no trato gastrointestinal (HALATSI et al., 2006; SOARES, AHMER, 2011).

Em *Salmonella* Typhimurium, o sistema SdiA ocorre quando moléculas de acil homoserina lactona presentes no ambiente atravessam a membrana celular

bacteriana e se ligam à proteína SdiA, a qual promove a expressão dos genes de virulência contidos no plasmídio pSLT e também a expressão do gene cromossômico *srgE*, relacionado ao sistema de secreção tipo III (SSTT). (FIGURA 7). Os SSTT são dispositivos moleculares que permitem às bactérias exportar para o interior das células hospedeiras proteínas denominadas “efetoras”. Uma vez no interior da célula, as proteínas efetoras interagem com domínios de proteínas do hospedeiro provocando alterações celulares associadas à virulência. É um indicador de potencial patogênico encontrado também em outras bactérias Gram-negativas.



**Figura 7.** Sistema SdiA de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium

Fonte: SOARES, AHMER, 2011

### 3.9 Sistemas *Quorum quenching*

*Quorum quenching* é um fenômeno utilizado por muitas espécies bacterianas com o objetivo de interromper sistemas *quorum sensing* de outras espécies e assim obter vantagens seletivas (DONG et al., 2001, 2002; LIN et al., 2003; MARTINEZ et al., 2007).

Bactérias do gênero *Bacillus* produzem a enzima lactonase, codificada pelo gene *aiia*, capaz de quebrar o anel lactona de moléculas de acil homoserina lactona, provocando sua degradação (DONG et al., 2002; SMITH, FRATAMICO, NOVACK, 2004). Em outro estudo, Esper (2010) constatou que cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579 são capazes de reduzir e/ou degradar acil homoserina lactona quando em cultivo multiespécie com *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

Atualmente várias estratégias de inibição de sistemas *quorum sensing* estão sendo estudadas e podem representar novas perspectivas nos controles de biofilmes e nos tratamentos contra infecções (ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011). Estas estratégias incluem o uso de substâncias que interferem no metabolismo bacteriano, interrompendo a síntese dos autoindutores. Como exemplo, as metiladenosina/adenosilhomocisteína nucleosidase (MTAN), que são substâncias capazes de degradar a S-adenosilmetionina (SAM), uma molécula envolvida na síntese dos autoindutores AI-1 e AI-2, e assim impedir a formação destes pelos micro-organismos (GUTIERREZ et al., 2009).

Outros estudos avaliam substâncias análogas ao DPD que é o precursor do autoindutor AI-2. Estas substâncias análogas competem com os receptores de DPD envolvidos na síntese deste autoindutor, impedindo a sua produção (LOWERY et al., 2008, 2009; SMITH et al., 2009).

As furanonas halogenadas também participam da quebra de sistemas *quorum sensing*. Ren, Sims e Wood (2002) pesquisaram a ação destas substâncias em *Bacillus subtilis* e constataram diminuição na formação de biofilmes e uma significativa redução de AI-1 (3300 vezes) e AI-2 (5500 vezes) em *Vibrio harveyi*. Observaram também diminuição de AI-2 e redução na formação de biofilmes em *Escherichia coli* (REN et al., 2004). Janssens et al. (2008), pesquisaram a atuação de vários compostos sintéticos de furanonas em biofilmes de *Salmonella* Typhimurium e relataram que, apesar destes compostos não apresentarem influência no sistema *quorum sensing* deste micro-organismo, estas substâncias inibem a síntese de flagelos nas células e, conseqüentemente diminuem a formação de biofilmes. Observaram também que biofilmes submetidos

à ação de furanonas apresentaram maior suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais (JANSSENS et al., 2008).

Lu, Hume e Pillai (2004) estudaram alguns aditivos de alimentos e os relacionaram com a concentração de AI-2 de *Vibrio harveyi*. Constataram uma completa inibição deste autoindutor na presença de propionato de sódio. Também verificaram uma redução de 93,3% de AI-2 na presença de benzoato de sódio e uma redução de 75% de AI-2 na presença de acetato de sódio.

Em outro estudo, alguns ácidos graxos como ácido linoléico, ácido oléico, ácido palmítico e ácido esteárico, considerados inibidores naturais de *quorum sensing*, foram capazes de reduzir a quantidade do autoindutor AI-2 de *Vibrio harveyi* em 25 a 99%, apesar de não contribuírem para diminuição do número de células bacterianas (WIDMER et al., 2007).

Rasko et al. (2008) identificaram uma molécula capaz de se ligar ao receptor de AI-3, bloqueando assim a expressão de fatores de virulência de *Salmonella* spp. e outros patógenos Gram-negativos.

A identificação dos sistemas *quorum sensing* e *quorum quenching* em espécies bacterianas de interesse e a compreensão desta dinâmica comunicação intercelular e seus impactos, abrem novas perspectivas na pesquisa de mecanismos e estratégias de controle dos micro-organismos, o que pode trazer grandes benefícios na área médica, ambiental, agrícola e alimentar.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas

Neste trabalho, foram estudadas 65 cepas de *Salmonella*, sendo 39 isoladas de produto final de carcaças e cortes de frango, 1 isolada de farinha de penas utilizada na produção de ração dos matrizeiros e 25 isoladas de amostras de fezes de aves vivas reprodutoras. Os produtos e amostras utilizados na pesquisa do patógeno foram obtidos a partir de dois abatedouros e várias granjas pertencentes a uma única empresa localizada na região metropolitana de Campinas-SP. As cepas foram isoladas no período de Maio/2004 a Maio/2006 conforme metodologia descrita por Silva, Junqueira e Silveira (2001) e pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. As cepas foram submetidas à sorotipificação pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – R.J. e estão relacionadas na Tabela 1.

Na pesquisa de biofilmes multiespécies, juntamente com as cepas de *Salmonella*, foi utilizada a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

**Tabela 1.** Frequência de sorotipos de *Salmonella* isolados no período de Maio/2004 a Maio/2006, de amostras provenientes de empresa avícola pertencente à região metropolitana de Campinas-SP.

Sorotipos	Amostras			n°(%) cepas
	componente da ração: farinha de penas	fezes de aves vivas reprodutoras	produto final carcaças/ cortes	
Enteritidis	1	17	26	44 (67,7%)
Newport	-	1	4	5 (7,7%)
Senftenberg	-	1	2	3 (4,6%)
Subsp. <i>enterica</i> (rugosa)	-	3	-	3 (4,6%)
Kentucky	-	-	2	2 (3,1%)
Mbandaka	-	-	2	2 (3,1%)
Infantis	-	1	1	2 (3,1%)
Agona	-	-	1	1 (1,5%)
Livingstone	-	-	1	1 (1,5%)
Schwarzengrund	-	1	-	1 (1,5%)
Typhimurium	-	1	-	1 (1,5%)
Total	1	25	39	65

(-) Não isolado

#### 4.2 Determinação da resistência a antimicrobianos

A determinação da resistência antimicrobiana foi desenvolvida pelo método de difusão em disco padronizado (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003). As cepas de *Salmonella* foram cultivadas previamente em caldo Mueller Hinton (DIFCO) a 35°C por 24 horas. As placas com ágar Mueller Hinton (DIFCO) foram incubadas a 35°C por 18 horas e os diâmetros (mm) da zona de inibição foram medidos. Os resultados foram interpretados conforme as recomendações dos fabricantes de cada antimicrobiano, segundo normas estabelecidas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) e as culturas foram classificadas em resistente, sensível ou intermediária.

Foram avaliados 24 antimicrobianos gentilmente doados pelos fabricantes CEFAR® e CECON®: Ampicilina 10µg, cefalotina 30µg, cefoxitina 30µg, cloranfenicol 30µg, tetraciclina 30µg, gentamicina 10µg, sulfazotrim 25µg, cefotaxina 30µg, amicacina 30µg, ciprofloxacina 5µg, polimixina B 300UI, tobramicina 10µg, ácido nalidíxico 30µg, Aztreonama 30µg, norfloxacina 10µg, amoxicilina 10µg, doxiciclina 30µg, enrofloxacina 5µg, bacitracina 10UI, estreptomicina 10µg, colistina 10µg, nitrofurantoína 300µg, eritromicina 15µg e kanamicina 30µg. Estes antimicrobianos são usualmente utilizados nos testes de determinação da resistência de *Salmonella* spp. (CARDOSO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007, 2008) e, alguns como norfloxacina, enrofloxacina e ciprofloxacina, são utilizados na produção avícola (SILVA, DUARTE, 2002; BRASIL, 2008).

### **4.3 Determinação da formação de biofilme**

#### **4.3.1 Superfície de aço inoxidável**

Para a avaliação da formação de biofilme bacteriano, foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 na dimensão de 1 cm<sup>2</sup>. Este material é utilizado com frequência na fabricação de equipamentos, bancadas e utensílios encontrados nas indústrias de alimentos e foram adquiridos da empresa Açomedi Aços Ltda (Barueri-SP). Os cupons na dimensão de 1 cm<sup>2</sup> foram confeccionados pelo Centro de Tecnologia da UNICAMP e a determinação da rugosidade do material foi realizada em seu Laboratório de Metrologia, utilizando-se rugosímetro modelo S8P (Perthen). O resultado de 0,366 µm de rugosidade, foi obtido a partir da média de nove medições realizadas à temperatura de 20±1°C. Este resultado condiz com a rugosidade para o acabamento número 4 (#4), que pode variar de 0,15 a 0,40 µm, obtido a partir de lixamento em uma direção com abrasivos de grana que variam de 120 a 150 mesh (CARBÓ, 2001).

Antes de cada ensaio, os cupons foram higienizados e esterilizados, seguindo as seguintes etapas: a) escovação com esponja de poliuretano, água destilada e detergente líquido neutro; b) enxágue com água destilada; c) imersão em álcool etílico 70% por 1 hora em temperatura ambiente; d) enxágue com água destilada e secagem em temperatura ambiente; e) esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### **4.3.2 Obtenção do inóculo**

As seguintes cepas foram utilizadas na determinação da formação de biofilmes: *Salmonella* Enteritidis isolada de cortes de coxa e sobrecoxa; *Salmonella* Newport isolada de frango inteiro resfriado; *Salmonella* Senftenberg isolada de filé de peito; *Salmonella* infantis isolada de frango inteiro resfriado e *Salmonella* Typhimurium isolada de fezes de aves vivas reprodutoras.

Estas cepas, além de pertencerem a diferentes sorotipos, apresentam perfis distintos de resistência a antimicrobianos.

Nas avaliações de biofilme multiespécie, foram utilizadas as cepas de *Salmonella* Enteritidis descritas acima e cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

Os isolados foram mantidos em tubos contendo caldo nutriente e glicerol à temperatura de -80°C. Para os estudos da formação de biofilmes, as culturas foram repicadas em caldo de soja e tripticaseína (TSB) (DIFCO) e incubadas a 35°C por 18 horas para ativação. Em seguida, repicadas por 2 vezes consecutivas em tubos contendo 10 mL de caldo nutriente (CN) (DIFCO) a 35°C por 24 horas. No momento do ensaio, 1 mL da cultura foi submetida à diluições seriadas até a concentração final de aproximadamente  $10^2$  UFC/mL (BOKANYI, STEPHENS, FOSTER, 1990; IZAT, YAMAGUCHI, KANIAWATI, 1991; DUFRENNE, RITMEESTER, VAN ASCH, 2001; RISTORI et al., 2008). Esta concentração final

foi confirmada em todos os testes realizando plaqueamento por profundidade em ágar triptona de soja (TSA) (DIFCO).

#### **4.3.3 Formação de biofilme e determinação de células sésseis**

Os cupons teste foram imersos assepticamente em poços de placas estéreis de poliestireno para cultura de células, com 12 poços e fundo chato contendo 3 mL de caldo de soja e tripticaseína (TSB) (DIFCO) acrescidos de um volume de suspensão de *Salmonella* spp. suficiente para que cada poço contivesse concentração final de aproximadamente  $10^2$  UFC/mL.

Também foram utilizadas placas contendo 3 mL de água peptonada tamponada (APT) a 0,1% (OXOID) com a mesma concentração de células. Como controle negativo, foram utilizados poços contendo meios de cultivo sem a adição de suspensão bacteriana. Nas avaliações de biofilme multiespécie, cada poço recebeu um volume de 1,5 mL de cultura de *Salmonella* Enteritidis juntamente com 1,5 mL de cultura de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 para resultar numa concentração final de aproximadamente  $10^2$  UFC/mL de cada micro-organismo.

As placas foram incubadas à temperatura de 20°C em incubadora B.O.D. por 2, 4, 8, 16, 24 e 48 horas. Em cada tempo, dois cupons foram avaliados em cada ensaio (MANIJEH, MOHAMMAD, ROHA, 2008). Após cada período, cada cupom foi retirado do meio de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril e imerso em 10 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) na concentração de 0,05 M e pH 7,4, por 1 minuto, sem agitação, para a remoção das células planctônicas. Em seguida, imerso em 5 mL da mesma solução e submetidos à agitação constante à 2800 rpm (Vórtex Lab Dancer IKA ) por 2 minutos para remoção das células sésseis. Diluições apropriadas foram realizadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada 0,1% e submetidas ao plaqueamento por profundidade em ágar triptona de soja (TSA) (DIFCO). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e em seguida, realizadas as contagens para a determinação do número de UFC/cm<sup>2</sup>.

Para a avaliação de biofilme multiespécie, além do plaqueamento em ágar triptona de soja (TSA) (DIFCO), foram utilizados os meios de cultura: ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (DIFCO) para o crescimento de *Salmonella* spp. e Streptococcus Base com púrpura bromo cresol (KF) (DIFCO) para o crescimento do *Enterococcus faecalis*.

Foram realizados três ensaios para cada tempo. O número de UFC/cm<sup>2</sup> foi determinado usando a seguinte fórmula (SWANSON et al., 1992):

$$UFC / cm^2 = \frac{(V_D / V_A) \cdot M \cdot D}{A}$$

Onde: V<sub>D</sub>: volume do diluente utilizado na rinsagem (mL)

V<sub>A</sub>: volume da alíquota utilizada no plaqueamento (mL)

M: média da contagem obtida nas placas (UFC)

D: diluição realizada

A: área do cupom (cm<sup>2</sup>)

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliação visual da formação de biofilme bacteriano nas superfícies dos cupons, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, conforme metodologia descrita por Silveira (1989).

A preparação dos cupons seguiu as seguintes etapas: os cupons teste, após 48 horas de incubação em TSB, foram imersos em 10 mL de PBS na concentração de 0,05 M e pH 7,4, por 1 minuto, sem agitação, para a remoção das células planctônicas. Em seguida, cada cupom foi imerso em aproximadamente 2 mL de solução tampão fosfato 0,1M com 2% de glutaraldeído (SIGMA-ALDRICH®) por 3 horas. Os cupons foram lavados duas vezes em solução de fosfato 0,1M e submetidos ao procedimento de desidratação, que consistiu na utilização de álcool etílico P.A. nas concentrações de 30, 50, 70, 80, 95% e 10 minutos de contato em cada concentração, seguindo

a ordem da menor para a maior concentração. E, por último, na concentração de 100% de álcool etílico com três repetições de 10 minutos de contato em cada repetição.

Os cupons foram transferidos para o secador de Ponto Crítico (“Critical Point Dryer”), Balzers modelo CPD 030 com injeção de gás carbônico para a completa remoção do álcool. Após a secagem, os cupons foram submetidos à metalização com fina camada de ouro por 180 segundos no equipamento “Sputter Coater” (Balzers modelo SCD 050).

Os cupons foram então observados em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL (modelo JSM 5800LV), em aumentos que variaram de 1500 a 20000 vezes. Para observar a topografia da superfície do aço inoxidável, foram utilizados cupons não inoculados. Para comprovar a completa remoção das células sésseis dos cupons após os 2 minutos de agitação, também foram observados cupons inoculados e submetidos ao vórtex.

#### **4.4 Avaliação da eficiência dos sanitizantes sobre biofilmes**

##### **4.4.1 Preparo das soluções de sanitizantes**

Para avaliar a eficiência de sanitizantes em relação ao biofilme formado, foram utilizadas soluções dos principais sanitizantes encontrados nos abatedouros avícolas: hipoclorito de sódio (Chemco®) a 5 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual total (CRT) pH=7,6; ácido peracético (Divosan Forte®, Johnson Diversey) a 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido peracético (APA) pH=3,4; dióxido de cloro estabilizado (Veromax 80®, Veros Produtos Químicos Ltda) a 100 mg.L<sup>-1</sup> de ClO<sub>2</sub> pH=7,6 e FARMASEPT PLUS® (Farmabase Saúde Animal Ltda.) a 0,1%, pH=5,9, sanitizante composto de cloreto benzalcônio (7,5%) e glutaraldeído (42,5%). Para o preparo das soluções foi utilizada água destilada estéril. A concentração de cloro residual total da solução de hipoclorito de sódio foi determinada conforme metodologia descrita pela American Public Health

Association (1985). A concentração final de ácido peracético na solução foi confirmada pelo método iodométrico (JOHNSON DIVERSEY, 2004). A concentração final de  $\text{ClO}_2$  foi determinada também por iodometria (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1985). A solução de FARMASEPT PLUS® foi preparada conforme recomendação do fabricante (FARMABASE SAÚDE ANIMAL LTDA., 2012).

#### **4.4.2 Ação dos sanitizantes sobre os biofilmes**

Os cupons foram submetidos à formação de biofilme conforme descrito no item 4.3.3 e incubados a 20°C por 48 horas. Após este período, os cupons foram retirados dos meios de cultivos com o auxílio de uma pinça estéril e imersos em 10 mL de solução PBS na concentração de 0,05 M e pH 7,4, por 1 minuto, sem agitação, para a remoção das células planctônicas. Em seguida, foram imersos em 10 mL das soluções sanitizantes. Após o período de 15 minutos nas soluções, os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de solução neutralizante para cessar da ação do sanitizante.

Como neutralizante das soluções de hipoclorito de sódio, ácido peracético e dióxido de cloro estabilizado foram utilizadas soluções de PBS com 1% de tiosulfato de sódio. Para neutralizar o sanitizante à base de quaternário de amônio, foi utilizado Caldo Lethen (DIFCO), que contém lecitina (0,7 g/L) e polisorbato 80 (Tween™ 80) (5,0 g/L) em sua fórmula.

Os cupons foram submetidos à agitação constante a 2800 rpm (Vórtex Lab Dancer IKA) por 2 minutos para remoção das células sésseis. Diluições apropriadas foram submetidas ao plaqueamento por profundidade em TSA. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e em seguida, realizadas as contagens para a determinação do número de UFC/cm<sup>2</sup>.

Como controles, foram utilizados cupons contendo biofilmes não submetidos ao tratamento com sanitizantes para posterior comparação dos seus efeitos sobre os biofilmes. E também foram utilizados cupons contendo biofilme e

imersos em 10 mL de água destilada Mili Q estéril sem a presença de sanitizantes para avaliar o efeito da imersão sobre os biofilmes.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.5 Análises estatísticas**

Todas as variáveis estudadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e os resultados comparados através do Teste de Tukey. A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ . Os testes foram realizados no software STATISTICA® versão 7.0.61.0.

#### **4.6 Avaliação da presença dos genes *sdia* e *luxs***

##### **4.6.1 Primers utilizados**

Para avaliar a presença dos genes *sdia* e *luxs* em culturas de *Salmonella*, foi utilizada a técnica de PCR e os seguintes primers:

- Sdia1: 5'- AAT ATC GCT TCG TAC CAC- 3' (HALATSI et al., 2006).
- Sdia2: 5'-GTA GGT AAA CGA GGA GCA G –3' (HALATSI et al., 2006).
- Luxs1: 5'- TTAGATAGCTTCGCAGTCGATCATA- 3' (McLELLAND et al., 2001).
- Luxs2: 5' – TTATTGCTGTTACGCGCACATCAC- 5' (McLELLAND et al., 2001).

##### **4.6.2 Extração do DNA**

Uma alçada de cada cultura estocada em freezer a -80°C foi, inicialmente, semeada em estrias em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO). Após 24 horas de incubação a 35°C, uma colônia isolada de cada

amostra foi inoculada em 10 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO) e incubada a 35°C por 18 horas. Uma alíquota de 250 µl da cultura ativada foi submetida à centrifugação a 13.000xg por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspendidos em 95 µl de tampão PCR 1X (10 mM de tris-HCl, 50 mM de KCl) (Invitrogen Life Technologies), adicionados de 4 µl de lisozima (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich) e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 1 µl de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen Life Technologies) e mantidos em banho de água a 60°C por 60 minutos, com tratamento final a 95°C por 8 minutos (FURRER et al., 1991). O DNA de cada isolado foi mantido a -20°C até o momento de realização das análises pela técnica da PCR.

#### **4.6.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

A amplificação do DNA das cepas de *Salmonella* foi realizada em termociclador Mastercycler Eppgradients 534 (Eppendorf).

##### **4.6.3.1 Gene *sdia***

Para o gene *sdia*, foi utilizado um ciclo inicial de 94°C/5min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e ciclo final a 72°C/7 minutos. Para cada reação foi preparado um volume total de 25 µl contendo 1U *Taq*-polimerase (Fermentas Life Sciences, EUA); tampão (75mM Tris-HCl pH 8.8, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05% Tween 20) (Fermentas Life Sciences, EUA); 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,25 µM de cada primer, 1µl do DNA extraído e água Mili-Q estéril. Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 e como controle negativo foi utilizada a solução da reação sem DNA. O produto de 274 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão de Tris-borato EDTA (TBE), corado com

solução de Syber Safe® e visualizado em transluminador UV. Em cada gel foi utilizado marcador de peso molecular 100 pb (DNA ladder, Invitrogen).

#### **4.6.3.2 Gene *luxs***

Para o gene *luxs*, foi utilizado um ciclo inicial de 94°C/9min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e ciclo final a 72°C/7 minutos. Para cada reação foi preparado um volume total de 25 µl contendo 1U *Taq*-polimerase (Fermentas Life Sciences, EUA); tampão (10mM Tris-HCl pH 8.8, 50mM KCl) (Fermentas Life Sciences, EUA); 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada primer, 1µl do DNA extraído e água Mili-Q estéril. Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 e como controle negativo foi utilizada a solução da reação sem DNA. O produto de 461 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão de Tris-borato EDTA (TBE), corado com solução de Syber Safe® e visualizado em transluminador UV. Em cada gel foram utilizados marcadores de peso molecular 1Kb e 100 pb (DNA ladder, Invitrogen).

### **4.7 Detecção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2**

Para verificar a presença de autoindutor AI-2 em sobrenadantes de cultivo de *Salmonella*, foi realizada a metodologia descrita por Taga e Xavier (2011) e Surette e Bassler (1998).

#### **4.7.1 Cepas bacterianas**

- Todas as 65 cepas de *Salmonella* descritas no item 4.1 foram submetidas ao teste.

- *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação – FEA – UNICAMP e utilizada como controle positivo para AI-2 (HALATSI et al., 2006).
- *Escherichia coli* O157:H7 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação – FEA – UNICAMP e utilizada como controle positivo para AI-2 (WALTERS, SPERANDIO, 2006).
- *Vibrio harveyi* BB170 *LuxN::Tn5*, sensor-, sensor 2+, biossensor de AI-2 (SURETTE, BASSLER, 1998).

#### 4.7.2 Preparo dos sobrenadantes e cultivos

As cepas de *Salmonella* foram incubadas a 30°C em caldo Luria-Bertani (LB) (DIFCO) acrescido de 0,5% de glicose, sob agitação constante de 175 rpm por 24 horas. Em seguida as culturas foram diluídas 1:100 em caldo Luria-Bertani (LB) recém preparado (com 0,5% de glicose) e incubadas novamente nas mesmas condições descritas, por 6 horas (fase *mid* exponencial).

Alíquotas de 1 mL do crescimento bacteriano foram transferidas para tubos Eppendorf® e centrifugadas a 15000xg por 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5415D) e os sobrenadantes foram filtrados em membrana com 0,2 µm HT. As amostras foram submetidas ao teste imediatamente após a filtração.

Uma amostra do biossensor *Vibrio harveyi* BB170, mantido à temperatura de -80°C, foi incubada a 30°C em meio Autoinducer Bioassay (AB) (SURETTE, BASSLER, 1998) por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante de 175 rpm. Em seguida a cultura foi diluída 1:5000 em meio Autoinducer Bioassay (AB).

Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. E como controles negativos foram utilizados os meios de cultura Luria-Bertani (LB) (DIFCO) e Autoinducer Bioassay (AB) estéreis (SURETTE, BASSLER, 1998).

### 4.7.3 Detecção de AI-2

Para a detecção de AI-2, foram utilizadas placas de microtítulo com 96 cavidades, brancas, com fundo chato transparente (GREINER) onde foram depositados 10µl de sobrenadante filtrado das cepas de *Salmonella* e 90µl da cultura diluída de *Vibrio harveyi* BB170.

As placas foram incubadas a 30°C, sob agitação constante a 500rpm e a cada 15 minutos, durante pelo menos 5 horas, a atividade de bioluminescência foi quantificada, em *relative light units* (RLU) em luminômetro modelo FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG LABTECH) . Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentados correspondem à indução de bioluminescência, a qual foi determinada pela seguinte fórmula (TAGA, XAVIER, 2011):

$$\text{Indução da bioluminescência} = \frac{\text{RLU da amostra}}{\text{RLU controle negativo}}$$

RLU= *relative light units*



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Frequência dos sorotipos isolados

Foram identificados 10 diferentes sorotipos: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Typhimurium e três cepas de *Salmonella* em sua forma rugosa. O sorotipo predominante foi o Enteritidis com uma frequência de 67,7%, seguido do sorotipo Newport com 7,7%.

A alta incidência do sorotipo Enteritidis, encontrado em carcaças e cortes de frango e também em aves vivas, assemelha-se com os dados reportados na literatura nacional e internacional (BRASIL, 2008; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012). No Brasil, o relatório do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF, relata o sorotipo Enteritidis como o mais incidente no período de 2004 a 2006 em todas as regiões do Brasil, com 48,8% de frequência em carcaças de frangos (BRASIL, 2008). Nos Estados Unidos, o sorotipo Enteritidis aparece em primeiro lugar dentre os vinte mais frequentemente isolados de humanos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012).

Muitos sorotipos encontrados nas aves vivas, como Enteritidis, Newport, Senftenberg e Infantis também foram encontrados no produto final. Estes resultados estão de acordo com as pesquisas de Corry et al. (2002) e Bailey et al. (2001) que relatam em seus trabalhos, sorotipos detectados no campo aparecendo frequentemente nas carcaças e cortes de frango.

A carga microbiana presente no intestino das aves em idade de abate, pode contaminar as penas e a pele durante o transporte ao abatedouro, em decorrência do aumento da excreção das fezes devido ao *stress*. No abatedouro, algumas etapas no processamento dos frangos como as etapas de evisceração e resfriamento (*pré-chiller* e *chiller*) são definidas como Pontos Críticos de Controle

(PCCs). Durante a evisceração, podem ocorrer rompimentos das vísceras e contaminação das carcaças com fezes e bile; estas devem ser retiradas da linha de abate para evitar a contaminação cruzada. A água utilizada nas etapas de resfriamento também necessita de frequente monitoramento e renovação constante. Temperaturas acima de 4°C e baixas concentrações de cloro livre na água promovem o crescimento bacteriano e a disseminação de *Salmonella* spp. (RIBEIRO et al., 2007).

Um total de 39 cepas de *Salmonella* spp. foi isolado de carcaças e cortes de frango, 25 cepas foram isoladas de fezes de aves vivas e apenas 1 de farinha de penas. O maior número de amostras contaminadas no produto final pode ser atribuído à contaminação cruzada. Segundo Almeida e Silva (1992), em geral, todas as operações de abate podem resultar em contaminação microbiológica cruzada por *Salmonella* spp., sendo a contaminação intestinal uma fonte mais comum do que a cutânea. Falhas nos procedimentos de higienização e à intensa manipulação também contribuem para a disseminação do patógeno no produto final (ALMEIDA, SILVA, 1992).

## **5.2 Avaliação da Resistência a antimicrobianos**

Na determinação do perfil de resistência a antimicrobianos, os resultados indicam que 100% das amostras apresentaram multirresistência a dois ou mais agentes antimicrobianos utilizados. A Tabela 2 apresenta os 10 padrões de resistência identificados nos 65 isolados de *Salmonella* em carcaças e cortes de frangos e em fezes de aves vivas reprodutoras.

Dentre as 65 cepas analisadas, 96,9% (63/65) e 87,7% (57/65) das amostras apresentaram resistência a Bacitracina e a Eritromicina, respectivamente. Estes antimicrobianos, assim como outros descritos na literatura, favorecem em torno de 10% o ganho de peso nas aves e, em torno de 10% uma melhor conversão alimentar. Usualmente as rações avícolas contêm 2, 4, 10 ou 40 g/t de algum tipo de antimicrobiano, para estimular o crescimento e melhorar a conversão alimentar (BRASIL, 2008).

Devido à crescente demanda de produção na avicultura industrial, é imprescindível o uso de técnicas e/ou ações que diminuam a incidência de doenças nos plantéis avícolas. Por muitas décadas, os promotores de crescimento tiveram e ainda têm grande importância na produção de proteína animal devido às inúmeras vantagens que oferecem. Contudo, a utilização rotineira e indiscriminada dos antimicrobianos tem favorecido o aparecimento de populações bacterianas resistentes, resultantes do compartilhamento e transferência de genes de resistência entre micro-organismos da microbiota normal e também entre diferentes patógenos (BRASIL, 2008).

**Tabela 2.** Distribuição dos padrões de resistência de *Salmonella* spp.

Padrão de resistência*	sorotipos (nº cepas)
BAC+TET	Newport (1)
NAL+ERI	Enteritidis (1) e Kentucky (1)
NAL + BAC	Enteritidis (6)
BAC + ERI	Agona (1), Enteritidis (1), Kentucky (1), Livingstone (1), Newport (1) e Mbandaka (1)
BAC+NIT+TET	Newport (1)
NAL+BAC+ERI	Enteritidis (27), Newport (2), rugosa (1), Senftenberg (2), Typhimurium (1)
AMP+NAL+BAC+ERI	rugosa (1)
AMP+AMO+BAC+ERI	Infantis (2)
NAL+BAC+ERI+NIT	Enteritidis (9), Mbandaka (1), Senftenberg(1), rugosa (1)
BAC+SUT+DOX+ERI+TET	Schwarzengrund (1)

\* BAC: Bacitracina; TET: Tetraciclina; NAL: Ác. Nalidíxico; ERI: Eritromicina; NIT: Nitrofurantoína; AMP: Ampicilina; AMO: Amoxicilina; SUT: Sulfazotrim

Os percentuais de resistência aos demais antimicrobianos foram: Ácido Nalidíxico (83,1%), Nitrofurantoína (23,0%), Ampicilina (4,6%), Tetraciclina (4,6%), Amoxicilina (3,1%), Doxiciclina (1,5%) e Sulfazotrim (1,5%).

**Tabela 3.** Sensibilidade a antimicrobianos de 65 cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças e cortes de frango prontos para o consumo e em fezes de aves vivas reprodutoras no período de 2004 a 2006.

Antimicrobianos		Resistente*		Intermediário*		Sensível*	
Bacitracina	(BAC)	63	96,9%	2	3,1%	0	0%
Eritromicina	(ERI)	57	87,7%	8	12,3%	0	0%
Ác. Nalidíxico	(NAL)	54	83,1%	0	0%	11	16,9%
Nitrofurantoína	(NIT)	15	23,0%	22	33,8%	28	43,1%
Ampicilina	(AMP)	3	4,6%	0	0%	62	95,4%
Tetraciclina	(TET)	3	4,6%	0	0%	62	95,4%
Amoxicilina	(AMO)	2	3,1%	0	0%	63	96,9%
Doxiciclina	(DOX)	1	1,5%	0	0%	64	98,5%
Sulfazotrim	(SUT)	1	1,5%	0	0%	64	98,5%
Amicacina	(AMI)	0	0%	0	0%	65	100%
Aztreonama	(ATM)	0	0%	0	0%	65	100%
Cefalotina	(CFL)	0	0%	2	3,1%	63	96,9%
Cefoxitina	(CFO)	0	0%	0	0%	65	100%
Cefotaxina	(CTX)	0	0%	0	0%	65	100%
Ciprofloxacina	(CIP)	0	0%	2	3,1%	63	96,9%
Cloranfenicol	(CLO)	0	0%	0	0%	65	100%
Colistina	(COL)	0	0%	0	0%	65	100%
Enrofloxacina	(ENO)	0	0%	0	0%	65	100%
Estreptomina	(EST)	0	0%	3	4,6%	62	95,4%
Gentamicina	(GEN)	0	0%	0	0%	65	100%
Kanamicina	(CAN)	0	0%	0	0%	65	100%
Norfloxacina	(NOR)	0	0%	0	0%	65	100%
Polimixina B	(POL)	0	0%	0	0%	65	100%
Tobramicina	(TOB)	0	0%	0	0%	65	100%
<b>Índice**</b>				<b>12,75%</b>			

(\*) Segundo tabela padrão CLSI (2009).

(\*\*) somatória das percentagens de resistência dividida pelo número de antimicrobianos.

Resistência ao Ácido Nalidíxico foi observada em 54 amostras (83,1%) (TABELA 3). Este resultado é mais alto que o encontrado por Ribeiro et al. (2008) em amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas na região sul do Brasil (30,4%). Também é mais alto que o encontrado no relatório do PREBAF no período de 2004 a 2006 (44,0%). Este resultado deve ser levado em consideração, uma vez que a resistência ao ácido nalidíxico tem sido usada como uma triagem para a resistência a ciprofloxacina, que é utilizada nos tratamentos graves por *Salmonella* em humanos (HAKANEN et al.,1999).

O perfil de resistência e sensibilidade dos sorotipos isolados em amostras de produto final e em amostras das granjas são apresentados nas Tabelas 4,5 e 6. O perfil de resistência aos antimicrobianos Ácido Nalidíxico, Bacitracina, Eritromicina e Nitrofurantoína aparece tanto em cepas isoladas nas granjas, como também no produto final, indicando, como um marcador epidemiológico, a prevalência destas cepas, que apesar das barreiras sanitárias presentes, permaneceram na cadeia produtiva.

Nenhuma resistência foi observada utilizando os antimicrobianos Aztreonam, Cefalotina, Cefoxitina, Enrofloxacina e Estreptomicina, enquanto que os dados do PREBAF apontam altos índices de resistência a estes antimicrobianos (BRASIL, 2008). Os níveis e extensão da resistência são influenciados pelas práticas de uso de antimicrobianos no homem e animais e variam com a região geográfica (AARESTRUP, 2004).

Com relação ao antimicrobiano Nitrofurantoína, apesar da proibição do seu uso em animais destinados à produção de alimentos pelo MAPA (BRASIL, 2003a), neste estudo, 23,0% das cepas apresentaram resistência a este antimicrobiano, sendo que 33,8% apresentaram resultado intermediário. Estes resultados são menores que os encontrados por Ribeiro et al. (2008), em cepas isoladas entre 1999 a 2001 que apresentaram índice de 26,6%, e também inferiores aos índices de 95% descritos por Cardoso et al. (2006) em cepas isoladas em 1995 e 1996. Estes dados indicam uma diminuição da resistência de *Salmonella* spp. a

Nitrofurantóina nos últimos anos, provavelmente como consequência das medidas tomadas pelo MAPA (BRASIL, 2009).

**Tabela 4.** Percentagem de resistência a antimicrobianos dos sorotipos de *Salmonella* isolados no produto final e em granjas no período de 2004 a 2006.

antimicrobianos	Sorotipos de <i>Salmonella</i> (n° de cepas examinadas)																					
	Enteritidis (44)		Newport (5)		Senftenberg (3)		Enterica-rugosa (3)		Infantis (2)		Mbandaka (2)		Kentucky (2)		Typhimurium (1)		Agona (1)		Livingstone (1)		Schwarzengrund (1)	
	R*(%)	S*(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)
NAL	97,7	2,3	40	60	100	0	100	0	0	100	50	50	50	50	100	0	0	100	0	100	0	100
BAC	97,7	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	50	0	100	0	100	0	100	0	100	0
ERI	86,4	0	60	0	33,3	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
NIT	22,7	34	20	60	66,6	33,3	33,3	0	0	100	50	50	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
AMI	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
AMP	0	100	0	100	0	100	33,3	66,7	100	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
AMO	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
ATM	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
CFL	0	100	0	80	0	100	0	100	0	50	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
CFO	0	88,6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
CTX	0	88,6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
CIP	0	86,4	0	100	0	100	0	66,7	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
CLO	0	88,6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
COL	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
DOX	0	88,6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0
ENO	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
EST	0	100	0	60	0	33,3	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
GEN	0	100	0	100	0	33,3	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
CAN	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
NOR	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
POL	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
SUT	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0
TET	0	100	40	60	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0
TOB	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
<b>Índice**</b>	12,7%		10,8%		12,5%		15,3%		16,7%		12,5%		8,3%		12,5%		8,3%		8,3%		20,8%	

(\*) Segundo tabela padrão CLSI (2009); (\*\*) somatória das percentagens de resistência dividida pelo número de antimicrobianos. R (Resistente); S (sensível).

**Tabela 5.** Percentagem de resistência a antimicrobianos das 39 cepas de *Salmonella* spp. isoladas no produto final (carcaças e cortes de frango) no período de 2004 a 2006.

antimicrobianos	Sorotipos de <i>Salmonella</i> (n° de cepas examinadas)																								
	Enteritidis			Newport			Senftenberg			Mbandaka			Kentucky			Livingstone			Agona			Infantis			
	(26)			(4)			(2)			(2)			(2)			(1)			(1)			(1)			
	R*(%)	I*(%)	S*(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	
NAL	100			25		75	100			50		50	50			50			100			100			100
BAC	100				100		100			100			50	50		100			100			100			100
ERI	84,6	15,4		50	50		100			100			100			100			100			100			100
NIT	26,9	38,5	34,6	25		75	50		50	50		50			100			100			100			100	100
AMI			100			100			100			100			100			100			100			100	100
AMP			100			100			100			100			100			100			100			100	100
AMO			100			100			100			100			100			100			100			100	100
ATM			100			100			100			100			100			100			100			100	100
CFO			100			100			100			100			100			100			100			100	100
CTX			100			100			100			100			100			100			100			100	100
CIP			100			100			100			100			100			100			100			100	100
CLO			100			100			100			100			100			100			100			100	100
COL			100			100			100			100			100			100			100			100	100
DOX			100			100			100			100			100			100			100			100	100
ENO			100			100			100			100			100			100			100			100	100
EST			100		50	50			100			100			100			100			100			100	100
GEN			100			100			100			100			100			100			100			100	100
CAN			100			100			100			100			100			100			100			100	100
NOR			100			100			100			100			100			100			100			100	100
POL			100			100			100			100			100			100			100			100	100
SUT			100			100			100			100			100			100			100			100	100
TET			100	50		50			100			100			100			100			100			100	100
TOB			100			100			100			100			100			100			100			100	100
CFL			100			100			100			100			100			100			100			100	100
<b>Índice**</b>	13,0%			6,3%			14,6%			12,5%			8,3%			8,3%			8,3%			16,7%			

(\*) Segundo tabela padrão CLSI (2009).

(\*\*) somatória das percentagens de resistência dividida pelo número de antimicrobianos. R (Resistente); I (Intermediário); S (sensível).

**Tabela 6.** Percentagem de resistência a antimicrobianos das 26 cepas de *Salmonella* isoladas nos matrizeiros (aves vivas reprodutoras e farinha de penas) no período de 2004 a 2006.

antimicrobianos	Sorotipos de <i>Salmonella</i> (n° de cepas examinadas)																				
	Enteritidis			Newport			Senftenberg			Entérica rugosa			Typhimurium			Schwarzengrund			Infantis		
	(18)			(1)			(1)			(3)			(1)			(1)			(1)		
	R*(%)	I*(%)	S*(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)
NAL	94,4		5,6	100			100			100			100			100					100
BAC	100			100			100			100			100			100			100		
ERI	88,8	11,1		100			100			100			100			100			100		
NIT	16,6	50	33,3		100		100			33,3	66,6				100			100			100
AMI			100			100			100			100			100			100			100
AMP			100			100			100	33,3		66,6			100			100	100		
AMO			100			100			100			100			100			100	100		
ATM			100			100			100			100			100			100			100
CFO			100			100			100			100			100			100			100
CTX			100			100			100			100			100			100			100
CIP		5,6	94,4			100			100		33,3	66,6			100			100			100
CLO			100			100			100			100			100			100			100
COL			100			100			100			100			100			100			100
DOX			100			100			100			100			100	100					100
ENO			100			100			100			100			100			100			100
EST			100			100			100			100			100		100				100
GEN			100			100			100			100			100			100			100
CAN			100			100			100			100			100			100			100
NOR			100			100			100			100			100			100			100
POL			100			100			100			100			100			100			100
SUT			100			100			100			100			100	100					100
TET			100	50		50			100			100			100	100					100
TOB			100			100			100			100			100			100			100
CFL			100		100				100			100			100			100			100
<b>Índice**</b>	<b>12,5%</b>			<b>14,6%</b>			<b>16,7%</b>			<b>15,3%</b>			<b>12,5%</b>			<b>20,8%</b>			<b>16,7%</b>		

(\*) Segundo tabela padrão CLSI (2009).

(\*\*) somatória das percentagens de resistência dividida pelo número de antimicrobianos. R (Resistente); I (Intermediário); S (sensível).

### 5.3 Avaliação da formação de Biofilmes

Para a avaliação da formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável, foram selecionadas cinco cepas pertencentes a sorotipos diferentes e apresentando diferentes perfis de resistência a antimicrobianos:

*S.Typhimurium* – cepa P1-21, isolada de matriz viva, resistente a: Nal, Bac e Eri

*S.Newport* – cepa P1-44, isolada de carcaça inteira, resistente a: Bac, Nit e Tet

*S.Senfthenberg* – cepa P1-50, isolada de filé de peito, resistente a: Nal, Bac, Eri e Nit

*S.Infantis* – cepa P1-59, isolada de carcaça inteira, resistente a: Amp, Amo, Bac e Eri

*S.Enteritidis* – cepa P1-64, isolada de coxa e sobrecoxa, resistente a: Nal e Bac

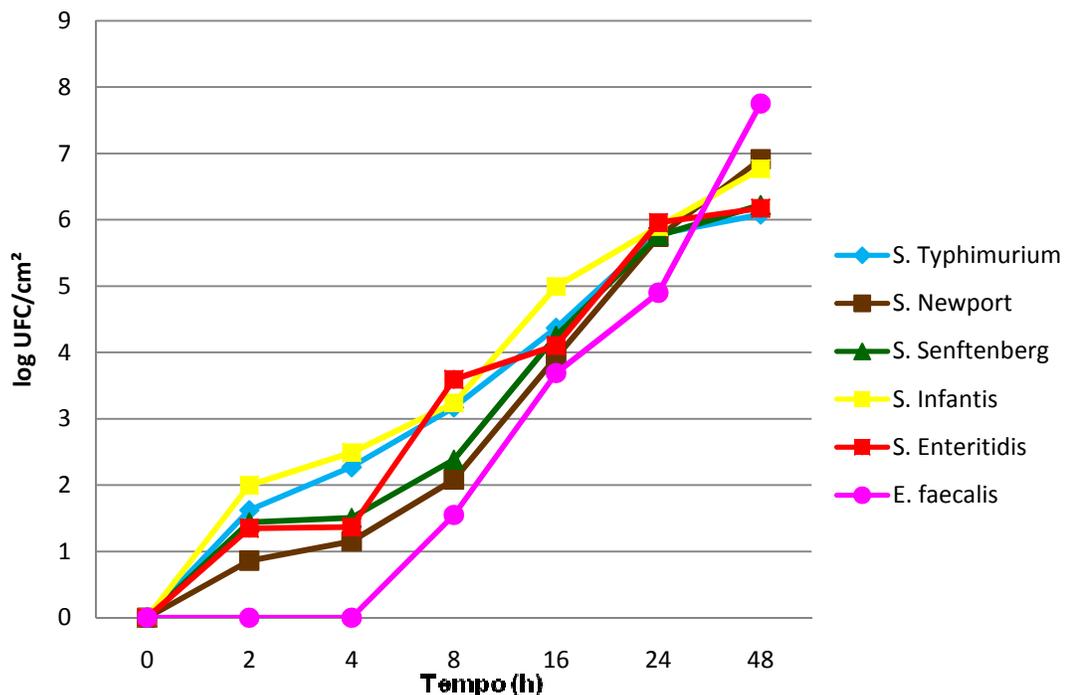
Foram utilizados dois meios de cultura: caldo de soja e tripticaseína (TSB) (DIFCO), comumente usado nas avaliações de formação de biofilme por *Salmonella* spp. (JOSEPH, OTTA, KARUNASAGAR, 2001; GIAOURIS, NYCHAS, 2006; OLIVEIRA et al., 2007; MANIJEH, MOHAMMAD, ROHA, 2008) e água peptonada tamponada (APT) 0,1%, usado em diluições seriadas de amostras para análise (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001). O caldo TSB (17,0 g/L de digestão pancreática de caseína, 3,0 g/L de digestão enzimática de farinha de soja, 2,5 g/L de dextrose, 5,0 g/L cloreto de sódio e 2,5 g/L de fosfato dipotássico) é considerado um caldo nutritivo de uso geral para o crescimento de uma grande variedade de micro-organismos, incluindo fungos e bactérias aeróbias, anaeróbias, aero/anaeróbias facultativas. O caldo APT (10 g/L de peptona, 5 g/L cloreto de sódio, 3,5 g/L fosfato de sódio dibásico e 1,5 g/L de fosfato de potássio monobásico), além de apresentar pH e pressão osmótica estáveis, é livre de carboidratos que favoreçam o crescimento bacteriano, evitando assim o acúmulo de ácidos e outras substâncias tóxicas nos cultivos. É usado como meio de pré-enriquecimento para aumentar a recuperação de células injuriadas de *Salmonella* dos alimentos. Na concentração de 0,1%, o APT é utilizado no preparo de diluições seriadas de micro-organismos, transferência de células para outros meios e manutenção de culturas por períodos curtos. Estes dois caldos foram

utilizados nas avaliações de formação de biofilmes com o objetivo de comparar a capacidade das cepas desenvolverem biofilmes em superfície de aço inoxidável na presença de substrato rico em nutrientes como proteínas e carboidratos e em condições de restrição de nutrientes.

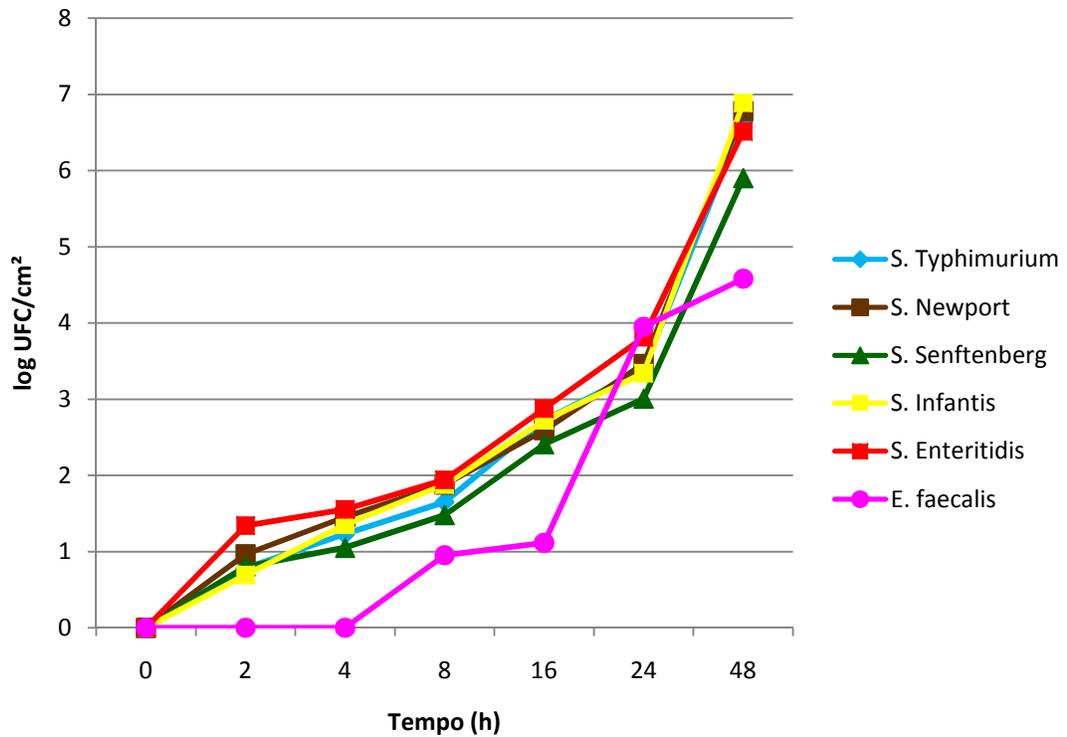
Baseado em trabalhos sobre enumeração de *Salmonella* em carcaças de frango, o inóculo inicial utilizado na formação de biofilmes foi definido como  $10^2$  UFC/mL (BOKANYI, STEPHENS, FOSTER, 1990; IZAT, YAMAGUCHI, KANIAWATI, 1991; DUFRENNE, RITMEESTER, VAN ASCH, 2001; RISTORI et al., 2008).

### 5.3.1 Formação de biofilme em cultivo isolado

Os desenvolvimentos das populações de células aderidas à superfície dos cupons de aço inoxidável são apresentados nas figuras 8 e 9.



**Figura 8.** População (log UFC/cm<sup>2</sup>) de células sésseis de sorotipos de *Salmonella* e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivos isolados em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.



**Figura 9.** População (log UFC/cm<sup>2</sup>) de células sésseis de sorotipos de *Salmonella* sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivos isolados em água peptonada tamponada (APT) 0,1% a 20°C.

Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 representam os valores das contagens de células aderidas sobre a superfície de aço inoxidável após 2, 4, 8, 16, 24 e 48 horas de cultivo a 20°C na presença de TSB e APT 0,1%, respectivamente. Todos os sorotipos de *Salmonella* apresentaram contagens em torno de 6 logUFC/cm<sup>2</sup>, após 48 horas de cultivo.

**Tabela 7.** População de diferentes sorotipos de *Salmonella* e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 em biofilmes formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.

Micro-organismo	Contagem (log UFC/cm <sup>2</sup> *± DP**)					
	2 horas	4 horas	8 horas	16 horas	24 horas	48 horas
<i>S. Typhimurium</i>	1,62±0,14 <sup>ab</sup>	2,27±0,09 <sup>ab</sup>	3,17±0,07 <sup>a</sup>	4,37±0,15 <sup>ab</sup>	5,78±0,31 <sup>ab</sup>	6,08±0,02 <sup>b</sup>
<i>S. Newport</i>	0,86±0,02 <sup>c</sup>	1,51±0,64 <sup>bc</sup>	2,08±0,50 <sup>bc</sup>	3,92±0,18 <sup>bc</sup>	5,74±0,25 <sup>ab</sup>	6,91±0,23 <sup>ac</sup>
<i>S. Senftenberg</i>	1,43±0,39 <sup>b</sup>	1,50±0,38 <sup>bc</sup>	2,38±0,05 <sup>b</sup>	4,25±0,12 <sup>bc</sup>	5,76±0,32 <sup>ab</sup>	6,22±0,32 <sup>b</sup>
<i>S. Infantis</i>	1,99±0,10 <sup>a</sup>	2,49±0,08 <sup>a</sup>	3,23±0,15 <sup>a</sup>	4,99±0,42 <sup>a</sup>	5,89±0,59 <sup>a</sup>	6,76±0,30 <sup>a</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	1,35±0,12 <sup>bc</sup>	1,36±0,04 <sup>c</sup>	3,60±0,02 <sup>a</sup>	4,10±0,10 <sup>bc</sup>	5,95±0,23 <sup>a</sup>	6,17±0,02 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i>	<1 <sup>d</sup>	<1 <sup>d</sup>	1,16±0,12 <sup>c</sup>	3,68±0,28 <sup>c</sup>	4,90±0,12 <sup>b</sup>	7,75±0,12 <sup>d</sup>

\* Média de três repetições independentes, em duplicata; \*\* Desvio padrão.

Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente  $p < 0,05$  no teste de Tukey.

**Tabela 8.** População de diferentes sorotipos de *Salmonella* e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 em biofilmes formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em água peptonada tamponada a 0,1% (APT) a 20°C.

Micro-organismo	Contagem (log UFC/cm <sup>2</sup> *± DP**)					
	2 horas	4 horas	8 horas	16 horas	24 horas	48 horas
<i>S. Typhimurium</i>	0,78±0,66 <sup>ab</sup>	1,22±0,19 <sup>a</sup>	1,65±0,39 <sup>a</sup>	2,72±0,20 <sup>a</sup>	3,38±0,13 <sup>a</sup>	6,65±0,02 <sup>ab</sup>
<i>S. Newport</i>	0,96±0,27 <sup>ab</sup>	1,45 0,10 <sup>a</sup>	1,88±0,41 <sup>a</sup>	2,59±0,92 <sup>ab</sup>	3,45±1,26 <sup>a</sup>	6,77±0,21 <sup>a</sup>
<i>S. Senftenberg</i>	0,80±0,70 <sup>ab</sup>	1,05±0,63 <sup>a</sup>	1,47±0,37 <sup>a</sup>	2,40±0,41 <sup>ab</sup>	3,00±0,25 <sup>a</sup>	5,90± 0,40 <sup>bc</sup>
<i>S. Infantis</i>	0,69±0,53 <sup>ab</sup>	1,35±0,24 <sup>a</sup>	1,87±0,33 <sup>a</sup>	2,72±0,48 <sup>a</sup>	3,34±0,23 <sup>a</sup>	6,88±0,30 <sup>a</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	1,34±0,18 <sup>a</sup>	1,55±0,34 <sup>a</sup>	1,94±0,50 <sup>a</sup>	2,87±0,78 <sup>a</sup>	3,80±0,73 <sup>a</sup>	6,51±0,38 <sup>ab</sup>
<i>E. faecalis</i>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	0,95±0,14 <sup>a</sup>	1,11±0,23 <sup>b</sup>	3,95±0,15 <sup>a</sup>	5,58±0,16 <sup>c</sup>

\* Média de três repetições independentes, em duplicata; \*\* Desvio padrão.

Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente  $p < 0,05$  no teste de Tukey.

Após 24 horas de incubação dos cupons à temperatura de 20°C, todos os sorotipos de *Salmonella* apresentaram contagens de células aderidas superiores a 5 log UFC/cm<sup>2</sup> no cultivo em TSB e inferiores a 4 log UFC/cm<sup>2</sup> no cultivo em APT 0,1%. Porém, após 48 horas a 20°C, todas as cepas cultivadas em TSB e também em APT 0,1% apresentaram contagens em torno de 6 log UFC/cm<sup>2</sup>. Estes dados demonstram a capacidade de cepas de *Salmonella* formarem biofilmes também em condições de restrição de nutrientes, mesmo que tardiamente.

Giaouris e Nychas (2006) avaliaram a formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis PT4 sobre superfície de aço inoxidável utilizando meio de cultivo TSB à temperatura de 20°C ao longo de 18 dias. Observaram que os cupons submetidos à constante renovação de cultivo com meio TSB fresco, isto é, em constante presença de nutrientes como fontes de carbono, apresentaram uma máxima

densidade populacional de células aderidas em torno de 6 log UFC/cm<sup>2</sup> após 14 ou 15 dias. Por outro lado, os cupons não submetidos à renovação do meio de cultivo, após o mesmo período, apresentaram contagens em torno de 4 log UFC/cm<sup>2</sup>. Estes dados comprovam a influência dos nutrientes disponíveis nos meios de cultivo para o desenvolvimento de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis e a facilidade com que estas células se adaptam em condições de restrição de nutrientes apresentando contagens relativamente elevadas de células aderidas mesmo em cultivos com baixos níveis de fontes de carbono (GIAOURIS, NYCHAS, 2006).

Em outro estudo, Gerstel e Romling (2001) verificaram uma máxima expressão de fímbrias de adesão agregativa na superfície de células de *Salmonella* Typhimurium, quando cultivadas na presença de baixos níveis de nutrientes. Estas estruturas de superfície das células favoreceram o aumento da população de células sésseis, em detrimento da população de células planctônicas aumentando o número de células aderidas (GERSTEL, ROMLING, 2001). Stepanovic et al. (2004) também verificaram o aumento de células de *Salmonella* spp. aderidas à superfície de poliestireno quando em cultivo utilizando meio TSB diluído 1:20, ou seja, observaram um melhor desempenho na formação de biofilmes por estas células quando na presença de meio com restrição de nutrientes (STEPANOVIC et al., 2004).

O *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 em cultivo isolado em TSB, comparando-se com as cepas de *Salmonella*, apresentou desenvolvimento lento inicialmente com contagens inferiores a 5 log UFC/cm<sup>2</sup> após 24 horas. Porém, após 48 horas, as contagens apresentaram valores médios de 7,7 log UFC/cm<sup>2</sup>, superiores aos encontrados nos biofilmes formados por *Salmonella*. No cultivo isolado em APT 0,1% as contagens alcançaram valores em torno de 4 log UFC/cm<sup>2</sup> e 5,5 log UFC/cm<sup>2</sup> após 24 e 48 horas, respectivamente.

Vários estudos descrevem a formação de biofilmes por *Salmonella* sobre diversas superfícies. Manijeh, Mohammad e Roha (2008) avaliaram a formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis sobre vidro, borracha e aço inoxidável utilizando meio de cultivo TSB. Os resultados encontrados em aço inoxidável

foram de 3 log UFC/cm<sup>2</sup> após 2 horas de cultivo a 37°C. Estes dados foram superiores aos encontrados neste estudo (1,35 log UFC/cm<sup>2</sup> após 2 horas) e após 20 horas de cultivo a 37°C, as contagens alcançaram valores de 6 log UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto que neste estudo, a 20°C, este número foi detectado somente após 48 horas de cultivo. Em outro estudo, Stepanovic et al. (2003) avaliaram a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. em superfície de poliestireno utilizando várias temperaturas de cultivo e constataram que as maiores contagens de células de *Salmonella* spp. aderidas ocorreram à temperatura de 22°C, após 48 horas (STEPANOVIC et al., 2003).

Em geral, neste trabalho, as contagens de células de *Salmonella* aderidas à superfície de aço inoxidável, após 48 horas a 20°C, atingiram valores acima de 10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, mesmo em condições de restrição de nutrientes. Considerando que todas as contagens de células aderidas após a etapa de remoção das células planctônicas são consideradas como biofilmes segundo vários autores (RONNER, WONG, 1993; WIRTANEN, HUSMARK, MATTILA-SANDHOLM, 1996), após 8 horas em meio TSB, já se observa a formação de biofilmes, com contagens acima de 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, pelos sorotipos Typhimurium, Infantis e Enteritidis. Os sorotipos Newport e Senftenberg apresentaram contagens superiores a 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup> somente após 16 horas.

Estas diferenças de contagens de células aderidas dos diferentes sorotipos de *Salmonella* nos biofilmes são mencionadas na literatura. Agarwal et al. (2011) compararam a capacidade de 69 diferentes sorotipos de *Salmonella* de formar biofilmes sobre superfície de plástico na presença dos meios TSB e Luria-Bertani (LB), à temperatura de 37°C nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Baseando-se em leitura de densidade óptica da população de células aderidas após 48 horas, classificaram os sorotipos estudados em 3 categorias: amostras apresentando “intensa formação de biofilme”, “moderada formação de biofilme” e “fraca formação de biofilme”. Dentre os sorotipos que apresentaram “moderada formação de biofilme” foram incluídos os sorotipos Typhimurium, Enteritidis e Senftenberg. O sorotipo Newport foi considerado um dos sorotipos que apresentaram “intensa formação de biofilme”. O sorotipo Infantis não foi avaliado neste estudo

(AGARWAL et al., 2011). As contagens de células aderidas sobre a superfície de aço inoxidável após 48 horas em TSB verificadas neste estudo, estão de acordo com os resultados encontrados por Agarwal et al. (2011), apesar das diferenças de superfície e temperaturas estudadas. Em meio TSB, após 48 horas, os sorotipos Typhimurium, Senftenberg e Enteritidis apresentaram contagens de células sésseis que não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Tukey, enquanto que o Sorotipo Newport e Infantis apresentaram contagem de células aderidas semelhantes entre si, porém superiores aos outros sorotipos, conforme demonstrado na Tabela 7.

A portaria 210 do Ministério da Agricultura e Abastecimento estabelece que a temperatura da sala de cortes e/ou desossa dos abatedouros avícolas não deve ser superior a 12°C (BRASIL, 1998b). Geralmente, as plantas de processamento de frangos não funcionam aos finais de semana ou durante feriados prolongados. Nestas ocasiões, a refrigeração ambiente é desligada e a temperatura destes locais pode atingir 20°C ou mais.

A portaria 210 ainda estabelece que a temperatura da água dos tanques de pré-resfriamento (*pré-chiller*), medida no ponto de entrada das carcaças de frango, não deve ser superior a 16°C (BRASIL, 1998b). Na realidade, esta temperatura pode alcançar valores próximos de 20°C, considerando que um grande número de carcaças apresentando temperatura em torno de 40°C é adicionado simultaneamente no *pré-chiller* (LOPES et al., 2007). Volume e fluxo inadequados de água também podem contribuir para o aumento da temperatura da água nos tanque de pré-resfriamento (LOPES et al., 2007).

Considerando a temperatura de 20°C e um período de 48 horas, variáveis avaliadas neste trabalho, associadas às possíveis práticas ineficientes de higienização nos ambientes de cortes e/ou desossa e equipamentos, a probabilidade de adesão de células e formação de biofilmes aumentam, conforme os dados mostrados neste estudo. Uma vez o biofilme formado, ele passa a ser uma fonte de contaminação na linha de processamento dos frangos.

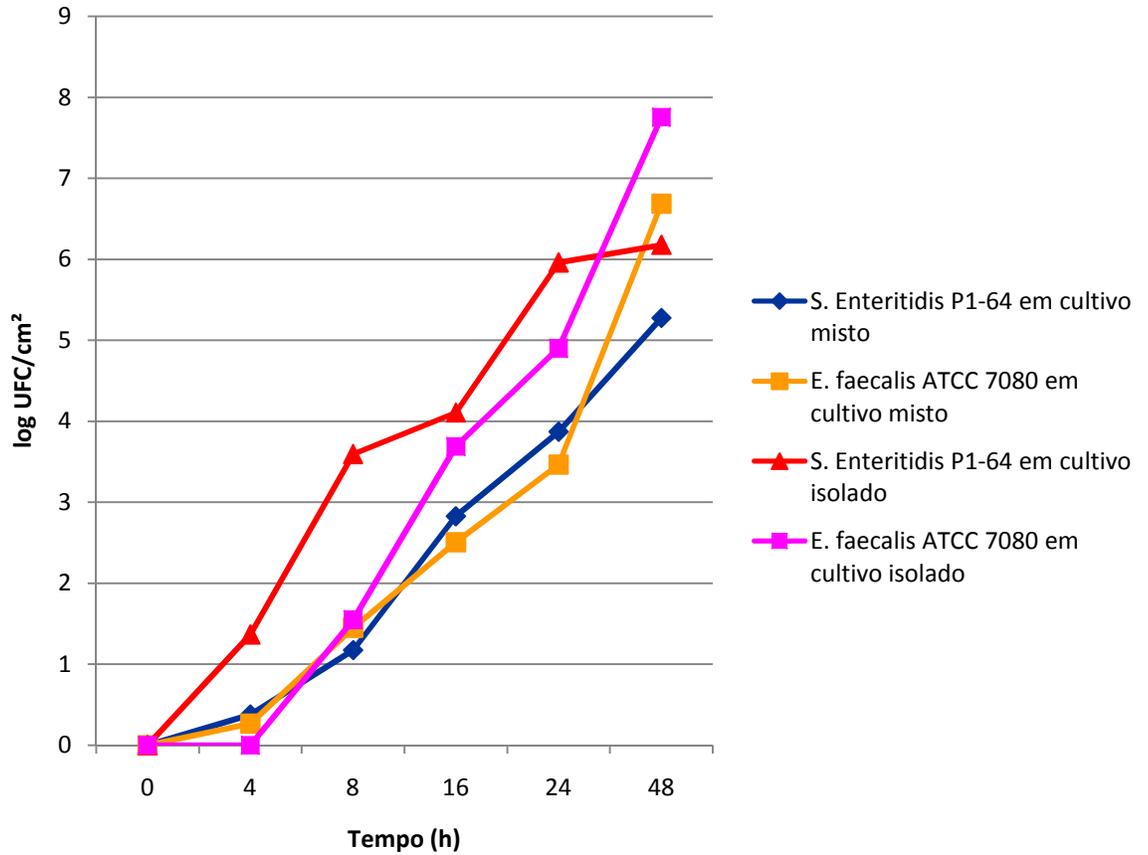
### 5.3.2 Formação de biofilme em cultivo misto

Nas indústrias de alimentos, a maioria das espécies de micro-organismos não é encontrada isoladamente, mas em comunidades com duas ou mais espécies interagindo entre si (SADOWSKA et al., 2010).

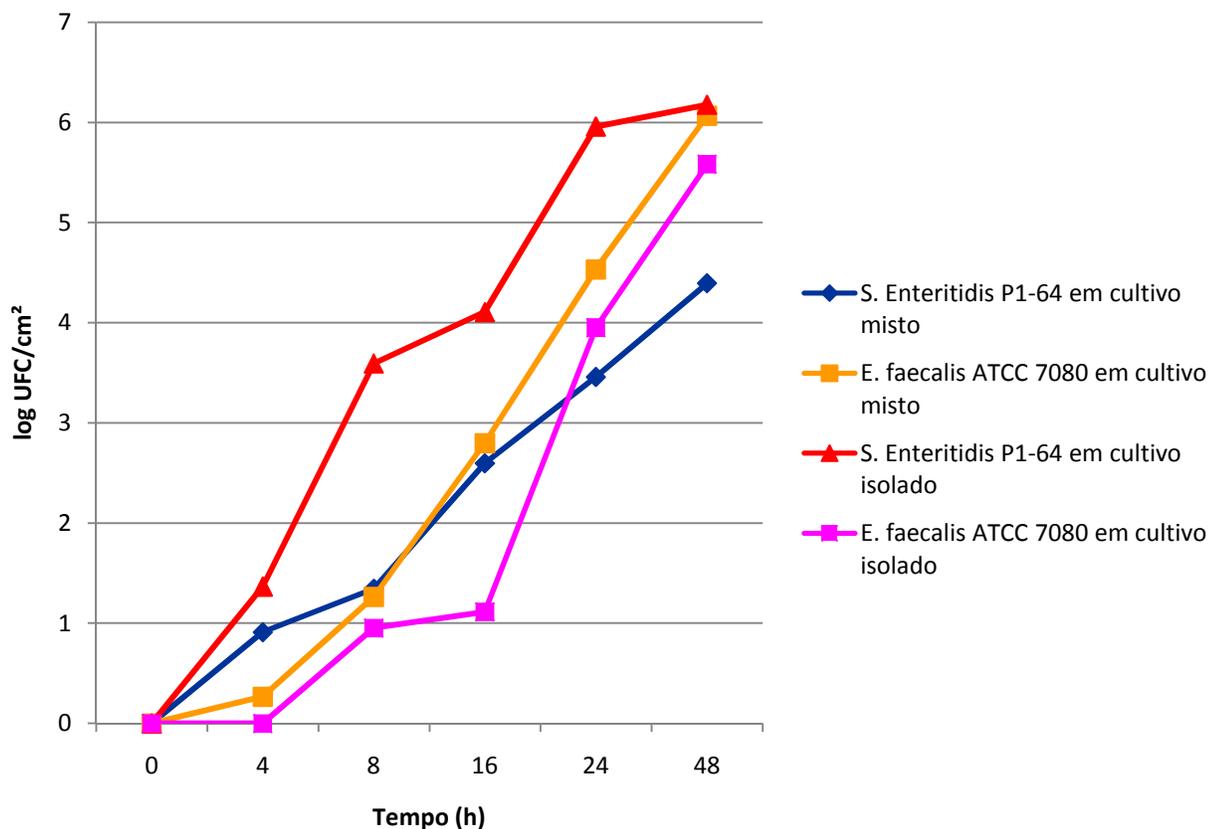
Na avaliação de formação de biofilme em cultivo misto, foram selecionadas duas espécies que apresentam alta incidência em produtos avícolas: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (cepa P1-64) e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080.

A evolução das contagens de células aderidas à superfície de aço inoxidável em cultivo misto e em cultivo isolado em caldo de soja e tripticaseína (TSB) é apresentada na figura 10 e em água peptonada tamponada (APT) a 0,1% é apresentada na figura 11.

As populações de *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* em biofilme multiespécie formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB) e água peptonada tamponada 0,1% (APT) são apresentadas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.



**Figura 10.** População (log UFC/cm<sup>2</sup>) de células sésseis de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivo misto e isolado em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.



**Figura 11.** População (log UFC/cm<sup>2</sup>) de células sésseis de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1- 64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em cultivo misto e isolado em água peptonada tamponada (APT) 0,1% a 20°C.

**Tabela 9.** População de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080, em biofilme multiespécie formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C.

Micro-organismo	Contagem (log UFC/cm <sup>2</sup> *±DP**)				
	4 horas	8 horas	16 horas	24 horas	48 horas
<i>S. Enteritidis</i>	0,37 ± 0,32 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,82 <sup>a</sup>	2,82 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,96 <sup>a</sup>	5,27 ± 0,85 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i>	0,26 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,55 <sup>a</sup>	3,46 ± 0,70 <sup>a</sup>	6,68 ± 0,02 <sup>a</sup>

\* Média de três repetições independentes, em duplicata; \*\* Desvio padrão

Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente p< 0,05 no teste de Tukey.

**Tabela 10.** População de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080, em biofilme multiespécie formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em água peptonada tamponada (APT) 0,1% a 20°C.

Micro-organismo	Contagem (log UFC/cm <sup>2</sup> *±DP**)				
	4 horas	8 horas	16 horas	24 horas	48 horas
<i>S. Enteritidis</i>	0,91 ± 0,97 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,82 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,45 ± 0,19 <sup>b</sup>	4,40 ± 0,60 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i>	0,26 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,54 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,78 <sup>a</sup>	4,53 ± 0,62 <sup>a</sup>	6,06 ± 0,97 <sup>a</sup>

\* Média de três repetições independentes, em duplicata; \*\* Desvio padrão

Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente p< 0,05 no teste de Tukey.

Comparando as contagens de células de *Salmonella* Enteritidis aderidas nos cupons tanto no cultivo isolado como no cultivo misto com *Enterococcus faecalis*, em cultivo misto as contagens foram inferiores em relação às contagens verificadas no cultivo isolado. Em caldo TSB, após 4 horas, a diferença foi de 0,99 log UFC, após 8 horas a diferença aumentou para 2,43 log UFC. Após 16 horas e

24 horas, as diferenças foram de 1,28 e 2,09 log UFC, respectivamente e após 48 horas, a diferença diminuiu para 0,90 log UFC. Com relação ao *Enterococcus faecalis*, em meio TSB, o comportamento foi semelhante ao da *Salmonella* Enteritidis, apresentando diminuição das contagens quando em cultivo misto, mas com diferenças menores que variaram de 0,26 a 1,07 log UFC/cm<sup>2</sup>. Com exceção após 24 horas, quando a diferença entre as contagens em cultivo misto e isolado foi de 1,44 log UFC/cm<sup>2</sup>. Estes dados indicam que apesar da competição entre estes micro-organismos e conseqüentemente diminuição das células aderidas, os micro-organismos avaliados podem coexistir no mesmo ambiente, apresentando a capacidade de aderir e formar biofilmes em meio TSB. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Esper (2010) que avaliou a formação de biofilmes por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus* sobre cupons de aço inoxidável na presença de dois meios distintos de cultivo e observou que ambos podem coexistir num mesmo ambiente e apesar da competição, podem aderir e formar biofilmes. Em outro estudo, Pinto (2005) observou o cultivo misto entre *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* nas temperaturas de 8 e 30°C e verificou comportamentos independentes destes micro-organismos em meio TSB.

Em meio APT 0,1%, as cepas de *Enterococcus faecalis* apresentaram um melhor desempenho em cultivo misto com contagens de células superiores às do cultivo isolado em todos os períodos avaliados. Estes dados revelam que, em meio com restrição de nutrientes, o *Enterococcus faecalis*, quando em cultivo isolado, não apresenta um bom desempenho na formação de biofilmes e as contagens de células aderidas são inferiores às verificadas em meio TSB. Porém, quando em cultivo misto em APT 0,1%, as cepas de *Enterococcus faecalis* apresentaram um melhor desempenho, com células aderidas à superfície dos cupons já nas primeiras 4 horas de cultivo, sendo que em cultivo isolado, foram verificadas células aderidas somente após 8 horas de cultivo. Estes dados são semelhantes aos verificados por Leung et al. (1998), que ao analisarem biofilmes mistos formados por cepas de *Enterococcus* sp e *Escherichia coli*, observaram que inicialmente as cepas de *Escherichia coli* aderiram mais rapidamente à

superfície, o que permitiu e facilitou a posterior adesão das cepas de *Enterococcus sp*, promovendo subsequentemente, o desenvolvimento do biofilme multiespécie (LEUNG et al., 1998).

Analisando os comportamentos dos dois micro-organismos em cultivo misto, as contagens de células aderidas de cada espécie, não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si após 4, 8 e 16 horas de cultivo a 20°C. Porém, após 24 horas e 48 horas em meio APT 0,1%, as contagens de células sésseis de *Enterococcus faecalis* foram superiores às da *Salmonella* Enteritidis, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Tukey. Em meio TSB, essa diferença foi verificada após 48 horas de cultivo. De forma geral, nos dois meios de cultivos avaliados após 48 horas, o *Enterococcus faecalis* se sobressaiu à *Salmonella* Enteritidis apresentando um valor médio de contagem de células aderidas de 1,50 log UFC a mais que as contagens de *Salmonella* (TABELAS 9 e 10). Esta predominância das células de *Enterococcus faecalis* aderidas nos cupons de aço inoxidável, pode ser visualizada nas fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 18).

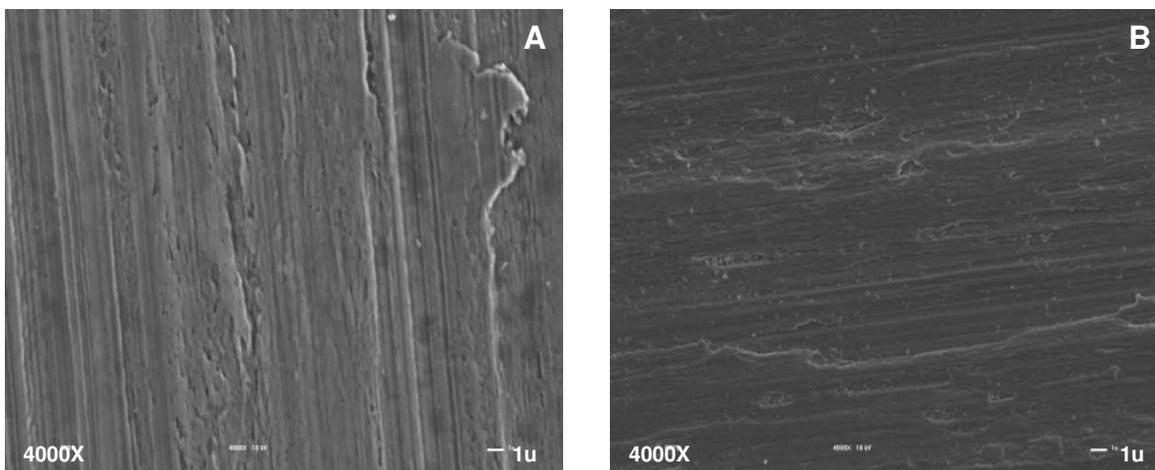
### 5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observar a formação de biofilmes monoespécie e multiespécie sobre os cupons de aço inoxidável, foram realizadas análises em Microscopia eletrônica de Varredura, conforme metodologia descrita no item 4.3.4.

A figura 12 apresenta as fotomicrografias de superfície de aço inoxidável de duas amostras de cupons. Em ambas pode-se observar microranhas na superfície. Estas irregularidades podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização, facilitar o acúmulo de resíduos de alimentos e conseqüentemente adesão e formação de biofilmes por micro-organismos (BOWER, McGUIRE, DAESCHEL, 1996).

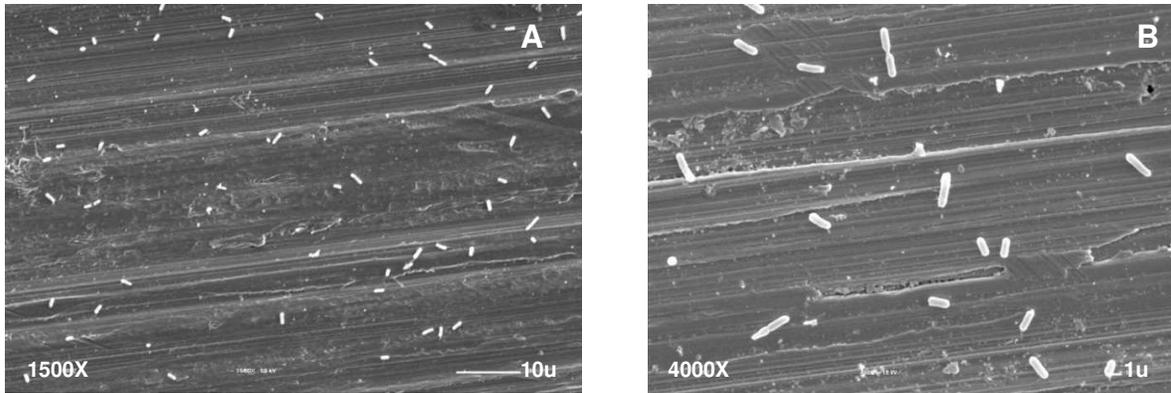
Para comprovar a eficiência da agitação constante (vórtex) utilizada para a remoção das células sésseis aderidas nos cupons, um cupom contendo biofilme formado por *Salmonella enterica* sorotipo Newport P1-44 apresentando contagens

em torno de  $6,5 \log \text{ UFC/cm}^2$ , foi submetido à agitação constante em vórtex por 2 minutos, em seguida submetido ao procedimento de preparo para a visualização em microscopia eletrônica de varredura. A figura 12B apresenta o cupom totalmente livre de células aderidas após a agitação constante em vórtex por 2 minutos.

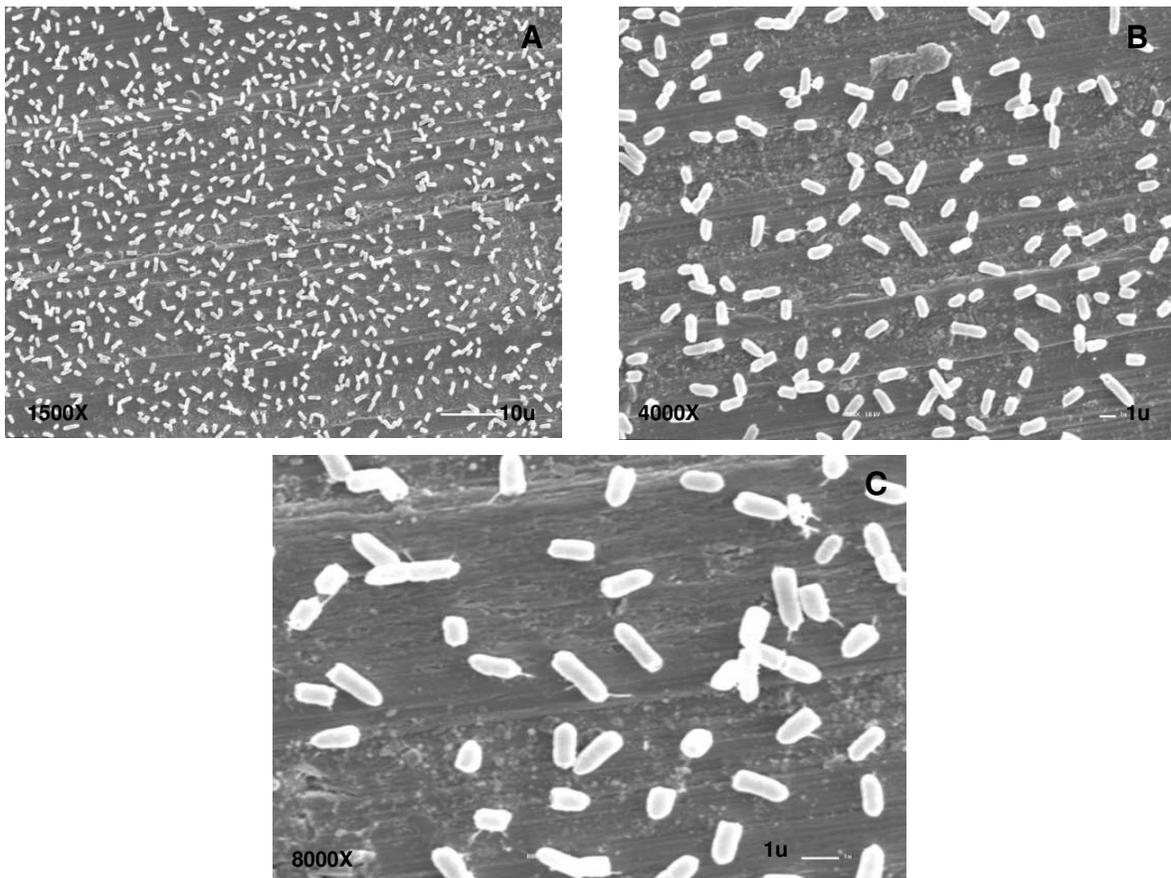


**Figura 12.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, no aumento de 4000X. a) não submetida ao processo formação de biofilme; b) submetida ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Newport P1-44 a 20°C por 48 horas, em seguida remoção do biofilme formado por agitação constante em vórtex por 2 minutos.

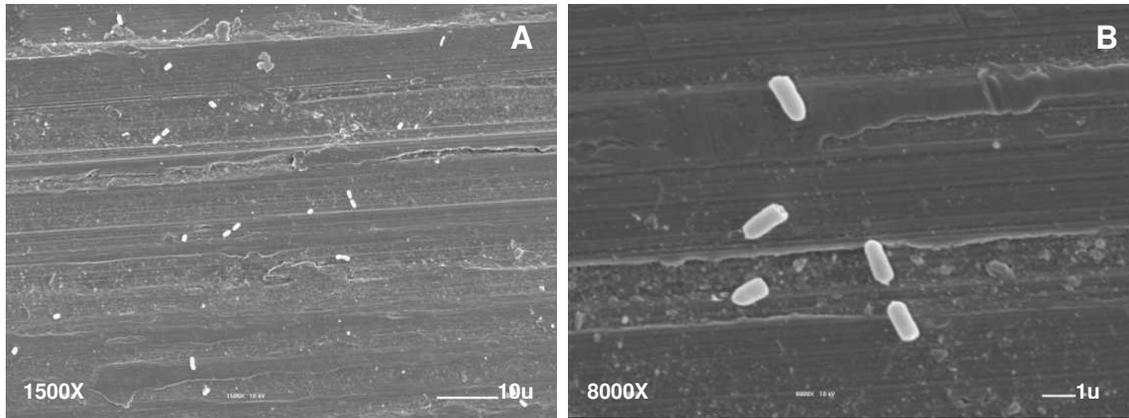
As fotomicrografias de superfícies de cupons de aço inoxidável, submetidas ao processo de adesão e formação de biofilme por sorotipos de *Salmonella* em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C após 48 horas, são apresentadas nas figuras 13, 14, 15 16 e 17. Nestas fotomicrografias pode-se observar a presença de células aderidas de todos os sorotipos avaliados. Pode-se observar também a presença de estruturas flagelares peritríquias que permaneceram intactas após o tratamento de preparo para a microscopia, em algumas células. Estas estruturas, além de conferir mobilidade às bactérias, são componentes importantes nos processos de adesão e formação de biofilmes (CRAWFORD, REEVE, GUN, 2010).



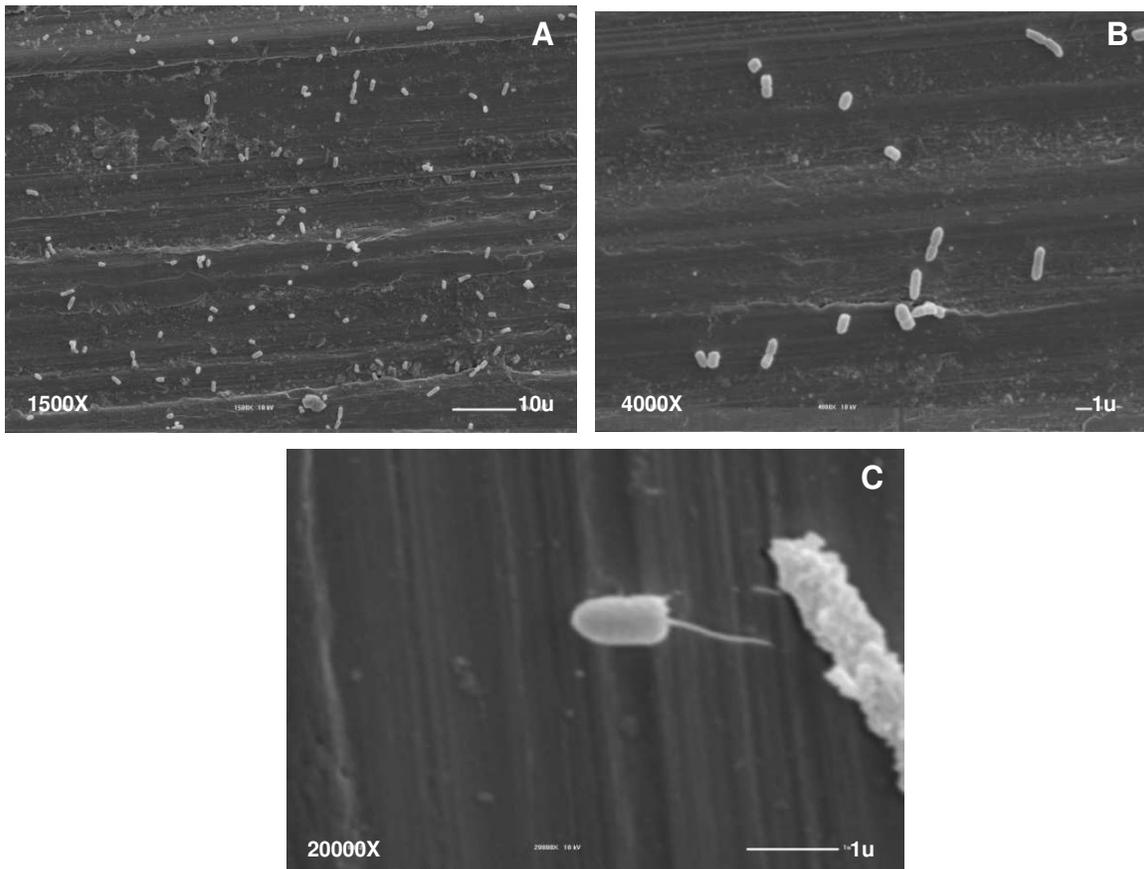
**Figura 13.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium P1-21 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a) e 4000X (b).



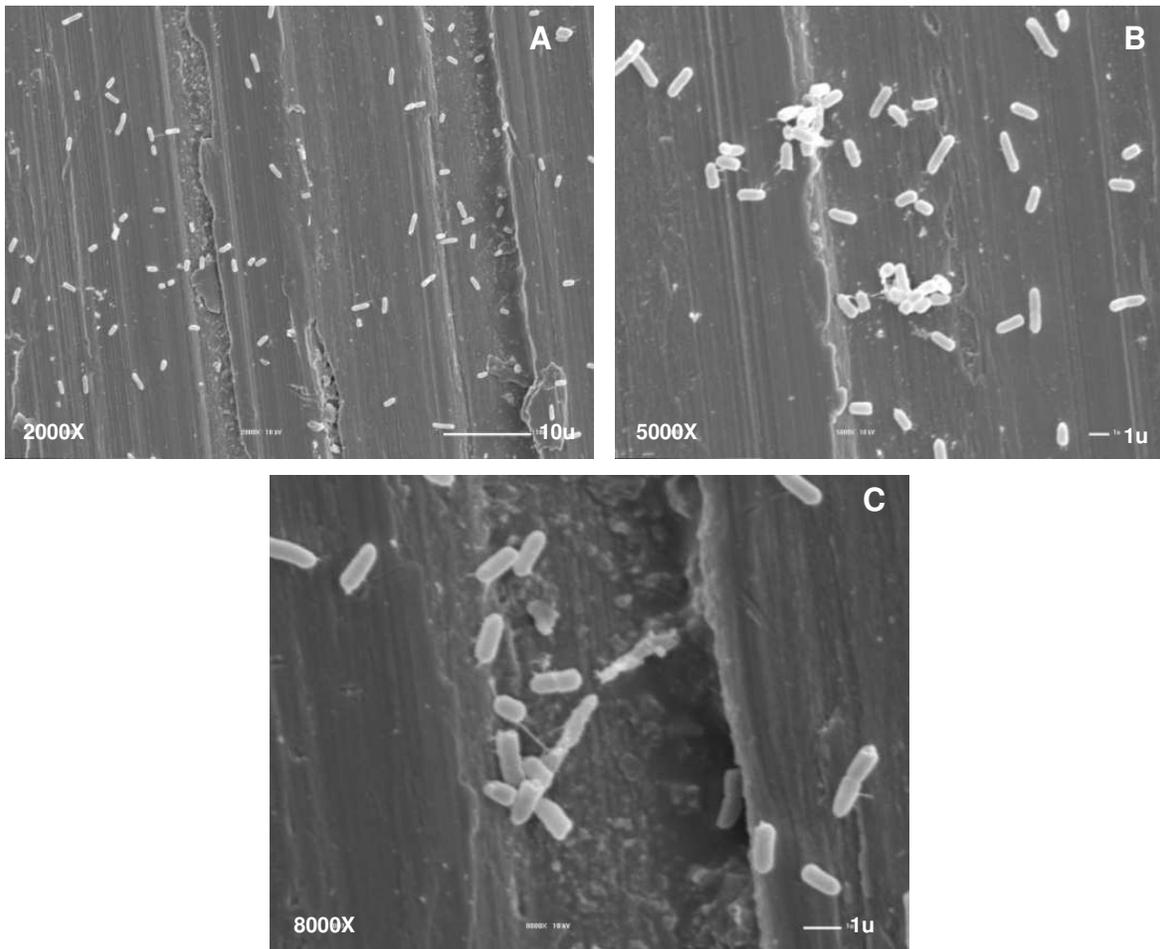
**Figura 14.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Newport P1-44 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a), 4000X (b) e 8000X (c).



**Figura 15.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Senftenberg P1-50 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a) e 8000X (b).



**Figura 16.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Infantis P1-59 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a), 4000X (b) e 20000(c).

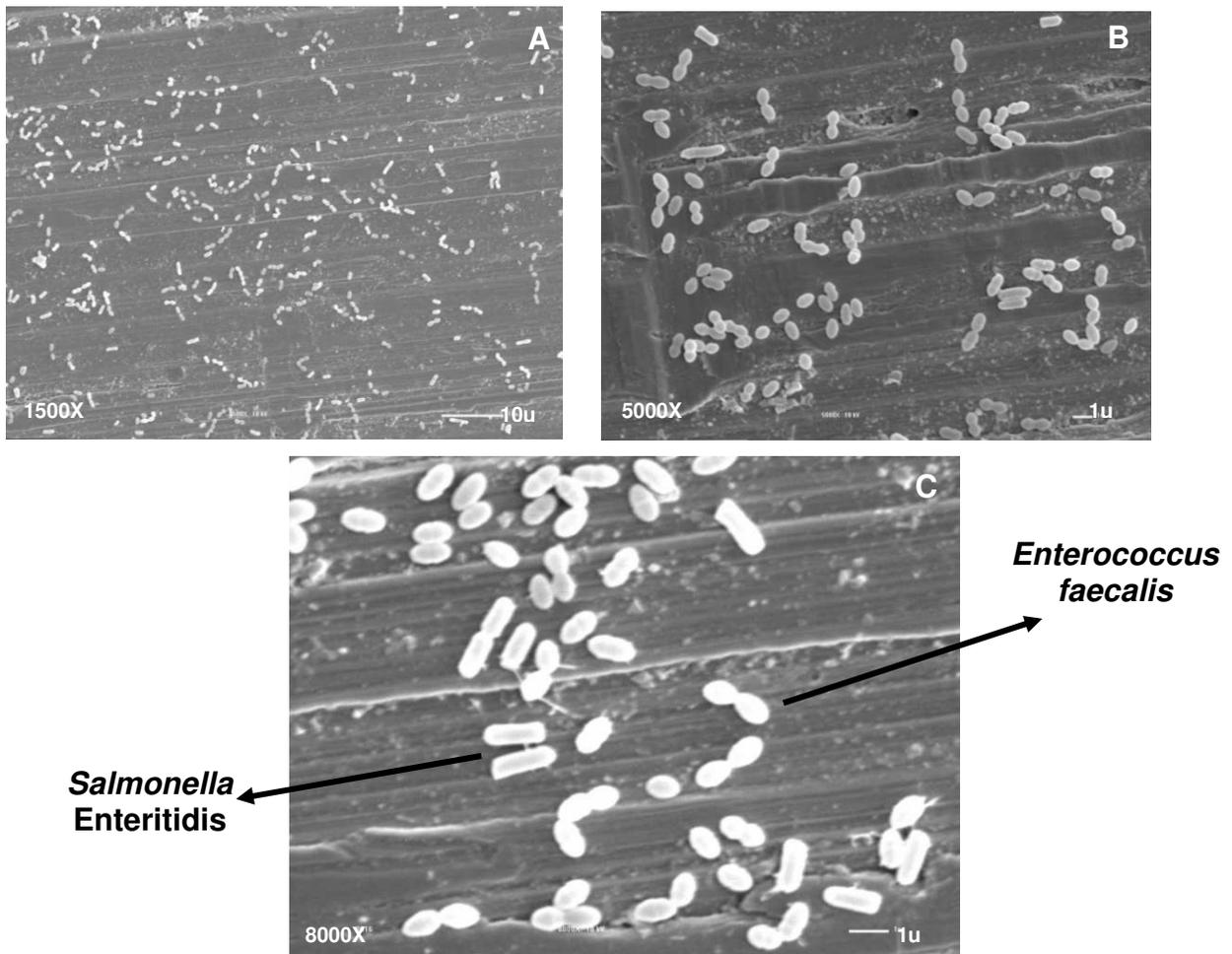


**Figura 17.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 2000X (a), 5000X (b) e 8000X (c).

As fotomicrografias de superfícies de cupons de aço inoxidável, submetidos ao processo de adesão e formação de biofilme por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 em caldo de soja e tripticaseína (TSB) a 20°C após 48 horas são apresentadas na figura 18.

As fotomicrografias permitem a visualização das células de *Enterococcus faecalis*, que aparecem como diplococos, em meio aos bastonetes de *Salmonella* Enteritidis. Pode-se visualizar um maior número de células de *Enterococcus*

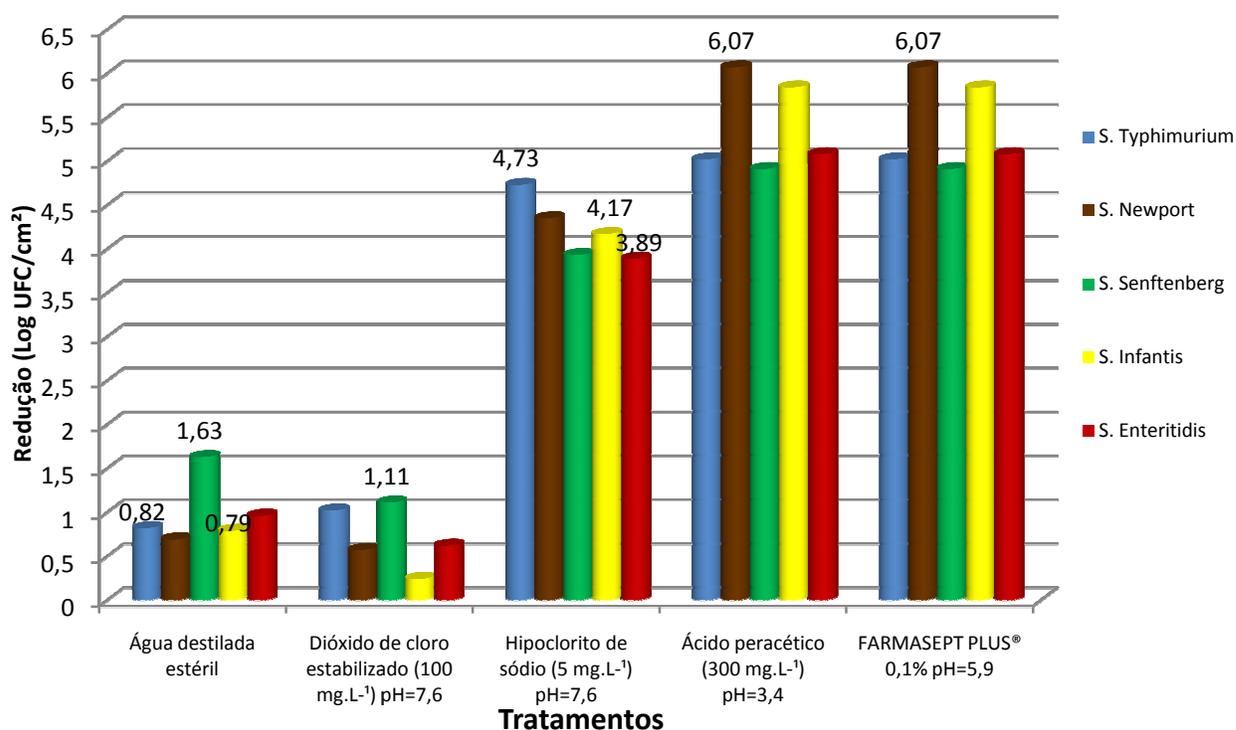
*faecalis* em comparação com o número de células de *Salmonella* Enteritidis, confirmando as contagens realizadas (TABELA 9), que mostraram valores de 6,68 log UFC/cm<sup>2</sup> e 5,27 log UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas, respectivamente, após 48 horas.



**Figura 18.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, submetidos ao processo de formação de biofilme multiespécie por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis P1-64 e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080, a 20°C por 48 horas, nos aumentos de 1500X (a), 5000X (b) e 8000 (c).

## 5.4 Avaliação da eficiência de sanitizantes

Os resultados da avaliação da ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio 5 mg.L<sup>-1</sup>, ácido peracético 300 mg.L<sup>-1</sup>, dióxido de cloro 100 mg.L<sup>-1</sup> e FARMASEPT PLUS® 0,1% sobre as células sésseis em biofilmes de *Salmonella* spp. formados nas superfícies de aço inoxidável são apresentados na Tabela 11 e os valores de redução das contagens de células sésseis após a ação dos sanitizantes são apresentados na Figura 19.



**Figura 19.** Reduções (log UFC/cm<sup>2</sup>) das contagens de células sésseis de sorotipos de *Salmonella* em biofilmes formados em superfície de aço inoxidável AISI 304 #4 por 48 horas a 20°C, em caldo de soja e tripticaseína (TSB), após tratamento com água destilada estéril e sanitizantes por 15 minutos.

**Tabela 11.** Efeito de sanitizantes sobre biofilme de diferentes sorotipos de *Salmonella* formados a 20°C por 48 horas em cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 em caldo de soja e tripticaseína (TSB).

Sorotipos	Contagem Inicial (log UFC/cm <sup>2</sup> *± DP**)	Contagem final (log UFC/cm <sup>2</sup> *± DP**) após tratamentos				
		água destilada estéril	dióxido de cloro estabilizado (100 mg.L <sup>-1</sup> ) pH=7,6	hipoclorito de sódio (5 mg.L <sup>-1</sup> ) pH=7,6	ácido peracético (300 mg.L <sup>-1</sup> ) pH=3,4	FARMASEPT PLUS® 0,1% pH=5,9
<i>S. Typhimurium</i>	5,84 ± 0,18 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,64 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,50 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>
<i>S. Newport</i>	6,76 ± 0,21 <sup>a</sup>	6,07 ± 0,41 <sup>ab</sup>	5,50 ± 0,58 <sup>b</sup>	1,72 ± 0,99 <sup>c</sup>	<1 <sup>d</sup>	<1 <sup>d</sup>
<i>S. Senftenberg</i>	6,54 ± 0,29 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,78 <sup>ab</sup>	3,80 ± 1,10 <sup>b</sup>	0,98 ± 1,45 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>
<i>S. Infantis</i>	6,63 ± 0,23 <sup>a</sup>	5,84 ± 0,34 <sup>a</sup>	5,60 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,67 ± 1,07 <sup>b</sup>	<1 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	6,04 ± 0,48 <sup>a</sup>	5,08 ± 0,65 <sup>ab</sup>	4,46 ± 1,16 <sup>b</sup>	1,19 ± 0,80 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>	<1 <sup>c</sup>

\* Média de três repetições independentes, em duplicata.

\*\* Desvio padrão.

Em cada linha os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente  $p < 0,05$  no teste de Tukey.

A utilização da água destilada estéril como um dos tratamentos permitiu observar uma redução de células aderidas nos cupons que variou entre 0,69 log UFC/cm<sup>2</sup> no sorotipo Newport e 1,63 log UFC/cm<sup>2</sup> no sorotipo Senftenberg. Estes resultados indicam que o atrito resultante da imersão dos cupons na água é suficiente para a remoção de algumas células dos biofilmes, mesmo na ausência de produtos sanitizantes. O sorotipo Newport apresentou o maior número de contagens de células aderidas (6,07 UFC/cm<sup>2</sup>) e menor número de redução após o tratamento com água destilada (0,69 UFC/cm<sup>2</sup>). Estes números confirmam a intensa adesão que este sorotipo apresenta, característica também observada por Agarwal et al. (2011), enquanto que os demais sorotipos apresentam uma adesão considerada “moderada”, segundo estes autores (AGARWAL et al., 2011).

Neste estudo, segundo o teste de Tukey, não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as contagens de células aderidas dos sorotipo após cada tratamento avaliado.

O tratamento com dióxido de cloro estabilizado a 100 mg.L<sup>-1</sup>, apresentou baixa eficiência em todos os sorotipos estudados, com diminuição de 1,11 log UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas de *Salmonella* Senftenberg, diminuição em torno de apenas 1 logaritmo de *Salmonella* Typhimurium e menos que 1 logaritmo nos demais sorotipos. Segundo o teste de Tukey, com exceção do sorotipo Typhimurium, os valores das contagens de células aderidas após o tratamento com dióxido de cloro estabilizado a 100 mg.L<sup>-1</sup>, não apresentaram diferenças significativas no teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) em relação às contagens de células após o tratamento com água destilada estéril (TABELA 11), indicando a baixa eficiência que este sanitizante apresentou nas condições estudadas.

O dióxido de cloro estabilizado vem sendo usado pelos abatedouros avícolas, na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>, como um substituto ao hipoclorito de sódio, principalmente em águas de resfriamento do *pré-chiller* e *chiller*. Estes tanques de resfriamento apresentam altas concentrações de matéria orgânica, o que diminui a eficiência do hipoclorito de sódio (ANDRADE, MACÊDO, 1996). Além de não reagir com produtos orgânicos, o dióxido de cloro estabilizado tem a

vantagem de não deixar resíduos (ARENSTEIN, 2003; VEROS PRODUTOS QUÍMICOS LTDA, 2012).

Comparando a eficiência do dióxido de cloro estabilizado com o hipoclorito de sódio em suas respectivas concentrações recomendadas para uso no *chiller* e *pré-chiller*, observa-se uma maior eficiência do hipoclorito de sódio (FIGURA 19), em todos os sorotipos de *Salmonella* avaliados, com uma redução de 3,89 log UFC/cm<sup>2</sup> a 4,73 UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas. O sorotipo que apresentou o maior número de redução de células aderidas, após o tratamento com hipoclorito de sódio a 5 mg.L<sup>-1</sup> foi o Typhimurium e o menor número, o sorotipo Enteritidis.

A portaria 210 do Ministério da Agricultura e Abastecimento estabelece que os valores de cloro livre na água de tanques de resfriamento como *chiller* e *pré-chiller* devem ser de no máximo 5 mg.L<sup>-1</sup> (BRASIL, 1998b). Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura permite a utilização de quantidades de até 50 mg.L<sup>-1</sup> de cloro livre (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2012).

Neste estudo, na concentração permitida no Brasil de 5 mg.L<sup>-1</sup>, para uso nos tanques de resfriamento, o hipoclorito de sódio se mostrou mais eficiente que o dióxido de cloro estabilizado a 100 mg.L<sup>-1</sup>. Porém estes resultados não levaram em consideração a elevada quantidade de matéria orgânica encontrada nas águas de resfriamento do *pré-chiller* e *chiller* dos abatedouros avícolas, o que compromete a eficiência do hipoclorito de sódio. Kich et al. (2004) avaliaram a eficiência de hipoclorito de sódio (0,1%) na sobrevivência de células de *Salmonella* Typhimurium, na presença e na ausência de matéria orgânica e constataram uma menor eficiência do sanitizante na presença de matéria orgânica (KICH et al., 2004).

A atividade antibacteriana do hipoclorito de sódio ocorre quando este é adicionado à água e o ácido hipocloroso é formado, responsável pelo efeito oxidante dos sistemas enzimáticos celulares (ANDRADE, MACÊDO, 1996). Vários estudos relatam a resistência de *Salmonella* spp. aos efeitos do cloro. Células de *Salmonella* Weltevreden em biofilmes formados sobre aço inoxidável sobreviveram ao tratamento com solução contendo 10 mg.L<sup>-1</sup> de cloro livre com

redução de apenas 0,74 log UFC/cm<sup>2</sup> de células aderidas (JOSEPH, OTTA, KARUNASAGAR, 2001).

Em concentrações a partir de 100 mg.L<sup>-1</sup>, o hipoclorito de sódio é utilizado como sanitizante nos procedimentos de higienização de equipamentos e utensílios, apresentando resultados satisfatórios de redução de células em biofilmes microbianos (ROSADO, 2009; ESPER, 2010; JAENISCH, KUCHIISHI, COLDEBELLA, 2010). O cloro ativo, apesar de suas limitações, ainda é muito usado no combate de biofilmes devido ao fato de que, além de eliminar as células, é também reconhecido por remover exopolissacarídeo da superfície e fazer com que a aderência de novas células seja dificultada (MEYER, 2003). Concentrações altas de hipoclorito de sódio recomendadas como sanitizantes de ambiente, equipamentos e utensílios não foram avaliadas neste estudo.

O ácido peracético é um sanitizante de amplo espectro, pois atua como agente bactericida e esporicida e por isso, é considerado um dos mais efetivos na remoção de biofilmes e amplamente empregados em indústrias de alimentos (MARQUES et al., 2007). A atividade antimicrobiana do ácido peracético é baseada na liberação de oxigênio ativo, o qual apresenta grande capacidade de oxidação do material celular (KITIS, 2004; ANDRADE, MACÊDO, 1996). Na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup>, usualmente é utilizado como sanitizante nos procedimentos de higienização dos equipamentos e utensílios dos abatedouros avícolas. Neste estudo, conforme apresentado na Tabela 11, o ácido peracético a 300 mg.L<sup>-1</sup> se mostrou eficiente em todos os sorotipos de *Salmonella* avaliados. As contagens iniciais de células aderidas foram reduzidas a níveis inferiores a 1 log UFC/cm<sup>2</sup> após este tratamento.

Embora, neste estudo, o ácido peracético tenha sido um dos mais efetivos sanitizantes no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em aço inoxidável, existem estudos que demonstram uma menor eficiência deste produto em biofilmes formados por outros micro-organismos.

Rosado (2009) observou que o ácido peracético na mesma concentração pesquisada neste trabalho, reduziu em 4 ciclos logarítmicos a população de *Enterococcus faecium* associada ao biofilme, porém não reduziu a números

abaixo do limite de detecção. Esper (2010) observou, na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> de ácido peracético, uma redução de 2,3 UFC/cm<sup>2</sup> da população inicial de *Bacillus cereus* formados sobre cupons de aço inoxidável na presença de fórmula infantil durante 5 dias (ESPER, 2010).

O produto FARMASEPT PLUS® é uma associação sinérgica entre glutaraldeído (42,5%) e cloreto benzalcônio (7,5%) com quaternários ativos. Conforme determinação do Ministério da Agricultura e Abastecimento, em sua Instrução Normativa nº08, de 16 de Janeiro de 2002, este produto tem autorização de uso (AUP) como sanitizante na higienização de equipamentos, utensílios e demais instalações das indústrias de alimentos de produto de origem animal sob inspeção federal (BRASIL, 2002). Geralmente, na concentração de 0,1% é utilizado na desinfecção de ovos, equipamentos e instalações dos incubatórios e galpões de granjas. Assim como o ácido peracético, todas as células pertencentes aos sorotipos de *Salmonella* avaliados neste estudo mostraram-se sensíveis ao tratamento com FARMASEPT PLUS®.

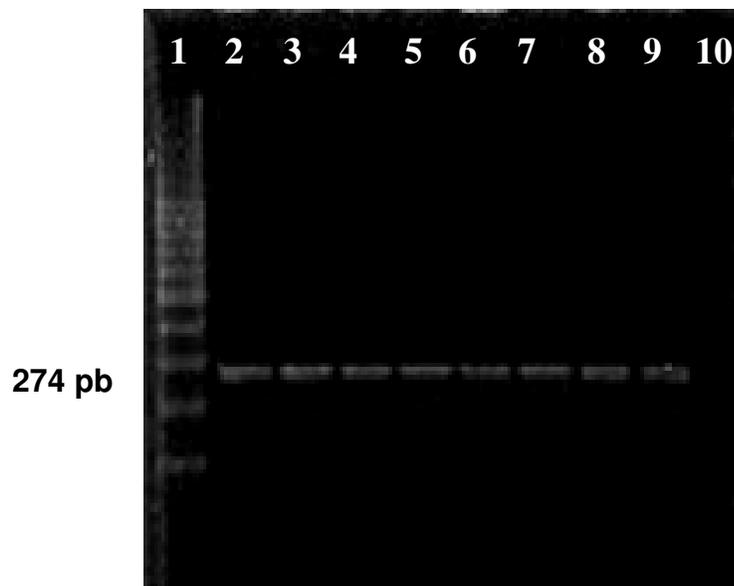
Resultados semelhantes foram obtidos por Kich et al. (2004), que pesquisando a eficiência de seis sanitizantes comerciais sobre células de *Salmonella* Typhimurium, verificaram que o produto composto por glutaraldeído (42,5%) e cloreto de benzalcônio (7,5%), na concentração de 1:1000 em contato com as amostras por 5 minutos, eliminou as células bacterianas à níveis inferiores de 1 log UFC.

Este produto é considerado eficiente, pois atua na síntese de proteínas e altera moléculas de DNA e RNA dos micro-organismos pela ação do glutaraldeído presente em sua fórmula a 42,5%. O cloreto de benzalcônio, presente em sua composição a 7,5% altera a permeabilidade celular, promove a desnaturação protéica e inibe a ação de enzimas (ANDRADE, MACÊDO, 1996; BRASIL, 2007).

Okazaki (2003) avaliou a eficiência de desinfetantes à base de cloreto de benzalcônio e observou uma redução superior a 7,0 log UFC das contagens de células de *Salmonella* Choleraesuis, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* após tratamento com este produto na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> utilizando os métodos de diluição de uso e teste de suspensão adaptado (OKAZAKI, 2003).

## 5.5 Avaliação da presença dos genes *sdia* e *luxs*

A presença do gene *sdia* foi detectada em todas as 65 cepas de *Salmonella* estudadas e algumas amostras estão representadas na Figura 20.



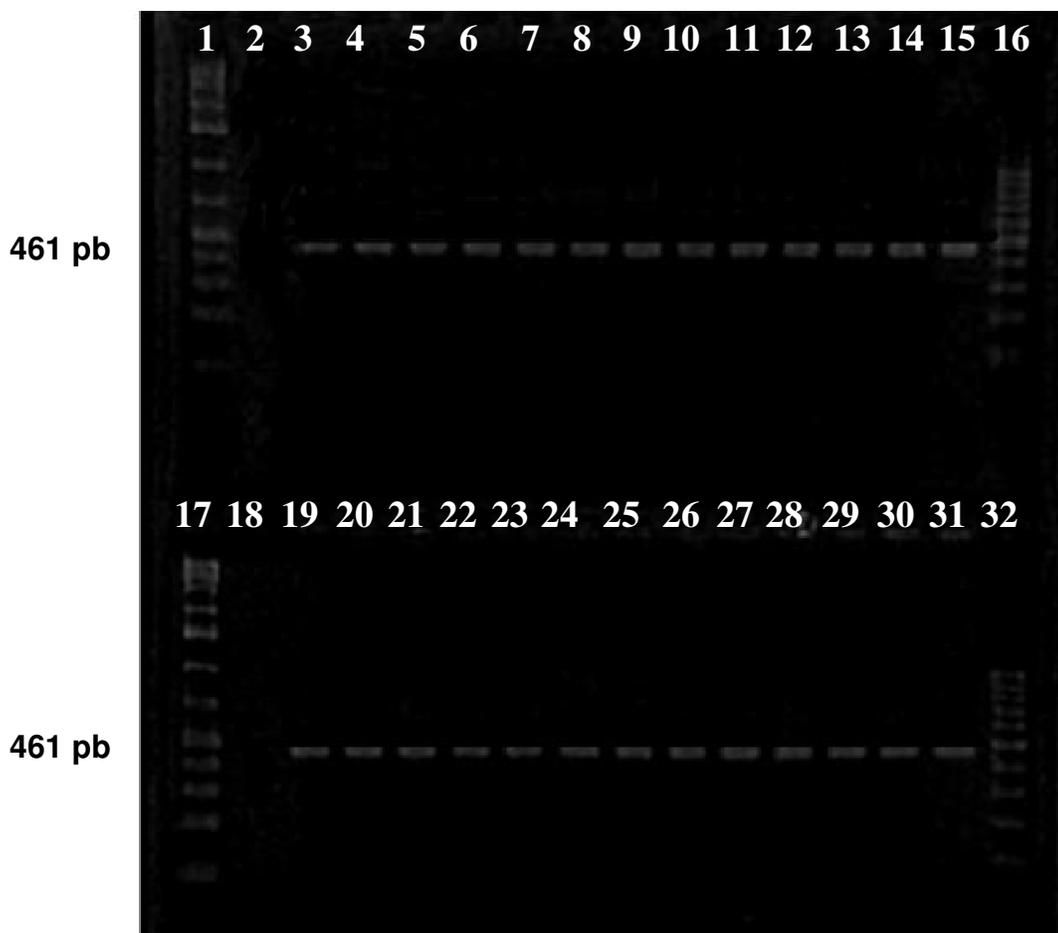
**Figura 20.** Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *sdia* em *Salmonella* spp.. **1.** Marcador de peso molecular 100 pb; **2.** Controle positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC14028; **3.** *S. Typhimurium* (cepa P1-21); **4.** *S. Newport* (cepa P1-44); **5.** *S. Senftenberg* (cepa P1-50); **6.** *S. Infantis* (cepa P1-59); **7.** *S. Enteritidis* (cepa P1-64); **8.** *S. Agona* (cepa P1-27); **9.** *S. Schwarzengrund* (cepa P1-35); **10.** Controle negativo.

O gene *sdia* codifica a proteína SdiA que apresenta homologia à proteína LuxR, capaz de regular a transcrição de fenótipos na presença do autoindutor AI-1. Bactérias do gênero *Salmonella* e *Escherichia coli* não possuem o homólogo LuxI, responsável pela produção de AI-1, porém reconhecem este autoindutor produzido por outras espécies bacterianas (ATKINSON et al., 2006; SMITH et al., 2008; DYSZEL et al., 2010).

A proteína SdiA produzida por *Salmonella* spp. é capaz de se ligar a uma grande variedade de estruturas moleculares de acil homoserina lactona (AI-1), permitindo assim que células de *Salmonella* reconheçam a presença de micro-organismos como *Pseudomonas aeruginosa* que produz acil homoserina lactona (AI-1) tipo C4 e oxoC12 (MICHAEL et al., 2001); *Aeromonas hydrophila* que produz AI-1 tipo C4 (SMITH et al., 2008) e *Yersinia enterocolitica* que produz AI-1 dos tipos C6 e oxoC6 (ATKINSON et al., 2006; DYSZEL et al., 2010). Entretanto, as consequências deste reconhecimento ainda não estão esclarecidas. Provavelmente, este mecanismo de reconhecimento permite que cepas de *Salmonella* percebam as condições do ambiente gastrointestinal dos hospedeiros e a presença de outros patógenos estabelecendo assim, uma relação de competição (SOARES, AHMER, 2011).

O gene *sdia* também está envolvido com a resistência de *Salmonella* spp. às proteínas do complemento humano, que desempenha importante papel na imunidade do organismo (AHMER, 2004). O Sistema Complemento é um mecanismo de defesa desenvolvido pelo organismo humano, composto por proteínas séricas e participam das defesas inatas (natural) e adquiridas (memória). Essas proteínas vão se ativando numa sequência determinada e induzem uma série de respostas inflamatórias que auxiliam no combate à infecção (TRABULSI, TOLEDO, 1996). O gene *sdia* também está relacionado à multirresistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (RAHMATI, DAVIDSON, ZACHIEDRICH, 2002) e aos fatores que contribuem para a sua sobrevivência e colonização (HALATSI et al., 2006).

A presença do gene *luxs* foi detectada em todas as 65 cepas de *Salmonella* estudadas e algumas amostras estão representadas na Figura 21.



**Figura 21.** Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *luxs* em *Salmonella* spp.. **1 e 17.** Marcador de peso molecular 1Kb; **2 e 18.** Controle negativo; **16 e 32.** Marcador de peso molecular 100 pb; **3 a 15, 19 a 31.** Cepas *Salmonella* spp. (P1-27 a P1-52).

O gene *luxs* está relacionado com a produção de autoindutor AI-2 (SURETTE, BASSLER, 1998; CHEN et al., 2002; TAGA, MILLER, BASSLER, 2003; MILLER et al., 2004; WATERS, BASSLER, 2005), responsável pela expressão de fatores de virulência em patógenos como *Salmonella* Typhimurium (ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011). Neste trabalho, a capacidade de produção do autoindutor AI-2 pelos diferentes sorotipos de *Salmonella* foi confirmada nos ensaios de bioluminescência (item 4.7).

Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2 estão presentes em mais de 50 espécies de bactérias e controlam muitos processos celulares, incluindo

formação de biofilmes e expressão de fatores de virulência (VENDEVILLE et al., 2005; ROY, ADAMS, BENTLEY, 2011).

Soni et al. (2008) observaram que a presença de autoindutor AI-2 promove a prevalência de células de *E.coli* O157:H7 e que esse efeito protetor foi ausente quando em contato com substâncias inibidoras deste autoindutor.

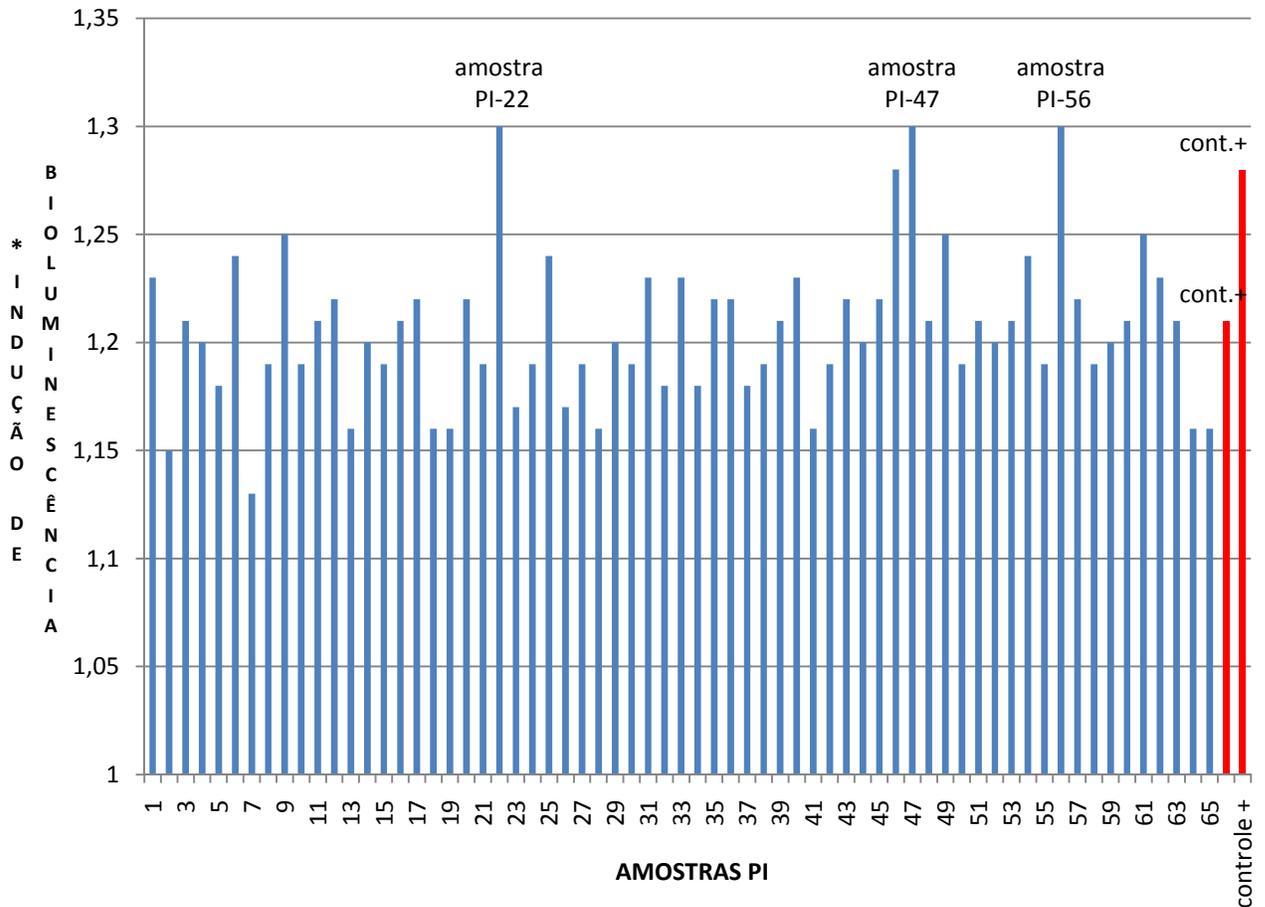
O mecanismo de ação de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2 produzidas por outros micro-organismos sobre células de *Salmonella* ainda não está claro. Provavelmente cepas de *Salmonella* utilizam estes sinais externos para reconhecimento do ambiente e produção de substâncias e enzimas específicas que direcionam e otimizam os recursos metabólicos e energia para as necessidades urgentes evitando assim o desperdício de recursos com a produção de exoenzimas, bacteriocinas e outras substâncias não necessárias em determinadas situações (DOUROU et al., 2011).

## **5.6 Detecção de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2**

A presença de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2 foi investigada utilizando o biossensor *Vibrio harveyi* BB170, que na presença deste autoindutor expressa luminescência.

Todas as cepas de *Salmonella* foram submetidas ao teste e os resultados dos ensaios de indução de bioluminescência estão demonstrados na figura 22. Os resultados obtidos indicam que os sorotipos de *Salmonella* analisados, além de apresentarem o gene *luxs*, detectado nos testes de PCR, possuem a capacidade de induzir o fenômeno de bioluminescência em *Vibrio harveyi* BB170, com índices que variaram de 1,13 a 1,30, com destaque para as cepas de *Salmonella* Enteritidis P1-22, P1-47 e P1-56, que mostraram maior atividade de indução que as outras amostras testadas.

As amostras analisadas e seus respectivos valores de indução de bioluminescência estão relacionados na Tabela 12.



**Figura 22.** Indução de bioluminescência em amostras de *Vibrio harveyi* BB170 para detecção de autoindutor AI-2 de sobrenadantes de sorotipos de *Salmonella* cultivados em caldo Luria-Bertani (LB) contendo 0,5% de glicose. \*Indução da bioluminescência= RLU amostra/ RLU controle negativo. RLU= *relative light units*.

**Tabela 12.** Indução de bioluminescência em cepas de *Vibrio harveyi* BB170 para detecção de autoindutor AI-2 de sobrenadantes de *Salmonella* spp. cultivadas a 30°C por 6 horas em Luria-Bertani (LB) com 0,5% de glicose.

	Amostras	IB*	DP**
Controle positivo	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1,22	0,011
Controle positivo	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	1,28	0,074
P1 - 01	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,23	0,030
P1 - 02	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,15	0,008
P1 - 03	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,038
P1 - 04	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,20	0,028
P1 - 05	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> (rugosa)	1,18	0,015
P1 - 06	<i>Salmonella</i> Newport	1,24	0,023
P1 - 07	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,13	0,051
P1 - 08	<i>Salmonella</i> Infantis	1,19	0,021
P1 - 09	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,25	0,090
P1 - 10	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,19	0,009
P1 - 11	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,015
P1 - 12	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,22	0,033
P1 - 13	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,16	0,007
P1 - 14	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,20	0,019
P1 - 15	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,19	0,035
P1 - 16	<i>Salmonella</i> Mbandaka	1,21	0,032
P1 - 17	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,22	0,049
P1 - 18	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,16	0,006
P1 - 19	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,16	0,017
P1 - 20	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,22	0,006
P1 - 21	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,19	0,011
P1 - 22	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,30	0,011
P1 - 23	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,17	0,050
P1 - 24	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,19	0,011
P1 - 25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,24	0,089
P1 - 26	<i>Salmonella</i> Kentucky	1,17	0,039
P1 - 27	<i>Salmonella</i> Agona	1,19	0,004
P1 - 28	<i>Salmonella</i> Mbandaka	1,16	0,033
P1 - 29	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,20	0,011
P1 - 30	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,19	0,077
P1 - 31	<i>Salmonella</i> Livingstone	1,23	0,016
P1 - 32	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,18	0,023

(continua)

**Tabela 12.** Indução de bioluminescência em cepas de *Vibrio harveyi* BB170 para detecção de autoindutor AI-2 de sobrenadantes de *Salmonella* spp. cultivadas a 30°C por 6 horas em Luria-Bertani (LB) com 0,5% de glicose (continuação).

	Amostras	IB*	DP**
P1 - 33	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,23	0,060
P1 - 34	<i>Salmonella</i> Kentucky	1,18	0,073
P1 - 35	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	1,22	0,009
P1 - 36	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,22	0,050
P1 - 37	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,18	0,007
P1 - 38	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,19	0,017
P1 - 39	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,062
P1 - 40	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,23	0,024
P1 - 41	<i>Salmonella</i> Senftenberg	1,16	0,053
P1 - 42	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> (rugosa)	1,19	0,024
P1 - 43	<i>Salmonella</i> Newport	1,22	0,009
P1 - 44	<i>Salmonella</i> Newport	1,20	0,026
P1 - 45	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,22	0,045
P1 - 46	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,28	0,038
P1 - 47	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,30	0,032
P1 - 48	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,006
P1 - 49	<i>Salmonella</i> Senftenberg	1,25	0,025
P1 - 50	<i>Salmonella</i> Senftenberg	1,19	0,010
P1 - 51	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,042
P1 - 52	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,20	0,036
P1 - 53	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,020
P1 - 54	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,24	0,005
P1 - 55	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,19	0,067
P1 - 56	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,30	0,077
P1 - 57	<i>Salmonella</i> Newport	1,22	0,072
P1 - 58	<i>Salmonella</i> Newport	1,19	0,093
P1 - 59	<i>Salmonella</i> Infantis	1,20	0,046
P1 - 60	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> (rugosa)	1,21	0,072
P1 - 61	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,25	0,001
P1 - 62	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,23	0,043
P1 - 63	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,21	0,002
P1 - 64	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,16	0,002
P1 - 65	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,16	0,043

\* Indução da bioluminescência: RLU amostra/ RLU controle negativo.

\* Média de três repetições independentes, em duplicata; \*\* Desvio Padrão

As células de *Vibrio harveyi* BB170, utilizadas como biossensor neste trabalho, apresentam uma mutação no gene sensor para AI-1 (autoindutor 1) e produzem bioluminescência exclusivamente na presença de AI-2. As células de *Vibrio harveyi* BB170 são também capazes de produzir o autoindutor AI-2, pois o gene *luxS* continua intacto (TAGA, XAVIER, 2011). Durante os ensaios, à medida que a concentração de AI-2 exógeno, presente nos sobrenadante do cultivo de *Salmonella* diminui, devido à degradação das moléculas, a produção de bioluminescência também diminui, geralmente nas primeiras horas. Após este período, com o aumento da população de células de *Vibrio harveyi* BB170, ocorre o acúmulo de AI-2 endógeno induzindo novamente a bioluminescência. Considerando este fato de que as células de *Vibrio harveyi* BB170 também produzem AI-2, a detecção deste autoindutor exógeno deve ser registrada considerando o período imediatamente anterior à produção de AI-2 endógeno, pois mais tarde, geralmente após 7 ou 8 horas, todas as amostras apresentam bioluminescência (TAGA, XAVIER, 2011).

A produção do autoindutor AI-2 em *Salmonella* spp. e também em outras espécies de bactérias, está associada às condições do meio de cultivo dos micro-organismos. Surette & Bassler (1998) constataram que a presença de 0,5% de glicose no meio de cultivo de *Salmonella* Typhimurium, promove um aumento na produção de AI-2, com pico máximo de produção após 6 horas de cultivo. A partir de 8 horas, estes autores observaram uma diminuição gradual de AI-2 até níveis próximos de zero após 20 horas (SURETTE, BASSLER, 1998). O período em que ocorre a produção de AI-2 também depende da espécie em questão. Células de *Salmonella* Typhimurium produzem o autoindutor AI-2 na fase *mid* exponencial e as moléculas são degradadas à medida que o crescimento bacteriano atinge a fase estacionária. Este fato indica que o sistema *quorum sensing* em *Salmonella* Typhimurium permite a comunicação das células, principalmente durante o período de intensa divisão celular e, provavelmente esta comunicação está relacionada com indicativos do potencial de nutrientes disponíveis no ambiente. Este comportamento é contrário ao observado em bactérias *Vibrio fischeri*. Neste micro-organismo, o autoindutor AI-2 é produzido quando as células atingem altas

densidades populacionais, condição necessária para a produção de bioluminescência. Na maioria dos sistemas *quorum sensing*, a concentração de autoindutor é um indicativo da densidade populacional (DOUROU et al., 2011).

Neste trabalho, observam-se valores de indução de bioluminescência entre 1,13 a 1,30. Estes índices representam os resultados obtidos após o cultivo de 6 horas a 30°C e agitação constante (fase *mid* exponencial). Os resultados encontrados neste trabalho estão próximos aos descritos por Taga e Xavier (2011), que relatam índices de indução de bioluminescência de 1,8 após o cultivo de 6 horas de *Salmonella Typhimurium* (TAGA, XAVIER, 2011).

Muito provavelmente, ensaios utilizando outros períodos de cultivo das mesmas amostras resultarão em outros índices, uma vez que a produção de AI-2 pode ser influenciada pelas condições de cultivo e pela fase de crescimento bacteriano. A escolha do período de 6 horas de cultivo, neste trabalho, foi baseada nos estudos com *Salmonella Typhimurium* (SURETTE, BASSLER, 1998), porém outros sorotipos de *Salmonella* podem apresentar períodos específicos de maior ou menor produção de AI-2. Para determinar, não apenas a presença, mas também a concentração máxima de AI-2 produzido por cada sorotipo, é necessário analisar a presença do autoindutor AI-2 nos sobrenadantes de cada cepa em todas as fases do crescimento.

A concentração de AI-2 presente nos sobrenadantes dos cultivos pode ser mais precisamente quantificada nos testes de transferência de energia por fluorescência de ressonância (FRET) utilizando a proteína CLPY, que consiste na proteína LuxP (receptor de AI-2) unida a duas proteínas fluorescentes, uma amarela (YFP) e outra azul (CFP). A relação entre as fluorescências YFP/CFP e posterior comparação dos resultados com uma curva padrão de AI-2 de concentração conhecida, determina-se a concentração de AI-2 nas amostras em questão (TAGA, XAVIER, 2011).



## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- Dentre os 10 sorotipos de *Salmonella* identificados, os sorotipos *S. Enteritidis* (resistente ao ácido nalidíxico, bacitracina, eritromicina e nitrofurantoína), *S. Senftenberg* (resistente ao ácido nalidíxico, bacitracina, eritromicina e nitrofurantoína) e *S. Infantis* (resistente a bacitracina e eritromicina) foram isolados de aves vivas e também de produto final, indicando a persistência e prevalência destas cepas ao longo da cadeia produtiva de frangos de corte, apesar das inúmeras barreiras sanitárias adotadas na produção.
- Todas as 65 cepas de *Salmonella* avaliadas apresentaram multirresistência a dois ou mais antimicrobianos pesquisados, sendo que a maioria das cepas (96,9%) apresentou resistência a bacitracina.
- Os sorotipos *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Enteritidis*, *S. Senftenberg* e *S. Infantis* avaliados são capazes de formar biofilmes em superfície de aço inoxidável à temperatura de 20°C após 48 horas mesmo em condições de restrição de nutrientes disponíveis.
- Em cultivo misto de *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* ATCC 7080, em meio TSB, observou-se que ambos podem coexistir num mesmo ambiente e apesar da competição, são capazes de aderir e formar de biofilmes sobre cupons de aço inoxidável em meio TSB, com predomínio de *Enterococcus faecalis* após 48 horas a 20°C.
- As contagens de células aderidas de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 sobre a superfície de aço inoxidável no cultivo isolado em meio APT 0,1%, foram inferiores às contagens quando no cultivo isolado em meio TSB, indicando a necessidade de meios mais nutritivos para a adesão e formação de biofilmes por este micro-organismo.
- Em biofilme misto com *Salmonella* Enteritidis em meio APT 0,1%, o *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 apresentou contagens de células aderidas superiores às contagens deste mesmo micro-organismo quando em cultivo isolado em meio APT 0,1%, indicando a importância da presença de células

de *Salmonella* Enteritidis atuando como um suporte para a posterior adesão das células de *Enterococcus faecalis*, nas condições estudadas.

- O sanitizante dióxido de cloro estabilizado 100 mg.L<sup>-1</sup> de ClO<sub>2</sub> se mostrou ineficiente em todos os sorotipos avaliados com redução máxima de apenas 1,11 log UFC/cm<sup>2</sup> da população de *Salmonella* spp. aderida nos cupons de aço inoxidável.
- O sanitizante hipoclorito de sódio 5 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual total (CRT) apresentou eficiência muito mais expressiva que o dióxido de cloro estabilizado em todos os sorotipos avaliados com redução mínima de 3,89 UFC/cm<sup>2</sup> no sorotipo *S. Enteritidis*, sendo mais eficiente nos sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Newport*.
- Os sanitizantes FARMASEPT PLUS® (composto de cloreto benzalcônio 7,5% e glutaraldeído 42,5%) a 0,1% e ácido peracético 300 mg.L<sup>-1</sup> APA se mostraram os mais eficazes estabelecendo reduções maiores que 4,9 UFC/cm<sup>2</sup> de células de *Salmonella* spp. aderidas nos cupons de aço inoxidável.
- Os diferentes sorotipos de *Salmonella* avaliados apresentaram padrões distintos de adesão em superfície de aço inoxidável, com destaque para o sorotipo *Newport*, que apresentou o maior número de células aderidas após 48 horas em meio TSB a 20°C e o menor número de células eliminadas após o tratamento com água destilada estéril, indicando a intensa adesão que este sorotipo apresenta sobre esta superfície, nas condições estudadas.
- Todas as 65 cepas de *Salmonella* avaliadas apresentaram os genes *luxS* e *sdia* nos testes de PCR, indicativos da presença de fenótipos envolvidos em sistemas *quorum sensing* e produziram moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* AI-2 na fase *mid* exponencial, após 6 horas de cultivo, detectadas nos testes de bioluminescência utilizando o *Vibrio harveyi* BB170.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 51, n.8-9, p.380-388, 2004.

AGARWAL, R.K.; SINGH, S.; BHILEGAONKAR, K.N.; SINGH, V.P. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **International Food Research Journal**, v.18, n.4, p.1493-1498, 2011.

AHMER, B.M.M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v. 52, n.4, p. 933-945, 2004.

ALDRIDGE, P.D.; WU, C.; GNERER, J.; KARLINSEY, J.E.; HUGHES, K.T.; SACHS, M. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n.30, p.11340-11345, 2006.

ALLISON, D.G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v.19, n.2, p.139-150, 2003.

ALMEIDA, P.F.; SILVA, E.N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.2, p.105-120, 1992.

ANDERSON, E.S.; WARD, L.R.; DE SAXE, M.J.; DE SA, J.D.H. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Hygiene Cambridge**, v.78, n.2, p.297-300, 1977.

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

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N.J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

ANNOUS, B.A.; FRATAMICO, P.M.; SMITH, J.L. Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do? **Journal of Food Science**, v.74, n.1, p.24-37, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 16. ed. Washington: American Public Health Association, 1985. p.305.

ARENSTEIN, I.R. Dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa: coadjuvante tecnológico de alimentos. **Higiene Alimentar**, v.17, n.107, p.32-33, 2003.

ARNOLD, J.W.; YATES, I.E. Interventions for control of *Salmonella*: Clearance of microbial growth from rubber picker fingers. **Poultry Science**, v.88, n.6, p.1292-1298, 2009.

ATKINSON, S.; CHANG, C.Y.; SOCKETT, R.E.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.4, p.1451-1461, 2006.

AUGER, S.; KRIN, E.; AYMERICH, S.; GOHAR, M. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.937-941, 2006.

AUSTIN, J.W.; SANDERS, G.; KAY, W.W.; COLLINSON, S.K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. **FEMS Microbiology**, v.162, n.2, p.295-301, 1998.

BAILEY, J.S.; STERN, N.J.; FEDORKA-CRAY, P., CRAVEN, S.E.; COSBY, D.E., LADELY, S., MUSGROVE, M.T. Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistate epidemiological investigation. **Journal of Food Protection**, v.64, n.11, p.1690-1697, 2001.

BASSLER, B.L.; WRIGHT, M.; SILVERMAN, M.R. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. **Molecular Microbiology**, v.13, n. 2, p.273-286, 1994.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n.6, p. 582-587, 1999.

BASSLER, B.L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell**, v.109, n.4, p.421-424, 2002.

BEARSON, B.L.; BEARSON, S.M.D. The role of the QseC quorum-sensing sensor Kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis**, v.44, n.4, p.271-278, 2008.

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

BOKANYI, R.P.; STEPHENS, J.F.; FOSTER, D.N. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcass or parts. **Poultry Science**, v.69, n.4, p.592-598, 1990.

BONAFONTE, M.A.; SOLANO, C.; SESMA, B.; ALVAREZ, M.; MOTUEGA, I.; GARCIA-ROS, D.; GAMAZO, C. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Letters**, v.191, n.1, p.31-36, 2000.

BOWER, C.K.M.; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, n.5, p.152-157, 1996.

BOYEN, F; EECKHAUT, V.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Veterinary Microbiology**, v.135, n.3-4, p.187-195, 2009.

BOYLE, N., J. L. BISHOP, G.A., GRASSI, FINLAY, B.B. Meeting review *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.5, p.1489-1495, 2007.

BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v.13, n.1, p.20-26, 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº1.428, de 2 de Dezembro de 1993. Aprova Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 Dez., 1993.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 193, de 19 de Setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 Set., 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o regulamento técnico Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 ago., 1997.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 46, de 10 de Fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 Mar., 1998a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 210, de 10 de Novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 Nov., 1998b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC Nº12, de 2 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 Jan., 2001a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC Nº13, de 2 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e Seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 Jan., 2001b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N°08, de 16 de Janeiro de 2002. Aprova as Instruções para Autorização de Uso de Produtos – AUP, a serem utilizados nos Estabelecimentos de Produtos de Origem Animal, sob Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 Jan., 2002. Disponível em: <<http://www.farmabase.com.br/dbimagens/20060419153358.jpg>> acesso em 09 de Junho de 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 09, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, D.F., 27 Jun., 2003a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N°70, de 6 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, Brasília, D.F., 6 Out., 2003b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Informe Técnico nº 04/07. **Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde- Fundamentos para a utilização**. Brasília, D.F., p.14, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. **Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas**

**isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil.**

Brasília, D.F., 186p., 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
Instrução Normativa N°26, de 9 de Julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 Jul., 2009.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R. SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

CALIXTO, A.E.R.; SERAFINI, A.B.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.D.P.B. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.101, p.56-62, 2002.

CARBÓ, H.M. **Aço inox – Especificações técnicas**. ACESITA S.A., 2001.

Disponível em:

<[http://www.nucleoinox.org.br/upfiles/arquivos/downloads/Acesita\\_Aplica\\_Especifica.pdf](http://www.nucleoinox.org.br/upfiles/arquivos/downloads/Acesita_Aplica_Especifica.pdf)> acesso em: 28 de Maio de 2012.

CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; PILOTTO, F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; ROCHA, S.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.368-371, 2006.

CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, A.H. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v.104, n.1-2, p.133-139, 2004.

CARRIQUE-MAS, J.J.; BRESLIN, M.; SNOW, L.; McLAREN, I.; SAYERS, A.R.; DAVIES, R.H. Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 137, n.6, p. 837-846, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Salmonella Surveillance Data (Laboratory-based Enteric Disease Surveillance, LEDS)**. Disponível em:  
<<http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-summary-2009-508c.pdf>> Acesso em: 30 de Maio de 2012.

CHEN, X.S.; SCHAUDER, N.; POTIER, A.; VAN DORSSEALAER, I.; PELCZER, F.; BASSLER, B.L.; HUGHSON, F.M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, v.415, n.6871, p.545-549, 2002.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, n.1, p.22-30, 2003.

CHOI, J.; SHIN, D.; RYU, S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. **Infection and Immunity**, v.75, n.10, p.4885-4890, 2007.

CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E.C.; SPERANDIO, V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.27, p.10420-10425, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada – oitava edição**, Documento M2-A8, v.23, n.01, 2003.

Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>

Acesso em 30 de Setembro de 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. Document M100–S19. CLSI, Wayne, Pa, 2009.

COGAN, T.A.; HUMPHREY, T.J. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. **Journal of Applied Microbiology**, suppl.94, p.114-119, 2003.

COOKE, F.J.; THRELFALL, E.J.; WAIN, J. Current trends in the spread and occurrence of human salmonellosis: molecular typing and emerging antibiotic resistance. In: RHEN, M.; MASKELL, D.; MASTROENI, P.; THRELFALL, J. (Ed.). **Salmonella: Molecular biology and pathogenesis**. Wymondham, Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2007. p.1-30.

CORRY, J.E.; ALLEN, V.M.; HUDSON, W.R.; BRESLIN, M.F.; DAVIES, R.H. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.3, p.424-432, 2002.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CARDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SOCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v.49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W. A short history of the development of the biofilm concept. In: GHANNOUM, M.; O`TOOLE, G.A. **Microbial Biofilms**. Washington, D.C: ASM Press, 2004. Cap.1, p.4-19.

COX, J., HAMMACK, T.S., ANDREWS, W.H. *Salmonella*. In: Robinson , R.K., Batt, C.A., Pates, P.D. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. New York: Academic Press, 1999. V.3, p.1928-1947.

CRAWFORD, R.W.; REEVE, K.E.; GUNN, J.S. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.12, p.2981-2990, 2010.

CREMIEUX, A., FLEURETTE, J. Methods of testing disinfectants. In: Block,S.S. (Ed) **Desinfections, sterilization, and preservation**. 4. ed. Pennsylvania: Lea & Febiger, Malven, 1991. Cap.57, p.1009-10027.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella*. In: LUND, B.M.; BAIRD-PAKER, T.C.; GOULD, G.W. (Ed.). **The Microbiological Safety and Quality of Food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. Cap. 45, v. 2, p.1233-1299.

DAVIES, R.H.; HILTON, M.H. *Salmonella* in animal feed. In C. Wray.; A. Wray. **Salmonella in Domestic Animals**. 1.ed. Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 2000. 480p.

DAVIES, J. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. **EMBO Reports**, v.8, n.7, p.616-621, 2007.

DEMCZUK, W.; SOULE, G.; CLARK, C.; KHAKHRIA, R., AHMED, R., RODGERS, F. G. Phase-based typing scheme for *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, a

causative agent of food poisonings in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9, p.4279-284, 2003.

DONG, Y.H., WANG, L.H.; XU, J.L.; ZHANG, H.B.; ZHANG, X.F.; ZHANG, L.H. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. **Nature**, v.411, p.813-817, 2001.

DONG, Y. H., GUSTI, A. R., ZHANG, Q., XU, J. L.; ZHANG, L. H. Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1754–1759, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DOUROU, D.; AMMOR, M.S.; SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Growth of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in the presence of quorum sensing signaling compounds produced by spoilage and pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.1011-1018, 2011.

DUFRENNE, J. RITMEESTER, W.; VAN ASCH, E.D. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**, v.64, n.4, p.538-541, 2001.

DUNKLEY, K.D.; CALLAWAY, T.R.; CHALOVA, V.I.; McREYNOLDS, J.L.; HUME, M.E.; DUNKLEY, C.S.; KUBENA, L.F.; NISBET, D.J.; RICKE, S.C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v.15, n.1-2, p.26-35, 2009.

DUNNES, W.M.J. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n.2, p.155-166, 2002.

DYSZEL, J.L.; SMITH, J.N.; LUCAS, D.E.; SOARES, J.A.; SWEARINGEN, M.C.; VROSS, M.A.; YOUNG, G.M.; AHMER, B.M.M. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can detect acyl homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in mice. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.1, p.29-37, 2010.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.2, p.75-97, 2003.

EDUARDO, M.B.P.; FERNANDES, S.; KATSUYA, E.M.; BASSIT, N.P.; TAVECHIO, A. T.; GUILARDI, A.C.; VAZ, T.M.I. Surtos de doenças transmitidas por alimentos, Estado de São Paulo, 1999-2008. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, Brasil, (CVE), 2008.

ESPER, L.M.R. ***Enterobacter sakasaki* (Cronobacter spp.) e Bacillus cereus: Quorum sensing, formação de biofilme e ação de sanitizantes.** Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 103p., 2010.

EUZÉBY, J.P. Society for Systematic and Veterinary Bacteriology. *Salmonella* nomenclature. Validation List n° 102- Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM.

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.547-549, 2005.

Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/validationlists.html>>. Acesso em: 28 de Maio de 2012.

FARMABASE SAÚDE ANIMAL LTDA. **Diluições recomendadas pelo fabricante.** Disponível em:

<<http://www.farmabase.com.br/produto.asp?d=49&s=4&p=86&lang=port>> acesso em 31 de Maio de 2012.

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

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matriz. **Nature Reviews**, v.8, n.9, p.623-633, 2010.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, n.5, p.372-379, 1991.

GAST, R.K. Serotype-Specific and Serotype-Independent strategies for preharvest control of Food-born *Salmonella* in poultry. **Avian Diseases**, v.51, n.4, p.817-828, 2007.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. **Environmental Microbiology**, v.3, n.10, p. 638-648, 2001.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; GOV, Y.; GHISELLI, R.; DEL PRETE, M.S.; MOCCHEGIANI, F.; SABA, V.; ORLANDO, F.; SCALISE, G.; BALABAN, N. RNA III inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.6, p. 1979-1983, 2003.

GIAOURIS, E.D.; NYCHAS, G.J.E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to Stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v.23, n.8, p.747-752, 2006.

GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J.; ADAK, G.K.; WARD, L.R.; SMITH, H.R. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**, v. 133, n.5, p.795-801, 2005.

GOUGH, N.L.; DODD, C.E.R. The survival and disinfection of *Salmonella* Typhimurium on chopping board surfaces of wood and plastic. **Food Control**, v.9, n.6, p. 363-368, 1998.

GRIFFITHS, M. Quorum sensing. In: GRIFFITHS, M. **Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2005. Cap.22, p.580-640.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. New York: CABI publishing, 2000. Cap.1, p.1-17.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars**. Paris: World Health Organization e Institut Pasteur. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9. ed., 2007.

Disponível em: <

<http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>> Acesso em 27 de Setembro de 2012.

GUERIN, P.J.; NYGARD, K.; SIITONEN, A.; VOLD, L.; KUUSI, M. DE JONG, B.; ROTTINGEN, J.A.; ALVSEIKE, O.; OLSSON, A.; LASSEN, J.; ANDERSON, Y.; AAVITSLAND, P. Emerging *Salmonella* Enteritidis anaerogenic phage type 14b:

Outbreak in Norwegian, Swedish and Finnish travelers returning from Greece. **Euro surveillance**, v.11, n.2, p. 61-66, 2006.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.F.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.161, n.1, p.26-29, 2010.

GUINÉE, P.A.M.; VAN LEEUWEN, W.J. Phage typing of *Salmonella*. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W.; BERGAN, T. (eds.). **Methods in Microbiology**. New York, N.Y: Academic Press, 1978. V.2, p.157–191.

GUTIERREZ, J.A.; CROWDER, T.; RINALDO-MATTHIS, A.; HO, M.C. ALMO, S.C. SCHRAMM, V.L. Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. **Nature Chemical Biology**, v.5, n.4, p.251-257, 2009.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; JALAVA, J.; SITONEN, A.; HUOVINEN, P. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in salmonellas and validation of nalidixic acid screening test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.11, p.3572-7, 1999.

HALATSI, K.; OIKONOMOU, I.; LAMBIRI, M.; MANDILARA, G.; VATOPOULOS, A.; KYRIACOU, A. PCR detection of *Salmonella* spp. Using primers targeting the quorum sensing gene *sdia*. **FEMS Microbiology Letters**, v.259, n.2, p.201-207, 2006.

HASTINGS, J.W.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.9, p.2667-2668, 1999.

HERRERA-LEÓN, S.; McQUISTON, J.R.; USERA, M.A.; FIELDS, P.I.; GARAIZAR, J.; ECHEITA, M.A. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.6, p.2581–2586, 2004.

HERRERA-LEÓN, S.; RAMIRO, R.; ARROIO, M.; DÍEZ, R.; USERA, M.A.; ECHEITA, M.A. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. **Research in Microbiology**, v.158, n.2, p.122–127, 2007.

HOLAH, J.T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, n.5, p.255-259, 1990.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's of Manual Determinative Bacteriology**. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.787, 2000.

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

HOOD S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, n.2-3, p.145-153, 1997.

HOOSHANGI, S.; BENTLEY, W.E. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, n.6, p.550-555, 2008.

HEALTH PROTECTION AGENCY (HPA). London, UK. **Salmonella Enteritidis Phage types (PT) in humans**, Last reviewed: 25 March 2011.

Disponível em:

<<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Salmonella/EpidemiologicalData/salmDataHumanSe>> Acesso em 29 de Maio de 2012.

HURRELL, E.; KUCEROVA, E.; LOUGHLIN, M.; CAUVILLA-BARRON, J.; FORSYTHE, S.J. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter Sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, n.2, p.227-231, 2009.

IANKOV, I.D.; PETROV, D.P.; MILANDENOV, I.V.; HARALAMBICVA, I.H.; KALEV, O.K.; BALABANOVA, M.S.; MITOV, I.G. Protective efficacy of IgA monoclonal antibodies to O and H antigens in a mouse model of intranasal challenge with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Microbes and Infection**. v. 6, n.6, p.601-910, 2004.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISP). **Ministerio de Salud**.

Disponível em: <[http://www.ispch.cl/lab\\_amb/serv\\_lab/salmonella.html#uno](http://www.ispch.cl/lab_amb/serv_lab/salmonella.html#uno)> Acesso em 31 de Maio de 2012.

IZAT, A.L.; YAMAGUCHI, W.; KANIAWATI, S. Use of consecutive carcass rinses and a most probable number procedure to estimate *Salmonella* contamination of inoculated broilers. **Poultry Science**, v.70, n.6, p.1448-1471, 1991.

JAENISCH, F.R.F.; KUCHIISHI, S.S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.40, n.2, p.384-388, 2010.

JANSSENS, J.C.A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; DELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D.; VERHOEVEN, T.L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE VOS, D.E.; De KEERSMAECKER, S.C.J. Brominated

Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.21, p.6639-6648, 2008.

JOHNSON DIVERSEY. **Divosan Forte – Método de análise da solução de uso**. 2p., 2004. Disponível em:  
<[http://www.egi.com.pt/attachment.php?id\\_attachment=756](http://www.egi.com.pt/attachment.php?id_attachment=756)> Acesso em 26 de Janeiro de 2012.

JONES, F.T.; RICHARDSON, K.E. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. **Poultry Science**, v.83, n.3, p.384-91, 2004.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Journal of Food Microbiology**, v.64, n.3, p.367-372, 2001.

KAPER, J.B.; SPERANDIO, V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v.73, n.6, p.3197-3209, 2005.

KARAVOLOS, M.H.; BULMER, D.M.; WINZER, K.; WILSON, M.; MASTROENI, P. WILLIAM, P.; KHAN, C.M.A. LuxS affects flagellar phase variation independently of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.2, p.769-771, 2008.

KAUFMANN, S.H.E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B.B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, n.14-15, p.1177-1181, 2001.

KICH, J.D.; BOROWSKY, L.M.; SILVA, V.S.; RAMENZONI, M.; TRIQUES, N.; KOOLER, F.L.; CARDOSO, M.R.I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostra de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.33-39, 2004.

- KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v.68, n.9, p.4839-4849, 2000.
- KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated-EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.52, n.2, p.123-127, 2006.
- KIM, S.H.; WEI, C.I. Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.22-29, 2007.
- KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v.30, n.1, p.47-55, 2004.
- KOPANIC, R.J.; SHELDON, B.W.; WRIGHT, C.G. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: laboratory and field. **Journal of Food Protection**, v. 57, n.2, p.125-131, 1994.
- KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, n.1-2, p. 9-27, 1998.
- Le MINOR, L. POPOFF, M.Y. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.4, p.465-468, 1987.
- LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.4, p.594-605, 2000.

LEUNG, J.W.; LIU, Y.L.; DESTA, T.; LIBBY, E.; INCIARDI, J.F.; LAM, K. Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents? **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 48, n.3, p.250-257, 1998.

LIN, Y.H., XU, J.L.; HU, J.; WANG, L.H.; ONG, S.L.; LEADBETTER, J.R.; ZHANG, L.H. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum quenching enzymes. **Molecular Microbiology**, v.47, n.3, p.849-860, 2003.

LINDBERG, A.A.; Le MINOR, L. Serology of *Salmonella*. **Methods in Microbiology**. New York, N.Y: Academic Press, 1984. V.15, p.1-64.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.28, n.3, p.465-476, 2007.

LOWERY, C.A.; PARK, J.; KAUFMANN, G.F.; JANDA, K.D. An unexpected switch in the modulation of AI-2 based quorum sensing discovered through synthetic 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.23, p.9200-9201, 2008.

LOWERY, C.A.; DICKERSON, T.J.; JANDA, K.D. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. **Chemical Society Reviews**, v.37, n.7, p.1337-1346, 2008.

LOWERY, C.A.; ABE, T.; PARK, J.; EUBANKS, L.M.; SAWADA, D.; KAUFMANN, G.F.; JANDA, K.D. Revisiting AI-2 quorum sensing inhibitors: direct comparison of alkyl-DPD analogues and a natural product fimbrolide. **Journal of the American Chemical Society**, v.131, n. 43, p.15584-15585, 2009.

LU, L.; HUME, M.E.; PILLAI, S.D. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. **Journal of Food Protection**, v.67, n.7, p.1457-1462, 2004.

MACNAB, R.M. Flagella. In: INGRAHAM, J.L.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B. SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. (eds.). ***Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and molecular biology***. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987a. p.70-83.

MACNAB, R.M. Motility and Chemotaxis. In: INGRAHAM, J.L.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B. SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. (eds.). ***Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and molecular biology***. . Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987b. p.732-759.

MANIJEH, M.; MOHAMMAD, J.; ROHA, K.K. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on Food Contact Surfaces. **Journal of Biological Sciences**, v.8, n.2, p.502-505, 2008.

MARCH, J.C. BENTLEY, W.E. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.5, p.495-502, 2004.

MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O.S.; ALVES, L.A.F.; SILVA, B.C.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.538-543, 2007.

MARSHALL, K.C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Microbiology**, v.68, n.3, p.337-348, 1971.

MARTINEZ, M. S. M.; UYTENDAELE, M.; RAJKOVIC, A.; NADAL, P.; DEBEVERE, J. Degradation of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactones by *Bacillus cereus*

in Culture Media and Pork Extract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.7, p. 2329–2332, 2007.

MATTHEW, R.P.; GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, n.1, p.27-33, 2005.

McELDOWNEY, S.; FLETCHER, M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. **Archives of Microbiology**, v.148, n.1, p.57-62, 1987.

McLELLAND, M., K. E. SANDERSON, J. SPIETH, S. W. CLIFTON, P. LATREILLE, L.COURTNEY, S. PORWOLLIK, J. ALI, M. DANTE, F. DU, S. HOU, D. LAYMAN, S. LEONARD, C. NGUYEN, K. SCOTT, A. HOLMES, N. GREWAL, E. MULVANEY, E. RYAN, H. SUN, L. FLOREA, W. MILLER, T. STONEKING, M. NHAN, R. WATERSTON, AND R. K. WILSON. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v.413, n.6858, p.852–856, 2001.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.51, n.4, p.249-253, 2003.

MICHAEL, B.; SMITH, J.N.; SWIFT, S.; HEFFRON, F.; AHMER, B.M. SdiA of *Salmonella enteric* is a luxR homolog that detects mixed microbial communities. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.19, p.5733-5742, 2001.

MILLER, S.T.; XAVIER, K.B.; CAMPAGNA, S.R.; TAGA, M.E.; SEMMELHACK, M.F.; BASSLER, B.L. HUGHSON, F.M. *Salmonella* Typhimurium recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. **Molecular Cell**, v.15, n.5, p.677-687, 2004.

MORRISON, D.C.; RYAN, J.L. Bacterial endotoxins and host immune responses. **Advances in Immunology**, v.28, p.293-450, 1979.

MORTON, L.G.H.; GREENWAY, D.L.A.; GAYLARD, C.C.; SURMAN, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.41, n.3-4, p. 247-259, 1998.

NADELL, C.D.; XAVIER, J.B.; LEVIN, S.A.; FOSTER, K.R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v.6, p.171-179, 2008.

Disponível em:

<<http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0060014>> Acesso em 04 de Setembro de 2012.

NEALSON, K.H.; PLATT, T.; HASTINGS, J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v.104, n.1, p.313-322, 1970.

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm – “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v.76, n.2, p.149-163, 2007.

NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, v.48, n. 6, p.1429-1449, 2003.

OKAMURA, M.; TACHIZAKI, H.; KUBO, T.; KIKUCHI, S.; SUZUKI, A.; TAKEHARA, K.; NAKAMURA, M. Comparative evaluation of bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. **Vaccine**, v.25, n.25, p.4837-4844, 2007.

OKAZAKI, M.M. **Adaptação do método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto benzalcônio em concentrações acima de 200 mg/L.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.318-323, 2007.

OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P.; FILHO, E.S.A.; GONÇALVES, P.M.R. Biofilme na indústria de alimentos. **Higiene Alimentar**, v.20, n.141, p.33-35, 2006.

OLSEN, A.R.; HAMMACK, T.S. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hidrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n.7, p. 958-960, 2000.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. (eds.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 51, p. 558-573.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, n.9, p.577-588, 2007.

PARKER, C.T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signaling during pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v.11, n.3, p.363-369, 2009.

PATRICK, M.E., ADEOCK, P.M., GOMES, T.M., ALTEKRUSE, S.F., HOLLAND, B.H. TRAUXE, R.V., SWERDLOW, D.L. *Salmonella* Enteritidis infections, United States. 1985-1999. **Emerging Infectious Disease**, v.10, n.1, p.1-7, 2004.

PEREIRA, C.S.; THOMPSON, J.A.; XAVIER, K.B. AI-2 mediated signalling in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, p.1-26, 2012.

PINTO, A.T. **Estudo do comportamento de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* na casca, sua penetração no conteúdo interno e alterações na qualidade em ovos de galinha contaminados artificialmente simulando condições usuais de produção comercial.** Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 148p., 2005.

POPOFF, M.Y. **Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*.** Institut Pasteur, Paris, France, Centre Collaborateur OMS de Reference et de Recherche pour les *Salmonella*, 151p., 2001.

POPOFF, M.Y.; Le MINOR, L.E. The genus *Salmonella*. In: Brenner D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T. (eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2. ed. New York, USA: Springer, 2005. Vol.2, p.764-799.

PROUTY, A.M.; GUNN, J.S. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. **Infection and Immunity**, v.71, n.12, p.7154-7158, 2003.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; WEXLER, H.M. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. **Microbiology Ecology**, v.56, n.3, p.412-419, 2008.

RAHMATI, S.Y.; DAVIDSON, A.L.; ZACHIEDRICH, E.L. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. **Molecular Microbiology**, v.43, n.3, p.677-685, 2002.

RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C.; RITCHIE, J. M.; WALDOR, M. K.; WILLIAMS, N.; TAUSSIG, R.; WEI, S.; ROTH, M.; HUGHES, D. T.; HUNTLEY, J. F.; FINA, M. W.; FALCK, J. R.; SPERANDIO, V. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n.5892, p.1078-1080, 2008.

READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, n.1, p.1–11, 2006.

REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A.; PLIKAYTIS, B.D.; FARMER III J.J. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as show by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p.313-320, 1989.

REN, D.; SIMS, J.J.; WOOD, T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, n.4, p.293-299, 2002.

REN, D.; BEDZYK, L.A.; YE, R.W.; THOMAS, S.M.; WOOD, T.K. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, n.5, p.630-642, 2004.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V.P. *Salmonella* spp. In raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.296-299, 2007.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1259-1262, 2008.

RICE, S.A.; McDOUGALD, D.; KUMAR, N.; KJELLEBERG, S. The use of quorum-sensing blockers as therapeutic agents of the control of biofilm-associated infections. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.6, n.2, p.178-184, 2005.

RICK, P.D. Lipopolysaccharide biosynthesis. In: NEIDHARDT, F.C.; INGRAHAM, J.L.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B. SCHAECHTER, M., UMBARGER, H.E. (eds.). ***Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and molecular biology**. Washington, D.C., USA : American Society for Microbiology, 1987. p.648-662.

RISTORI, C.A.; BERGAMINI, A.M.M.; ROWLANDS, R.E.G.; LOPES, G.I.S.L.; PAULA, A.M.R.; OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, E.G.A.; TORRE, J.C.M.D.; PRADO, S.P.T.; YOSHIDA, J.T.U.; RODRIGUES, R.S.M.; TAHA, O.G.; MARSIGLIA, D.A.P.; JAKABI, M. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. **BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5, n.52, p.16-19, 2008.

ROCHE, A.J.; COX, N.A.; RICHARDSON, L.J.; BUHR, J.R.; CASON, J.A.; FAIRCHILD, B.D.; HINKLE, N.C. Transmission of *Salmonella* to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Poultry Science**, v.88, n.1, p44-48, 2009.

ROMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSCHAPE, H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella*

serovars important in human disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v.293, n.4, p.273-285, 2003.

RONNER, A.B.; WONG, A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

ROSADO, M.S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

ROSENBERG, L.E.; CARBONE, A.L.; RÖMLING, U.; UHRICH, K.E.; CHIKINDAS, M.L. Salicylic acid-based poly (anhydride esters) for control of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n.5, p.593-599, 2008.

ROY, V.; ADAMS, B.L.; BENTLEY, W.E. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, n.2, p.113-123, 2011.

SADOWSKA, B.; WALENCKA, E.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; RÓZALSKA, B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica**, v.55, n.5, p.497-501, 2010.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: A molecular approach**. Washington, D.C., USA: ASM Press, 1994. p.107-109.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEIL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D. R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate and U(VI)-contaminated

subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. Nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SILVA, E.N. *Salmonella* Enteritidis em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9, n.37, p.7-12, 1995.

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

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbca/v4n2/13327.pdf>> Acesso em: 25 de Maio de 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo (S.P.): Livraria Varela, 2001. p. 41-58.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras Biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O.M.; MACHADO, R.D.; SOUTO-PADRON, T. Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. **Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica**, v.1, p.1-79, 1989.

SILVERMAN, M.; ZIEG, J.; SIMON, M. Flagellar-phase variation: isolation of the *rh1* gene. **Journal of Bacteriology**, v.137, n.1, p.517-523, 1979.

SIMÕES, M. SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v.43, n.4, p.573-583, 2010.

SMITH, J.L; FRATAMICO, P.M; NOVACK, J.S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.5, p.1053-1070, 2004.

SMITH, J.N.; DYSZEL, J.L.; SOARES, J.A.; ELLERMEIER, C.D.; ALTIER, C.; LAWHON, S.D.; ADAMS, L.G.; KONJUFGA, V.; CURTISS, R. 3<sup>rd</sup>; SLAUCH, J.M.; AHMER, B.M.M. SdiA, an N-acylhomoserine lactone receptor, becomes active during the transit of *Salmonella enterica* through the gastrointestinal tract of turtles. **PLoS ONE**, v.3, n.7, e2826, 2008. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0002826>> Acesso em 25 de Maio de 2012.

SMITH, J.A.; WANG, J.; NQUYEN-MAU, S.M.; LEE, V.; SINTIM, H.O. Biological screening of a diverse set of AI-2 analogues in *Vibrio harveyi* suggests that receptors which are involved in synergistic agonism of AI-2 and analogues are promiscuous. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, v.7, n.45, p.7033-7035, 2009.

SNOW, L.C.; DAVIES, R.H.; CHRISTIANSEN, K.H.; CARRIQUE-MAS, J.J.; COOK, A.J.C.; TEALE, C.J.; EVANS, S.J. Survey of the prevalence of *Salmonella* on commercial broiler farms in the United Kingdom. **Veterinary Record**, London, v. 163, n.22, p.649-654, 2008.

SOARES, J.A.; AHMER, B.M.M. Detection of acyl-homoserine lactones by *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, n.2, p.188-193, 2011.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic Analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v.43, n.3, p.793-808, 2002.

SOLOMON, E.B.; NIERNIRA, B.A.; SAPERS, G.M.; ANNOUS, B.A. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, p.906-912, 2005.

SOMERS, E.B.; WONG, A.C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2218-2229, 2004.

SONI, K.A.; LU, L.; JESUDHASAN, P.R.; HUME, M.E.; PILLAI, S.D. Influence of autoinducer-2 (AI-2) and beef sample extracts on *E. coli* O157:H7 survival and gene expression of virulence genes *yadk* and *hhA*. **Journal of Food Science**, v. 73, n.3, p.135-139, 2008.

SOUZA, J.B.; DANIEL, L.A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, n.2, p.111-117, 2005.

SPERANDIO, V.; LI, C.C.; KAPER, J.B. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. **Infection and Immunity**, v.70, n.6, p.3085-3093, 2002.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P. KAPER, J.B. Bacteria – host communication: the language of hormones. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.15, p. 8951-8956, 2003.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v.45, n.2, p.502-53, 2012.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; MIJAC, V.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v.20, n.3, p.339-343, 2003.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, n.5, p.428-432, 2004.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.187-209, 2002.

SUN, J.; DANIEL, R.; WAGNER-DOBLER, I.; ZENG, A.P. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4:36, 2004.

SURETTE, M.G.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.12, p.7046-7050, 1998.

SURETTE, M.G.; MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.4, p.1639-1644, 1999.

SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. Colony Count Methods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSOESSERD, D.F. (eds.) **Compendium of Methods to the Microbiological Examination of foods**. 3. ed. Washington, D.C., USA: APHA Press, 1992. Cap. 4, p.75-95.

TAGA, M.E.; MILLER, S.T.; BASSLER, B.L. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v.50, n.4, p.1411-1427, 2003.

TAGA, M.E.; XAVIER, K.B. Methods for analysis of bacterial autoinducer-2 production. **Current Protocols in Microbiology**, supplement 23, p. 1-15, 2011.

TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. **Journal of General Plant Pathology**, v.73, n.3, p.193-196, 2007.

TORRES, G.J.; PIQUER, F.J.; ALGARRA, L.; DE FRUTOS, C.; SOBRINHO, O.J. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v.98, n.2-3, p.81-87, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology an Introduction**, 5. ed. New York: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1995. p.491-510.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. **Microbiologia**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 386p.

TROLLER, J.A. **Sanitation in Food Processing**. 2. ed. Orlando: Academic Press, 1993. 478p.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório Anual Ubabef 2012**.

Disponível em: <[www.abef.com.br](http://www.abef.com.br)> acesso em 03 de Novembro de 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), **Table of Safe and Suitable Ingredients**, 2012. Disponível em: <

[http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?q=chlorine+chiller&x=0&y=0&navid=SEARCH&Go\\_button.x=21&Go\\_button.y=11&site=usda](http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?q=chlorine+chiller&x=0&y=0&navid=SEARCH&Go_button.x=21&Go_button.y=11&site=usda)> acesso em 10 de Outubro de 2012.

VENDEVILLE, A.; WINZER, K.; HEURLIER, K.; TANG, C.M.; HARDIE, K.R. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. **Nature Review Microbiology**, v.3, n.5, p.383-396, 2005.

VEROS PRODUTOS QUÍMICOS LTDA. **Dióxido de cloro estabilizado**. Disponível em: <[http://www.veros.com.br/dc\\_todos.php](http://www.veros.com.br/dc_todos.php)> acesso em 31 de Maio de 2012.

VIEIRA, C.R.N., TEIXEIRA, C.G. Condições higiênico-sanitárias de carcaças de frango resfriadas comercializadas em Poços de Caldas, M.G. **Higiene Alimentar**, v.11, n.48, p.36-40, 1997.

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J.S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, 2002. Disponível em: <[http://www.biofilms.bt.tudelft.nl/pdf/2002\\_jxavier\\_biofilmes.pdf](http://www.biofilms.bt.tudelft.nl/pdf/2002_jxavier_biofilmes.pdf)> Acesso em 30/05/2012.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, n.2-3, p.125-131, 2006.

WARD, L.R.; DE SA, J.D.H.; ROWE, B. A phase-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiology and Infection**, v.99, n.2, p.291-294, 1987.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.21, p.319-346, 2005.

WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M., SLATER, H., SIMPSON, N. J., SALMOND, G. P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, n.4, p.365-404, 2001.

WIDMER, K.W.; SONI, K.A.; HUME, M.E.; BEIER, R.C.; JESUDHASAN, P.; PILLAI, S.D. Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing signal inhibitors to autoinducer-2 (AI-2). **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.363-368, 2007.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

YOON, Y.; SOFOS, J.N. Autoinducer-2 activity of Gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. **Journal of Food Science**, v.73, n.3, p.141-147, 2008.

ZHU, J.; MEKALANOS, J.J. Quorum sensing–dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. **Developmental Cell**, v.5, n.4, p.647-656, 2003.

ZIEG, J.; SILVERMAN, M.; HILMEN, M.; SIMON, M. Recombinational switch for gene expression. **Science**, v.196, n.4286, p.170-172, 1977.

ZIEG, J.; SIMON, M. Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, n.7, p.4196-4200, 1980.

ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; ROMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v.71, n.7, p.4151-4158, 2003.

ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology, Chicago**, v.48, n.7, p.107-114, 1994.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilm in the food processing industry-Should they be a concerned? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n.2, p.125-148, 1994.