

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ANÁLISE DE GENES DE EXPRESSÃO  
DE BIOFILME EM CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM  
ABATEDOURO-FRIGORIFICO BOVINO**

LUANA FERREIRA SAHADE

BOTUCATU

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ANÁLISE DE GENES DE EXPRESSÃO  
DE BIOFILME EM CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM  
ABATEDOURO-FRIGORIFICO BOVINO**

LUANA FERREIRA SAHADE

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para defesa de  
Mestrado em área de Saúde Animal,  
Saúde Pública Veterinária e  
Segurança Alimentar.

Orientador: João Pessoa Araujo Júnior  
Co-orientadora: Vera Lúcia Moraes Rall

BOTUCATU

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sahade, Luana Ferreira.

Caracterização fenotípica e análise de genes de expressão de biofilme em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em abatedouro-frigorífico bovino / Luana Ferreira Sahade. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Coorientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 50505009

1. Carne bovina. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Biofilmes. 4. Alginatos. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; alginato; biofilme; carne bovina; expressão gênica.

Nome do Autor: Luana Ferreira Sahade

Título: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ANÁLISE DE GENES DE EXPRESSÃO DE BIOFILME EM CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM ABATEDOURO-FRIGORIFICO BOVINO

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. João Pessoa Araujo Júnior

Presidente e Orientador

Departamento de Microbiologia e Imunologia Instituto de Biociências- UNESP- Botucatu

---

Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Membro da Banca

Departamento de Microbiologia e Imunologia Instituto de Biociências- UNESP- Botucatu

---

Dra. Anne Valéria Mendonça Stachissini

Membro da Banca

Unidade Técnica Regional da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Botucatu/SP

Data da defesa: 29 de março de 2019.

## ***Dedicatória***

*Dedico este trabalho à minha pequena Princesa Ana Luíza, pois é a minha maior inspiração para contribuir com algo para o mundo e ser uma pessoa cada vez melhor. Também dedico a meus pais e irmãos, que junto a mim, deram o sangue para tornar esta trajetória possível.*

## **Agradecimentos**

*Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelos caminhos percorridos e pelas pedras no caminho, este que sempre me estendeu a mão para levantar e percorrer novos caminhos cada vez mais forte;*

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

*Aos meus ancestrais que me regem e me inspiram, que deixaram o legado do ler, sem vocês eu nada seria;*

*À minha mãe Cristina, carinhosa do seu jeito, rígida, sistemática e italianíssima, que com sua frase crucial “Não fez mais que a obrigação”, me fez conquistar universos, que com seu amor e garra nos criou e nos fez enxergar a vida sem limites, que sempre planejou nossos melhores momentos, que sempre nos uniu em família, nos deu a base, a educação para encarar a vida, nos ensinou força, responsabilidade e luta, eterna luta ao alcance do melhor, nos ensinou a não ter medo de encarar os desafios e sempre nos proporcionou o melhor;*

*Ao meu pai José Carlos, que sempre me mimou de todas as maneiras, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais dramáticos e felizes, sendo os principais proporcionados por um isqueiro amarelo, primeiro objeto enxergado depois de três anos, e outro por um sorriso bobo, pasmo de quem vai ser avô ao invés de um divertículo, que fez com que as viagens médicas fossem o momento mais esperado da semana por anos, que transformou um Danoninho na parte mais esperada do dia, depois de horas de espera e atendimento, que riu quando fiquei toda amarela devido ao contraste e foi a piada do ano, que fez todo o sofrimento sempre se transformar em algo extremamente divertido;*

*E a ambos, pai e mãe, que sempre me fizeram acreditar não ter limites para seguir em frente, que a qualquer obstáculo eles estariam lá para me amparar e, portanto, que eu não tivesse medo, que sempre disseram faça, nós te apoiaremos;*

*À minha filha querida, Ana Luíza, que chegou de sopetão para trazer luz à minha vida, me fez descobrir o verdadeiro sentido da vida e do amor, que me deu a verdadeira força para lutar e que arranca os suspiros mais profundos a cada olhar, sorriso ou*

*abraço e que suportou até agora todos os trajetos não planejados, as mudanças mais bruscas, com a maior alegria e serenidade;*

*Aos meus irmãos fantásticos, Larissa e Lucas, que estiveram ali pra mim em todos os momentos, e são exemplos de melhores amigos irmãos;*

*Aos meus cunhados Rafael e Yasmim; que sempre me apoiaram e sempre tive muita admiração;*

*À minha tia Rita, a maior torcedora pela conquista acadêmica depois de meus pais, que sempre esteve comigo, nunca me desamparou e sempre teve as palavras mais sábias nos momentos mais certos;*

*À minha vovoginha Julieta, que desde pequena me desenvolveu o dom da escrita, inclusive me deu a honra de ser homenageada e reconhecida por Cecília Meirelles;*

*À toda a minha família que sempre me apoiou;*

*Ao meu orientador Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior, que me acolheu sem se quer saber quem sou, quem encarou o desafio de me iniciar como mestranda, quem suportou as maiores adversidades de se encarar um concurso no meio do caminho e mesmo assim me deu todo o apoio;*

*À minha co-orientadora Prof. Dra. Vera Lúcia Mores Rall, que aceitou o desafio sem delongas, que me permitiu desabrochar em uma área até então para mim desconhecida, que me deu a liberdade de me desenvolver na área acadêmica e me apoiou como pessoa;*

*Aos meus amigos de infância que me tornaram uma pessoa mais segura e feliz;*

*Aos meus amigos de faculdade, que sempre estiveram ao meu lado e foram a minha família, em especial Taís, Maria Clara, Alecínea, Ana Carolina e Letícia, que nos momentos mais duros me seguraram;*

*À minha amiga Ana Carolina, que me deu todo o suporte desde a faculdade, que sempre me recebeu em Botucatu, como uma irmã e me acolheu em seu lar nos momentos mais precisos, e me inseriu na sua família, me abriu as portas da UNESP e da cidade, que me ilumina todos os dias, que buscando o melhor pra si, transferiu o melhor pra mim e de quebra me deu 3 afilhadinhos de coração que amo incondicionalmente;*

*Aos meus mais que amigos queridos, que conquistei ao longo desse mestrado e espero levar para a vida, Joshua, Jaqueline, Ana Paula, Marisa, Luciane, Maria Laura, Fernanda, Ivana, Marília, Suelen, Marcelo, Laís, Alice, Laís e Anne que me suportaram e me reestruturaram, me olharam nos olhos e disseram não duvide de si, me fizeram*

*resgatar a minha essência, e se hoje cheguei onde estou, na maior parte foi devido ao apoio de vocês;*

*Aos meus amigos, que graças a Deus são muitos, que me ajudaram, me apoiaram, me alegraram e se mantiveram ao meu lado até aqui;*

*Às minhas “assessoras”, Fernanda, Ivana, Ana Paula, Marina, Camila, Jaqueline, Mariana e Fábio, sem vocês, nada disso seria possível;*

*A todos os colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, e Do Instituto de Biotecnologia, que me deram apoio, me ampararam, me ensinaram e me auxiliaram;*

*À querida professora Sandra de Moraes Gimenes Bosco, que por duas vezes “convoquei” para a banca, por suas idéias de aplicabilidade prática, por considerar a importância do projeto e, ao longo de todo esse trajeto, se mostrar uma pessoa maravilhosa, que sempre se permitiu o acesso;*

*Aos professores Ary Fernandes Junior e Terue Sadatsune, que sempre disponibilizaram seus equipamentos, materiais e orientados, suas idéias para o projeto e seu tempo para apoiar a pesquisa, mesmo que eu não tenha compartilhado um pedaço de torta (eternamente lembrarei);*

*Ao Sr. Dr. Luis Resende que me inspirou desde pequena a ser Médica Veterinária e que me fez vislumbrar o mundo da Inspeção e querer seguir a área, que me motivou, ajudou e torceu pelas minhas conquistas;*

*Aos profissionais e colegas que me acompanham e me inspiraram na carreira, Dr. Celso Fernandes Joaquim, Dr. Jean Fernandes Joaquim, Professor Germano Biondi, Professor Roberto Roça, Dra. Anne Valéria Stachissini, Dr. Silvio Duarte com quem durante esses anos trabalhei e me inspirei, que a cada dia me fizeram ser mais apaixonada pelo que faço e que me abriram as portas por onde passei e para a pesquisa acadêmica.*

*À Dra. Patricia Gomes Beato Baptista, minha querida chefe e colega, quem me acolheu no meu novo mundo Onda Verdense, que sem o seu apoio, suas palavras de conforto, e sua paciência extraordinária, nada disso eu teria conseguido;*

*A todos aqueles que passaram por mim deixando alguma lição no caminho, sempre lembrados com gratidão por tudo que aprendi, por despertarem o desafio de ser cada vez melhor para mim mesma e para o mundo.*

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO.....	12
2.1 Produção de carne bovina e a exigência do mercado .....	12
2.2 A contaminação da carne.....	13
2.3 Importância da contaminação por micro-organismos deteriorantes.....	14
2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e importância como deteriorante ....	15
2.5 Características e formação do biofilme .....	16
2.6 Análises moleculares por qPCR.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1 Coleta de amostras de carcaças, produtos cárneos e de superfícies de processamento de produtos cárneos .....	22
4.2 Análises microbiológicas .....	24
4.2.1 Isolamento de colônias características de <i>P. aeruginosa</i> :.....	24
4.2.2 Identificação fenotípica.....	24
4.3 Produção de biofilmes por <i>P. aeruginosa</i> .....	24
4.4 Análises moleculares de expressão gênica de biofilme por cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	25
4.4.1 <i>Primers ou iniciadores</i> .....	25
4.4.2 <i>Extração de DNA e RNA das amostras</i> .....	26
4.4.3 <i>Eficiência dos primers dos genes oprL, algU, algD e 16S por leitura em qPCR</i> .....	27
4.4.4 <i>Expressão dos genes algU, algD, oprl e 16S</i> .....	28
4.4.5 Normalização das reações pelo gene 16S e por quantificação 28	
4.4.6 <i>Análise estatística dos dados</i> .....	28
5 RESULTADOS .....	29
5.1 Cepas isoladas e confirmação fenotípica.....	29
5.2 Intensidade de produção de biofilme das cepas isoladas .....	32
5.3 Expressão gênica e análise estatística .....	37
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÕES.....	41
8 REFERÊNCIAS .....	42

9	ARTIGO CIENTÍFICO.....	49
---	------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios de formação do biofilme.....	17
Figura 2 – Demonstrativo da área de coleta de amostras.....	23
Figura 3 – Curva padrão para análise da eficiência de genes algU, algD e 16S.....	34
Figura 4 – Curva padrão para análise da eficiência de gene oprL.....	35
Figura 5 – Gráficos de expressão gênica por amostra e por normalização.....	37

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Genes de identificação e produção de biofilme .....	26
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção mundial de carne bovina de 2014 à estimativa de 2019 dos principais países produtores.....	12
Tabela 2 – Características fenotípicas das colônias isoladas de <i>P. aeruginosa</i> e dados de amostragem.....	29
Tabela 3 – Perfil físico-químico das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas.....	31
Tabela 4 – Intensidade de produção de biofilme por espectrofotometria.....	32
Tabela 5 – Dados de eficiência da curva padrão dos alvos algU, algD e 16S..	34
Tabela 6 – Valores de Ct e Tm das reações com os genes algU, algD e 16S..	34
Tabela 7 – Dados de eficiência da curva padrão do alvo oprL.....	35

Tabela 8 – Valores de Ct e Tm das reações com o gene oprL.....	35
Tabela 9 - Valores de Ct e Tm das reações com o alvo oprL com amostra P15.....	36
Tabela 10 – Valores de teste estatístico de Wilcoxon Pareado e valor de p' da quantificação relativa para os genes algD e algU.....	38

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina do mundo e para se manter competitivo tem objetivado melhorias em higiene e segurança alimentar. Micro-organismos deteriorantes diminuem a vida de prateleira dos produtos e podem viabilizar patógenos em biofilmes predominantemente heterogêneos. *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias mais comuns em carnes, e tem como característica a alta capacidade de produção de biofilme. Sendo ambientais, a contaminação da carne é facilitada por falhas de higiene e boas práticas, sendo relevante estudos sobre a sua presença em produtos cárneos. Neste trabalho, objetivou-se estudar a intensidade de produção de biofilme e sua expressão gênica por cepas de *P. aeruginosa* isoladas em planta de processamento bovino. As amostras foram obtidas por suabes de carcaças e superfícies em planta de processamento bovino totalizando sete coletas, divididas em dois dias, amostrando-se 22 pontos em cada coleta. Os isolados foram confirmados físico-quimicamente. A produção de biofilme por espectrofotometria classificou a intensidade em fortes, moderadas, fracas e não produtoras. Foram isoladas 32 cepas, das quais 4 demonstraram forte produção de biofilme, 3 moderadas, 4 fracas e 8 não produtoras. Foi predominante a contaminação em carcaças recém abatidas, anteriormente à refrigeração. As amostras foram confirmadas usando o alvo oprL em análise por qPCR, e a comparação da expressão de alginato, algU e algD posteriormente normalizados pelo gene 16S foi realizada em amostras fortes e fracas. As análises de expressão dos genes algU e algD não demonstraram diferença significativa pelas análises de quantificação relativa não correlacionando com a avaliação fenotípica.

**Palavras chave:** carne bovina; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilme; alginato; expressão gênica

## ABSTRACT

Brazil is the second largest beef producer in the world and in order to remain competitive, it has aimed at improving hygiene and food safety. Damaging microorganisms decrease the shelf life of products and may render pathogens viable in predominantly heterogeneous biofilms. *Pseudomonas aeruginosa* are the most common bacteria in meats, characterized by high biofilm production capacity being environmental, meat contamination is facilitated by good practices hygiene faults being relevant studies on their presence in meat products. The objective of this study was to determine the intensity of biofilm production and its gene expression by strains of *P. aeruginosa* isolated from a bovine processing plant. Samples were obtained by carcass swabs and surfaces in a bovine processing plant, totaling seven samples, divided in two days, sampling 22 points in each collection. The isolates were physico-chemically confirmed. The biofilm production by spectrophotometry classified the intensity as strong, moderate, weak and non-producing. Thirty-two strains were isolated, 4 of which showed strong biofilm production, 3 moderate, 4 weak and 8 non-producing. Contamination was predominant in freshly slaughtered carcass prior to refrigeration. All samples were confirmed in qPCR analysis with the *oprL* target, and gene expression of strong and weak samples were developed with alginate genes, *algU* and *algD*, normalized by 16S gene. Expression analyzes of the *algU* and *algD* genes did not demonstrate significant difference by the relative quantification analyzes not correlating with the phenotypic evaluation.

**Key words:** beef; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; alginate; gene expression

## **CAPÍTULO I**

### **1 INTRODUÇÃO**

Em se tratando de agentes bacterianos e deterioração da carne, um dos gêneros mais comumente encontrados são *Pseudomonas* spp. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), bacilo gram negativo, possui alta capacidade de produção de biofilmes mantendo-se viável por mais tempo no ambiente. Ela tem a capacidade de interagir com agentes patógenos de mesma caracterização Gram, através de moléculas sinalizadoras eliminadas no ambiente, chamadas autoindutoras, permitindo a viabilidade de diversas espécies em um mesmo meio comum. *P. aeruginosa*, por ser uma bactéria oportunista, excelente produtora de biofilme, e que utiliza diversos mecanismos de proteção, como a fixação mais rápida à superfície e formação de biofilme que outras bactérias, garante sua sobrevivência mesmo diante de disputa com outros agentes. Com isso, em ambientes de produção e processamento de alimentos, os agentes deteriorantes devem ser tratados com maior relevância.

Produtos cárneos e seus derivados são citados como os principais potenciais veiculadores de enfermidades transmitidas por alimentos e se alimentos são sujeitos a ambientes contaminados, estes podem se constituir em veículo de transmissão de enfermidades.

A carne bovina é tida como uma das carnes mais consumidas no mundo. Segundo dados da Organização das Nações Unidas da Agricultura e Alimentação (FAO), esta lidera o 4º lugar no ranking mundial e sua produção tem histórico crescente desde 2015 sendo, hoje, liderada pelos EUA, seguido do Brasil e União Européia. Para o Brasil, esta produção tem batido recordes e a expectativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) é que, pela primeira vez, o país ultrapasse a marca de 10 milhões de toneladas em 2019.

Diante deste cenário, a crescente demanda e aumento da produção de carne bovina geram maiores pressões de mercado quanto ao controle de enfermidades transmitidas por alimentos e maior qualidade e durabilidade do

produto a ser consumido. Os matadouros-frigoríficos cada vez mais preconizam condições mais inócuas para seu processamento.

As contaminações por agentes deteriorantes ocasionam a diminuição da vida de prateleira dos alimentos, causam perdas econômicas significativas e, ocasionalmente, podem resguardar contaminações por agentes patógenos através de aglomerados heterogêneos envoltos por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) chamada de biofilme microbiano.

Os biofilmes permitem a persistência de agentes contaminantes no ambiente e, quando há o contato com o produto cárneo, promovem a sua contaminação através da liberação de microorganismos viáveis.

Antes de desenvolver estudos mais aprofundados sobre o desencadeamento da produção de biofilme, o comportamento das diversas cepas presentes nesse ambiente em específico em relação ao biofilme deve ser caracterizado.

Bactérias possuem características individuais mesmo se comparando diferentes cepas da mesma espécie, como alta, intermediária ou baixa capacidade de produção de biofilmes. Isso dependerá da genética, virulência e resistência do micro-organismo, mesmo em meios semelhantes.

A caracterização fenotípica do comportamento das diferentes cepas demonstra qual a sua capacidade de produção de biofilme em mesmas condições ambientais, porém o uso de técnicas de análise por Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*Polymerase chain reaction quantitative real time*) ou *qPCR*, e *RT-qPCR* (*Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*) tem sido amplamente utilizadas para avaliação da expressão gênica relacionada a biofilme, sendo uma metodologia com maior sensibilidade de detecção de genes e seus momentos de expressão.

Em saúde humana, muitos estudos foram elaborados correlacionando o alginato, substância que dá a característica mucoide ao biofilme, à patogenicidade da cepa, porém não se tem dados suficientes ainda sobre como o desenvolvimento deste polímero em produtos cárneos pode impactar na formação do biofilme e se a sua expressão é quem determina a formação do biofilme.

Sendo assim, a presença deste agente em plantas de processamento de produtos cárneos é relevante e estudos sobre sua capacidade de produção de biofilme são o foco inicial para melhor atuar no controle deste micro-organismo.

## 2 REVISÃO

### 2.1 Produção de carne bovina e a exigência do mercado

A carne bovina ocupa o 4º lugar no ranking mundial de consumo. Apesar de o Brasil possuir o maior rebanho produtivo de gado de corte do mundo, hoje ocupa o segundo lugar em produção de carne bovina, diante de um cenário de crescimento desde 2015 e, a expectativa, segundo dados da USDA, é que atinja a produção recorde de mais de 10 milhões de toneladas em 2019 conforme demonstrado na Tabela 1 abaixo (FORMIGONI, 2019; MCCARTHY, 2019).

**Tabela 1:** Produção mundial em toneladas de 2014 à estimativa de produção em 2019 dos principais países produtores de carne bovina

Ano	Mundo	EUA	Brasil	UE	China	Índia	Argentina	Austrália	Outros
2014	60,81	11,07	9,72	7,44	6,89	4,10	2,70	2,59	16,30
2015	59,71	10,81	9,42	7,68	6,70	4,10	2,72	2,54	15,74
2016	60,47	11,50	9,28	7,88	7,00	4,20	2,65	2,12	15,84
2017	61,62	11,94	9,55	7,86	7,26	4,25	2,84	2,14	15,78
2018	62,87	12,28	9,90	7,91	7,32	4,30	2,95	2,30	15,91
2019	63,62	12,72	10,20	7,80	7,40	4,33	3,00	2,18	15,99

Fonte: Formigoni, 2019. Baseado em dados da USDA, IBGE e OECD

As pressões de mercado quanto a qualidade do produto e a diminuição de perdas durante a produção estimulam as indústrias cada vez mais a

implantarem sistemas que as enquadrem em produtos de valor e cada vez mais inócuos. Concomitantemente, as autoridades têm tornado mais exigentes os padrões de qualidade e segurança alimentar a serem atendidos, principalmente em alimentos não processados como as carnes *in natura*. Estes devem atender às exigências de mercado e controle de enfermidades transmitidas por alimentos, observados através das constantes atualizações das legislações em vigor, como exemplo a revisão do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) publicada em 09 de março de 2017 através do Decreto 9.013, posteriormente com nova atualização pelo Decreto 9.069 de 31 de maio de 2017.

Não só órgãos governamentais de fiscalização, mas as próprias empresas tendem a cada vez mais melhorar seus processos, já que a inocuidade na produção aumenta a lucratividade pela diminuição de perdas e pelo aumento da validade de seus produtos, o que garante a possibilidade de maior produção e expansão para mais mercados consumidores.

## **2.2 A contaminação da carne**

Produtos cárneos e seus derivados são citados como os principais potenciais veiculadores de enfermidades transmitidas por alimentos por possuir alta composição protéica, presença de substâncias nitrogenadas e minerais, um pH favorável à maioria dos micro-organismos e alta concentração de água propícia para torná-los meios de cultura excelentes e por adquirirem a contaminação mais facilmente durante o seu próprio processamento (AMARAL, 2010).

A contaminação pode ocorrer por muitos fatores como manipulação errônea, estado geral de higiene do animal no pré-abate, do ambiente de manipulação, e jejum deficitários. A própria microbiota do animal contém micro-organismos potencialmente deteriorantes e patogênicos (CASELANI, 2010; NESPOLO, 2013).

Para que as empresas consigam minimizar estes impactos e melhorar a qualidade de seus produtos ofertados foram introduzidos, a partir da década de 60, as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higienização Operacionais (PPHO) e a partir da década de 70, Análise de

Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Estas são estratégias implantadas nas indústrias brasileiras, com o objetivo de detectar, monitorar e assegurar a inocuidade dos produtos (AMARAL, 2010; ANDRADE E QUEIROZ, 2011; WINCKLER, 2007).

No caso de contaminação microbiológica, as perdas econômicas são relacionadas a agentes patógenos. Tais patógenos são detectados através de análises laboratoriais representativas exigidas pelas diferentes legislações relacionadas. Como exemplo, a RDC12/2001/ANVISA define os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e determina os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano; a Instrução Normativa nº 60/2018/SDA/MAPA estabelece o controle microbiológico de *Escherichia coli* (*E. coli* Produtora de Toxina Shiga - STEC) e *Salmonella* spp. em carcaças suínas e bovinas. Também ocorrem contaminações por agentes deteriorantes, ocasionadas por falhas operacionais, que apesar de não constarem legislações sobre o controle desses micro-organismos, diminuem a vida de prateleira (“*shelf life*”) do produto e conseqüentemente seu descarte (ALCANTARA, et al., 2012).

### **2.3 Importância da contaminação por micro-organismos deteriorantes**

Alimentos sujeitos à ambientes contaminados, que permitem a multiplicação de agentes infecciosos ou toxigênicos, ou ainda deteriorantes, podem se constituir em veículo de transmissão de enfermidades (CASELANI, 2010). Contaminações por agentes deteriorantes são de grande relevância na indústria alimentícia, pois estes diminuem a vida de prateleira dos alimentos e, ocasionalmente, podem resguardar contaminações por agentes patógenos através de interações em um mesmo meio (COSTA, et al., 2016; WANG, 2013; ZHANG, et al., 2011).

Sendo assim, ambientes inócuos tendem a se tornar fontes contaminadoras se ocorrerem falhas nas três principais estratégias de qualidade citadas anteriormente. Essas contaminações, se mantidas no ambiente, podem ocasionar a persistência de micro-organismos viáveis através da formação de biofilmes gerando assim a contaminação de produtos por

patógenos e deteriorantes, ocasionando as perdas ou ainda a veiculação de agentes patógenos (ANDRADE e QUEIROZ, 2011; CAIXETA, 2008; GIAOURIS, et al., 2014).

Um dos principais gêneros bacterianos que causam a deterioração de carnes é a *Pseudomonas* spp. e alguns dos patógenos mais relevantes que contaminam esse tipo de alimento são *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (COSTA, et al., 2016; GOBETTI, et al., 2007). Todos possuem a capacidade de produção de biofilmes, o que torna a sua presença não só importante no aspecto econômico de perdas mediatas e a relação com segurança alimentar, mas também pela persistência e viabilidade desses micro-organismos no ambiente e/ou sua difícil eliminação. (CAIXETA, 2008; GIAOURIS ET. AL 2014; GIAOURIS ET. AL, 2015; OLIVEIRA, 2011).

#### **2.4 *Pseudomonas aeruginosa* e sua importância como deteriorante**

*P. aeruginosa* são bactérias ubiqüitárias, encontradas em diferentes ambientes inclusive na microbiota externa do animal, o que facilita a contaminação por este agente. Possuem alta capacidade de produção de biofilme, podendo ser formado em até 4 horas após fixação da cepa planctônica. Dessa forma, convertem-se em uma forma mais mucóide, e secretam uma grande quantidade de exopolissacarídeo altamente viscoso, composto principalmente por alginato, ácidos nucleicos e proteínas, em ambientes onde haja maior concentração de oxigênio e umidade (FERREIRA, 2005; LAILA e SANTOS, 2016).

Em ambientes de processamento de produtos cárneos, sua importância advém de serem potenciais deteriorantes, sendo utilizado como parâmetro de contaminação ambiental. Neste sentido as características implicadas a este aspecto são:

- psicotróficas, ou seja, resistem às baixas temperaturas de armazenamento, se mantendo viáveis por longos períodos;
- Gram negativas, assim como os dois mais importantes patógenos *Salmonella* spp. e *E. coli*. Podem se comunicar com estas através de moléculas sinalizadoras, os autoindutores, o que permite que haja interação e agregação das espécies em um mesmo meio ou biofilme;

- possuem fímbrias que lhes permitem maior poder de fixação;
- flageladas, portanto móveis, podendo se locomover mais facilmente e colonizar novos ambientes;
- Produtoras de pioverdina e piocianina, que pode causar inibição do biofilme de outras bactérias, o que permite sua sobrevivência, causando a dependência de outras espécies ao seu biofilme;
- Aeróbia estrita, portanto se mantendo em superfícies e não resistindo a embalagens a vácuo;
- Produção de alginato, substrato que caracteriza a viscosidade e fixação definitiva da célula ao meio (GIRARDELLO, 2007; LAILA e SANTOS, 2016).

O alginato é um polímero linear de polissacarídeo responsável pela característica mucóide da matriz, o que facilita a fixação do aglomerado e desempenha proteção estrutural e estabilidade ao biofilme. Em infecções, o alginato, sendo um mediador de aderência à mucina, promove resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune, pois inibe a ligação de anticorpos, fagocitose e a morte intracelular em leucócitos (FERREIRA, 2005; GHOLAMI, 2017; LAILA e SANTOS, 2016).

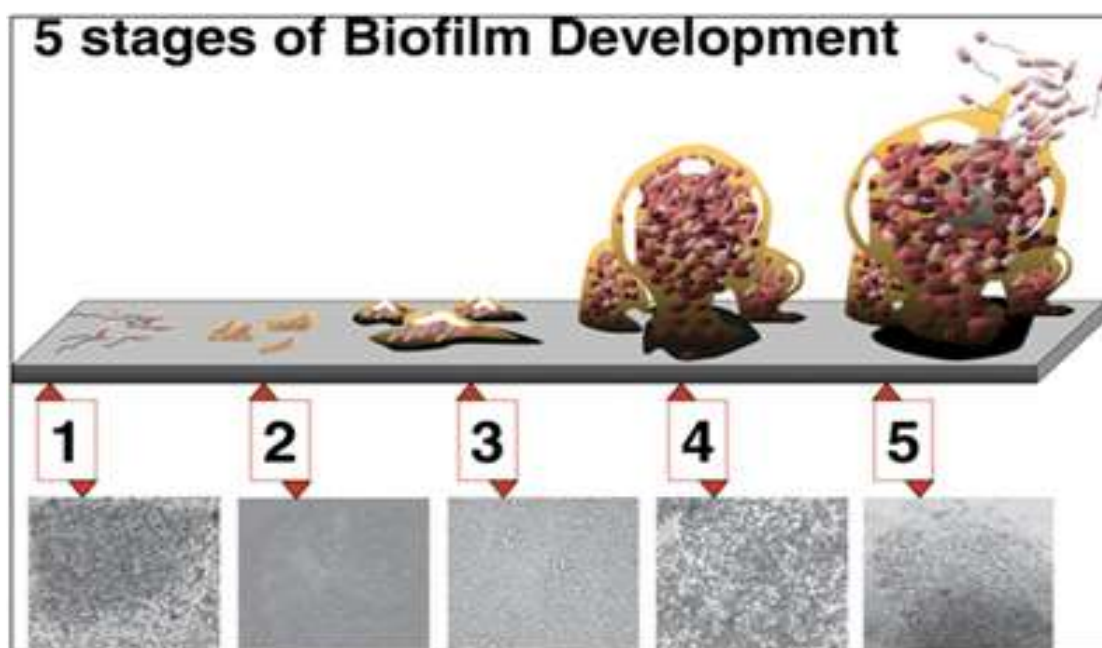
*Pseudomonas aeruginosa* é amplamente estudada por ser uma bactéria oportunista, patogênica em indivíduos imunocomprometidos, que causa complicações do trato respiratório inferior, queimaduras, trato urinário e otites. Uma vez instalada, é de difícil eliminação e apresenta alto índice de resistência a antimicrobianos, característica intrínseca pela produção de biofilme e uso de nitrato em substituição ao oxigênio (FUENTEFRÍA, et al, 2008; GIRARDELLO, 2017).

## **2.5 Formação do biofilme e suas características**

Biofilme é o termo dado a uma comunidade bacteriana envolta por substâncias produzidas pelas próprias bactérias com a finalidade de desenvolver e manter a colônia, protegendo-a de fatores externos. Essa comunidade geralmente é heterogênea, ou seja, composta por mais de uma espécie bacteriana, gerando a preocupação com a viabilidade de bactérias patogênicas e deteriorantes em ambientes de produção e beneficiamento. Os biofilmes possuem poros e canais por onde passam a água e troca de

nutrientes, oxigênio e metabólitos, que precisam ser excretados. Uma característica comum a todos os biofilmes é a secreção celular de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, os EPS, que mantêm as células fixadas e viáveis, fornecendo um tampão contra o ambiente. No entanto, cada matriz é diferentemente produzida, dependendo das condições do ambiente e espécie envolvida, podendo ocorrer várias misturas de polissacarídeos, proteínas e até ácidos nucleicos (CAIXETA, 2008; GARCIA, 2015; KASNOWSKI, et al., 2010; LAILA e SANTOS, 2016; SREY, 2013).

Acredita-se que os biofilmes passam por até 5 estágios desde a adesão da bactéria planctônica até o descolamento em agregados celulares ou em células novamente planctônicas, como exemplificado na **Figura 3** (CAIXETA, 2008; GARCIA, 2015; KASNOWSKI, ET AL., 2010; SREY, et al., 2013).



**Figura 1:** Estágios da formação do biofilme em superfícies à sua dissolução: (1) adesão reversível; (2) adesão irreversível, (3) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme; (4) maturação; (5) rompimento da matriz e dispersão de células.

Fonte: SREY, et al., 2013. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006536>.

O estágio inicial de adesão (estágio 1) pode ser reversível e é dependente da superfície biótica ou abiótica e das propriedades físico-químicas da superfície bacteriana. Já o segundo estágio caracteriza-se como irreversível onde há mudança de uma interação fraca das bactérias com a superfície para uma ligação permanente com a presença de EPS. Com o aumento do

crescimento bacteriano, o possível recrutamento de células planctônicas (de vida livre) e a produção de EPS inicia-se o terceiro estágio de formação do biofilme, fortalecendo o vínculo entre células. No quarto estágio, observa-se o biofilme maduro onde há uma estrutura organizada, com bactérias crescendo sob a forma sésil em microcolônias heterogêneas, fechadas em complexos pela matriz de EPS e espalhadas por canais abertos, que pode ser plana ou em forma de cogumelo, dependendo da fonte de nutrientes da qual é dependente. Nesse estágio, foi observado que vários genes estão envolvidos na tradução, metabolismo, transporte de membrana, secreção e regulação gênica, e apresentam alteração de expressão. O quinto e último estágio é o de degradação da matriz onde as células presentes retornam a sua vida planctônica para colonizar novos ambientes (SREY, et al., 2013).

A organização de células em biofilmes demonstra vantagens de um ambiente protetor devido a matriz de EPS que dificulta e lentifica a penetração de agentes antimicrobianos, pois esta age como uma barreira de filtragem e favorece a captação de elementos necessários à sobrevivência do aglomerado. Por ser uma matriz polissacarídica polianiônica hidratada e estar afixada no componente lipopolissacarídico da parede celular, as EPS protegem a célula da desidratação, já que podem reter água em quantidade muito maior que a sua massa (LAILA e SANTOS, 2016; RESENDE, 2005). Mesmo com o acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos, há a compensação destes com a capacidade de crescimento organizado das células presentes, determinado pelo *Quórum Sensing* (QS) ou sensor de *quórum*, onde há comunicação intercelular através de moléculas químicas liberadas no ambiente que estimulam ou diminuem o metabolismo celular de acordo com as condições do ambiente, sendo estas denominadas AI. Ainda há uma consequente redução na atividade de antibióticos e sanitizantes devido à fase estacionária dessas células, já que muitos destes atuam em fases de multiplicação celular. Através do uso dos AI, a bactéria é capaz de regular seu comportamento de acordo com a densidade populacional quanto à formação de biofilmes. Diante disto, a formação de biofilme pode aumentar a resistência a produtos antimicrobianos, o que torna um grande desafio a sua eliminação das instalações de processamento de alimentos (GARCIA, 2015; KIEVIT, 2009; SMITH e IGLEWSKI, 2003).

A adesão bacteriana em superfícies abióticas ocorre genericamente mediada por interações físico-químicas não específicas, podendo ser pela atração inicial aleatória das células bacterianas planctônicas à superfície, através do movimento browniano e da força gravitacional ou, de modo dirigido, via quimiotaxia e motilidade, através de flagelos e pili. Já em superfícies bióticas são interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante (TRENTIN et al., 2013).

Cada micro-organismo citado possui um mecanismo e capacidade diferentes de adesão às superfícies e a composição de matriz exopolissacarídea produzida, estando de acordo com as condições ambientais (STOCCO, et al., 2017).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem usar o flagelo, crescimento clonal ou mobilidade de contração para a adesão inicial. Posteriormente usam o pili tipo IV para se locomover na superfície da camada inicial e formar microcolônias, sendo que este gera a translocação na superfície através da mobilidade de contração ou *twitching motility*. Por fim, há a produção de EPS, estruturando o biofilme (CAIXETA, 2008). Três EPS foram identificados em *P. aeruginosa*, incluindo: alginato, *Psl* e *Pel* e desempenham papéis importantes na proteção estrutural e na estabilidade dos biofilmes, contribuindo para reduzir a suscetibilidade dos biofilmes ao tratamento antibiótico e aos mecanismos de defesa antibacteriana humana. As características do alginato causaram precedência sobre outros fatores na estrutura do biofilme (CAIXETA, 2008; GHOLAMI, et al., 2017; KIEVIT, 2009).

## 2.6 Análises moleculares por qPCR

Para análise da expressão de genes que iniciam a produção de biofilmes e caracterização genômica os métodos de análise por *Polymerase chain reaction quantitative real time (qPCR)* e *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time (RT-qPCR)* tem sido amplamente utilizadas pois não há influência da amplificação não específica se comparada à outras técnicas moleculares. (ANDREATTI FILHO, et al., 2011; BOUTIN, et al., 2018; MATSUYAMA, et al, 2015; NEVES, 2014; SALES, et al, 2014)

Além disso, o *qPCR* é uma ferramenta promissora na detecção de amostras determinando a presença ou ausência de um transcrito. É possível comparar níveis de RNAs mensageiros (mRNA) em diferentes amostras e caracterizar padrões de expressão gênica. Também possibilita a quantificação do material presente na amostra mesmo em níveis muito baixos, baseando-se na determinação do número de cópias do gene alvo. Ainda apresenta a vantagem de se poder monitorar cada ciclo durante a análise (ANDREATTI FILHO, et al., 2011; BOUTIN, et al., 2018; MATSUYAMA, et al, 2015; NEVES, 2014; SALES, et al, 2014).

A emissão de fluorescência durante as variações de temperatura permitem que o termociclador faça a leitura e a demonstre em gráficos em tempo real quantificando a amplificação do gene alvo em cada ciclo pela intensidade de fluorescência. Essa intensidade é determinada durante a fase exponencial de amplificação, e quando há um aumento estatisticamente significativo em relação a uma linha de base é possível determinar um valor limiar ou *threshold cycle* (Ct), que distingue o sinal de amplificação a partir da linha de base. A linha de base é definida pela fluorescência emitida nos primeiros ciclos e o Ct se refere ao número de ciclos que uma amostra precisa para emitir fluorescência suficiente para ultrapassar o limiar (ANDREATTI FILHO, et al., 2011; BOUTIN, et al., 2018; MATSUYAMA, et al, 2015; NEVES, 2014; SALES, et al, 2014).

É possível quantificar mRNA através de uma *qPCR* por meio de quantificação absoluta e quantificação relativa. Na quantificação absoluta, utiliza-se uma curva padrão, obtida através de diluições seriadas com concentração conhecida de um controle que determina o número de cópias amplificadas na amostra alvo. Já na quantificação relativa, a comparação é obtida por ordens de grandeza através dos valores de Ct de cada amostra (ANDREATTI FILHO, et al., 2011; BOUTIN, et al., 2018; MATSUYAMA, et al, 2015; NEVES, 2014; SALES, et al, 2014).

O gene de referência, controle endógeno ou normalizador, é um gene expresso em todos os tipos celulares e seus estágios de desenvolvimento, sem alteração descrita nos grupos analisados. Muitas vezes os genes de escolha são os responsáveis pela expressão de RNA ribossomais, componentes da RNA polimerase ou genes estruturais ( $\beta$ -actina, por exemplo). Sua

amplificação, portanto, é utilizada para normalizar a expressão da amostra utilizada, minimizando diferenças nas quantidades de RNA que ocorrem por variações em cada reação, pipetagem ou purificação do RNA (ANDREATTI FILHO, et al., 2011; BOUTIN, et al., 2018; MATSUYAMA, et al, 2015; NEVES, 2014; SALES, et al, 2014).

*P. aeruginosa* são confirmadas geneticamente utilizando-se PCR com iniciadores específicos (primers) para o alvo oprL. Existem dois genes de identificação da espécie, oprI e oprL, porém em ambientes hostis, *P. aeruginosa* podem demonstrar fenótipo atípico e o gene oprL é mais específico neste caso (DOURAGHI, et al., 2014).

As pesquisas moleculares relacionadas ao alginato utilizam três tipos de alvo: algU, algD e algL. Estes genes estão diretamente relacionados à capacidade de desenvolvimento do biofilme sendo os genes algU e algD reguladores positivos de alginato e, algL, um sintetizador de alginato-ligase que resulta na despolimerização do alginato causando a redução da integridade do biofilme (FERREIRA, 2005; GHOLAMI, 2017; LAILA e SANTOS, 2016).

### **3 HIPÓTESES DO TRABALHO**

*P. aeruginosa* isoladas de plantas de processamento de produtos cárneos possuem diferentes intensidades de produção de biofilme intrínseca, há diferença de expressão gênica em diferentes intensidades de produção e o alginato, principal composto de viscosidade do biofilme, é, em biofilmes desenvolvidos em produtos cárneos ou *in vitro*, o principal ativador do desenvolvimento do biofilme.

### **4 OBJETIVOS**

O trabalho teve como objetivos:

- 1) Isolamento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de carcaças bovinas e planta de processamento e caracterização da produção de biofilme por estas;
- 2) Selecionar 4 cepas com alta produção de biofilme e 4 com baixa produção em relação à cepa padrão ATCC 27853;
- 3) Padronizar as reações de *qPCR* e *RT-qPCR* para avaliação da expressão gênica de biofilme para posterior análise das cepas isoladas.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

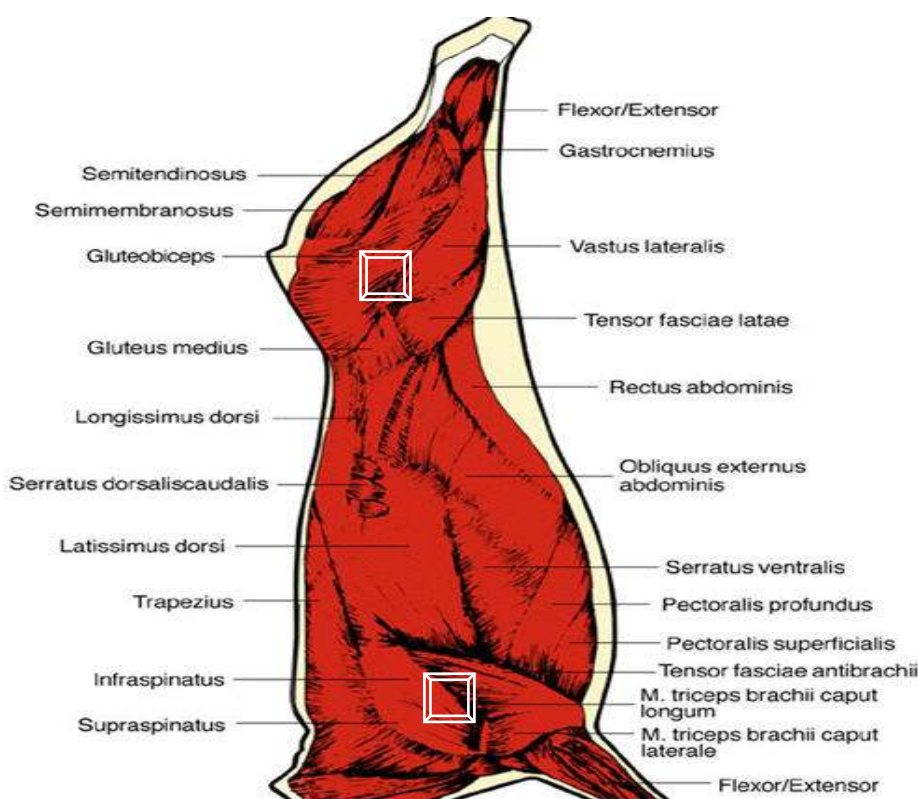
### **5.1 Coleta de amostras de carcaças, produtos cárneos e de superfícies de processamento de produtos cárneos**

As coletas foram realizadas em abatedouro-frigorífico de bovinos, com aprovação para exportação, registrado sob Serviço de Inspeção Federal, situado no Estado de São Paulo.

Foram realizadas 7 coletas em abatedouro de bovinos, com intervalos aproximados de 15 dias entre as coletas. Em cada coleta foram amostrados 22 pontos. As coletas foram divididas em 2 dias, onde, no primeiro dia, foram coletadas amostras de dois pontos de cada meia carcaça aleatória, durante a sua entrada na câmara de resfriamento, totalizando três meias carcaças. Os pontos coletados nas carcaças referiram-se à região de paleta e região de alcatra totalizando-se seis pontos. Também foram coletados três pontos da respectiva câmara de resfriamento, sendo um do piso, uma da parede de entrada da câmara e outro da parede de saída da câmara. Já no segundo dia, as mesmas carcaças coletadas no dia anterior, após sua repartição em quartos já na entrada da sala de desossa, foram coletadas nos mesmos pontos totalizando seis pontos. Durante a desossa, as peças referidas à coleta em quartos foram marcadas e após o toalete dessas peças foram novamente coletadas amostras, somando-se mais seis pontos. Também foi coletada amostra da esteira de refile, por onde passaram as peças tanto de alcatra como de paleta para toalete.

Para identificação dos quartos e cortes amostrados foram utilizadas chapinhas de metal esterilizadas por três minutos em água a 85°C, disponibilizadas pela Inspeção Federal local.

As amostras foram coletadas através de suabes estéreis fortemente friccionados nas superfícies da carne e em pontos da esteira e posteriormente embebidos e armazenados para transporte em cinco ml de água peptonada tamponada e mantidos sob refrigeração. Foi utilizado delimitador de área de superfície de 10 cm<sup>2</sup>, conforme utilizado para coletas oficiais, e os pontos coletados estão exemplificados na **Figura 2**.



**Figura 2.** Demonstrativo da área de coleta de amostras nos quartos anterior e posterior. Região de paleta (*mm. Triceps brachii, Supraspinatus, Infraspinatus*). Região de Alcatra (*mm. Gluteobiceps, Vastus Lateralis, Tensor fasciae latae*).  
Fonte: <https://stravaganzastravaganza.blogspot.com/2011/02/classificacao-dos-musculos-bovinos.html>

As amostras foram processadas no mesmo dia de coleta, no laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências (IB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – *campus* Botucatu.

A partir da segunda coleta, o estabelecimento adotou o sistema de refrigeração de carcaças por aspersão, em acordo com a Resolução DIPOA n°

02 de 09/08/2011 que tem por objetivo a diminuição do tempo de queda de T° das carcaças e evitar a perda de peso das mesmas por desidratação.

## **5.2 Análises microbiológicas**

### **5.2.1 Isolamento de colônias características de *P. aeruginosa*:**

Cada amostra coletada foi diluída em concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em solução salina a 0,85%, na proporção de 1ml da amostra para 9ml de solução salina. Alíquotas de 0,1 ml da amostra pura e das diluições foram semeadas em Cetrimide ágar base (DIFCO™) acrescido com 10% de glicerol e incubadas a 35°C por 48 horas

### **5.2.2 Identificação fenotípica**

As colônias características foram submetidas às provas bioquímicas de oxidase, crescimento a 42°C, oxidação e fermentação da glicose, movimento e formação de pigmento B.

## **5.3 Produção de biofilmes por *P. aeruginosa***

Uma colônia de cada amostra isolada e confirmada pelos testes físico-químicos foi semeada em caldo *Brain heart infusion* (BHI - OXOID™) + 0,5% de glicose (SIGMA™), estéril, incubada a 37°C/24h, sendo, a seguir, diluída até 0,5 na escala Nefelométrica de McFarland, correspondente ao padrão de turvação equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC, utilizando-se BHI + 0,5% de glicose. Uma alíquota de 200 µl foi plaqueada, em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato, incubadas por 37°C/48 horas, em câmara úmida. Após período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa, após secagem em temperatura ambiente, foi colocada em um leitor de ELISA (*Babsystems, MultiSkan EX*), com leitura a 570 nm. BHI +

0,5% de glicose não inoculado foi utilizado como o branco ou padrão negativo, utilizado para corrigir o valor da absorbância e posteriormente calcular a média dos quatro poços. As cepas que apresentaram valores resultantes dessa correção, maiores que 0,1, foram consideradas produtoras de biofilme, de acordo com o protocolo descrito por Vasudevan et al., 2003 com algumas adaptações para melhorar seu desempenho.

Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão identificada como produtora de biofilme *P. aeruginosa* ATCC 27853 (catalogada no *American Type Culture Collection*).

Para classificação das cepas isoladas em relação à intensidade de produção de biofilme foi utilizado o método descrito por Stepanovic, et al (2000) que consiste em 4 fórmulas onde a partir da média das quatro repetições (D.O.) e de acordo com a relação entre D.O. e D.O.c. (controle negativo), as amostras foram classificadas em não produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras:

- $D.O. \leq D.O.c.$ : não produtor
- $D.O.c. < D.O. \leq (2x D.O.c.)$ : fraco produtor
- $2x (D.O.c.) < D.O. \leq (4x D.O.c.)$ : moderado produtor
- $4x (D.O.c.) < D.O.$ : forte produtor

## **5.4 Análises moleculares de expressão gênica de biofilme por cepas de *P. aeruginosa***

### *5.4.1 Primers ou iniciadores*

Os iniciadores (*primers*) foram escolhidos a partir de regiões descritas na literatura como específicas para *P. aeruginosa* e analisados no programa *OligoAnalyser 3.1* para verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados. A especificidade analítica *in silico* dos iniciadores foi testada com o programa *PrimerBlast* (IDT, 2017/2018; NCBI,2017/2018).

As sequências de *primers* para os alvos específicos são descritas no **Quadro 1** abaixo.

**Quadro 1.** Genes de identificação e de produção de biofilme e sequências dos iniciadores empregados nas reações de *qPCR* para a identificação molecular e expressão de genes alg relacionados a produção de biofilme correlacionados a espécie *P. aeruginosa*.

<b>Genes de identificação e virulência</b>	<b>Sequência dos iniciadores (5' → 3')</b>	<b>Referência</b>
<b>16S <i>rRNA</i></b>	AGTACGGCCGCAAGGTTAAA CAGCATGTCAAGGCCAGGTA	<i>PrimerBlast</i> (NCBI,2018; IDT, 2018).
<b><i>oprL</i></b>	TACGACAGCTCCGACCTGAA GCCAGAGCCATGTTGTACT	<i>PrimerBlast</i> (NCBI,2017; IDT, 2017)./ DOURAGHI <i>et al.</i> (2014)
<b><i>algU</i></b>	CGATGTGACCGCAGAGGATG TCAGGCTTCTCGCAACAAAGG	GHOLAMI <i>et al.</i> (2017)
<b><i>algD</i></b>	AAGGCGGAAATGCCATCTCC AGGGAAGTTCCGGCCGTTTG	GHOLAMI <i>et al.</i> (2017) <i>PrimerBlast</i> (NCBI,2018; IDT, 2018).

Foram testadas as sequências descritas em literatura e nova sequência desenhada, baseada nos *primers* da literatura, no programa *PrimerBlast* e posteriormente analisadas no programa *Oligoanalyser Tool* (IDT, 2017/2018; NCBI,2017/2018).

#### 5.4.2 Extração de DNA e RNA das amostras

As amostras foram cultivadas em 2 ml BHI + 0,5% de glicose a 35°C por 24h e após o crescimento bacteriano cada amostra foi diluída em concentração

de 0,5 na Escala de Mc Farland. Em seguida, as amostras foram separadas em 2 tubos estéreis contendo 1 ml cada, e centrifugadas a 14.000 x g por 10min. Descartou-se o sobrenadante, mantendo-se o pellet e este foi conservado em *RNA later* para congelamento até a extração.

Para a extração do DNA das amostras foi utilizado o kit *GeneJet Genomic DNA Purification* (THERMO SCIENTIFIC) e com a extração segundo as normas do fabricante.

Já para a extração de RNA, o *Kit Total RNA Purification* (NORGEN BIOTEK CORP.<sup>TM</sup>) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, a amostra de RNA foi tratada com *RQ1 DNase* (PROMEGA), seguindo as instruções do fabricante. Para obtenção do cDNA foi utilizado o kit *ProtoScript<sup>®</sup> II First Strand cDNA Synthesis* (NEW ENGLAND BIOLABS<sup>®</sup> INC.) seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas em equipamento *QUBIT<sup>®</sup> 2.0 fluorometer* (INVITROGEN).

#### 5.4.3 Eficiência dos primers dos genes *oprL*, *algU*, *algD* e 16S por leitura em *qPCR*

Foram utilizadas para o teste de eficiência dos respectivos *primers* as amostras de DNA extraídas das cepas ATCC 27853 e da amostra isolada P15 para comparativo.

Estas amostras sofreram descongelamento lento sobre o gelo e foram mantidas a 50°C por cinco minutos em bloco de aquecimento. As amostras foram diluídas em 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000.

A montagem do *mix* para amplificação do DNA se deu com 10µl de *Go Taq<sup>®</sup> Sybr Green Master Mix* (PROMEGA), 0,5 µl de cada *primer* (10 uM) e 5µl de água *Nuclease Free*. Ao final, foram acrescentados 18µl do *mix* total e 2µl de amostra. A reação foi realizada com o programa térmico de 5 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C. Ao final da reação uma curva de dissociação é lida através da ciclagem 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 minuto, leitura a 1% até 95 °C por 30 s, 60 °C por 15 s. A leitura foi realizada no equipamento *Real Time 7500<sup>®</sup>* (*Applied Biosystems*, EUA) com o *7500*

*Software v2.0.6 (Applied Biosystems)*. Este equipamento foi utilizado para todas as leituras posteriores.

#### 5.4.4 Expressão dos genes *algU*, *algD*, *oprI* e 16S

Foram utilizadas as amostras classificadas em fortemente produtoras P15, P19, P23 e P36; e as de baixa produção de biofilme P22, P27, P29 e P31, além da amostra controle de ATCC27853. A montagem do mix total de 20µl manteve o padrão descrito anteriormente, seguindo as instruções do fabricante.

#### 5.4.5 Normalização das reações pelo gene 16S e por quantificação

Para a normalização com o gene 16S foram utilizadas as cepas utilizadas anteriormente citadas, cepa Padrão ATCC27853 e as classificadas em fortes e baixas produtoras.

A montagem do mix total de 20µl manteve o padrão descrito anteriormente, seguindo as instruções do fabricante.

Foram quantificados *DNA* e *RNA* das amostras nos equipamentos *QUBIT® 2.0 fluorometer* (INVITROGEN) e os dados obtidos foram utilizados estatisticamente para comparativo de normalização com os resultados do gene 16S.

#### 5.4.6 Análise estatística dos dados

Os dados de expressão gênica para os alvos *algD* e *algU* foram utilizados para o cálculo de análise estatística descritiva (média, mediana e desvio padrão) e para comparação entre as amostras fortes e fracas produtoras de biofilme normalizadas pelo gene 16S e quantificação no fluoróforo Qubit. Após a avaliação da distribuição dos dados, verificou-se que apresentavam comportamento não paramétrico, o que definiu o teste estatístico de Wilcoxon Pareado com intervalo de confiança de 95% para a realização da comparação referida acima. Foi adotado que a diferença entre a expressão dos genes *algD* e *algU* seria quando  $p < 0.05$ .

A análise de quantificação relativa obtida através da reação em cadeia pela polimerase (qPCR) foi calculada através do cálculo de regressão linear. Para tanto,  $y$  é o valor de  $C_t$ ,  $a$  é o valor do slope e  $b$  o valor do intercepto. Os valores de  $C_t$  foram anotados após a conclusão da reação e slope e intercepto da curva padrão. A partir desses dados, foi determinado que os resultados do padrão ATCC seria 100 e as demais amostras receberam valores proporcionais a esse controle.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Cepas isoladas e confirmação fenotípica

Foram isoladas e identificadas por provas físico-químicas 25 cepas de *P. aeruginosa*, conforme a **Tabela 2**. A seguir, a descrição do número da amostra isolada, em que diluição houve crescimento em placa, quais as características particulares da colônia macroscopicamente e em qual o ponto de coleta a amostra foi isolada.

**Tabela 2:** Características fenotípicas das colônias de *P. aeruginosa* isoladas e dados de amostragem.

AMOSTRA	DATA ISOLAMENTO	PONTO DE COLETA	DILUIÇÃO	CARACTERÍSTICAS DA COLÔNIA ISOLADA
1		ATCC produtora de biofilme 27853		
6	07/02/2017	Alcatra - Corte toaleta final	10°	Leitosa/ esverdeada, rugosa, achatada, irregular
15	11/04/2017	Piso da câmara de resfriamento	10°	Leitosa/esverdeada, rugosa, achatada, irregular
17	15/05/2017	Meia carcaça pré-resfriamento LG0187A L3 D	10°	Esverdeada, mucosa, achatada, circular
18	15/05/2017	Meia carcaça pré-resfriamento LG0187A L3 D	10 <sup>-1</sup>	Esverdeada, mucosa, achatada, circular
19	15/05/2017	Meia carcaça pré-resfriamento LG 0178A L2 D	10°	Esverdeada, rugosa, achatada, circular
20	15/05/2017	Meia carcaça pré-resfriamento LG	10 <sup>-1</sup>	Esverdeada, rugosa, achatada, circular

0178A L2 D				
21	15/05/2017	Parede da câmara de resfriamento	10°	Esverdeada, mucosa, achatada, circular
22	15/05/2017	Parede da câmara de resfriamento	10°	Esverdeada, mucosa, achatada, circular
23	15/05/2017	Parede da câmara de resfriamento	10°	Esverdeada, mucosa, achatada, circular
25	15/05/2017	Piso da câmara de resfriamento	10 <sup>-1</sup>	Esverdeada, rugosa, achatada, irregular
27	30/05/2017	Meia carcaça LG 0261 L 5 D	10°	Leitosa, mucosa, côncava, circular
28	30/05/2017	Meia carcaça LG 0261 L 5 D	10°	Leitosa, rugosa, achatada, irregular
29	30/05/2017	Piso da câmara de resfriamento	10°	Esverdeada, rugosa, achatada, circular
30	30/05/2017	Meia carcaça LG 0261A L5 T	10°	Leitosa, mucosa, achatada, circular
31	30/05/2017	Meia carcaça LG0254A L5 D	10°	Leitosa, mucosa, achatada, circular
32	30/05/2017	Parede da câmara de resfriamento	10°	Leitosa, rugosa, achatada, irregular
33	30/05/2017	Meia carcaça LG0254AL05 T	10°	Leitosa, mucosa, achatada, circular
34	30/05/2017	Parede da câmara de resfriamento	10°	Leitosa, mucosa, achatada, circular
35	30/05/2017	Meia carcaça LG0271AL05 T	10°	Leitosa, mucosa, achatada, circular
36	30/05/2017	Meia carcaça LG0271AL05 D	10°	Leitosa, mucosa, achatada, circular
37	31/05/2017	Alcatra LG0261L05	10°	Leitosa/ esverdeada, rugosa, achatada, irregular
38	31/05/2017	Alcatra LG0254AL05	10°	Leitosa/ esverdeada, rugosa, achatada, irregular
39	31/05/2017	Meia carcaça LG0254AL05 T	10°	Leitosa/ esverdeada, rugosa, achatada, irregular
40	31/05/2017	Esteira de refilê paleta/alcatra	10°	Leitosa/ esverdeada, rugosa, achatada, irregular
41	31/05/2017	Meia carcaça LG0261L05 D	10°	Leitosa/ esverdeada, mucosa, achatada, circular

Legenda: 10° - amostra pura

10<sup>-1</sup> – amostra diluída em 1:10

D: dianteiro

T: traseiro

As colônias isoladas apresentaram basicamente dois tipos de padrão macroscópico: (i) circulares, côncavas, mucosas, com pigmentação leitosa ou esverdeada, e (ii) disformes, achatadas, rugosas, com pigmentação leitosa ou esverdeada.

Quanto ao local de isolamento de amostras, os resultados mostraram que a contaminação de carcaças por *P. aeruginosa* foram predominantes em meias carcaças recém abatidas, na entrada das câmaras de resfriamento, sendo isoladas 11 amostras de meias carcaças anteriormente ao resfriamento. Em segundo lugar foram obtidos isolados das câmaras de resfriamento, sendo 8 amostras. Apenas 2 amostras foram isoladas de carcaças após o resfriamento, 3 amostras isoladas dos produtos de desossa e uma única amostra da esteira de refile.

As amostras isoladas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 25 foram isoladas em meias carcaças e câmara correspondente, na mesma data de coleta, o que correlaciona a entrada das meias carcaças e a contaminação da câmara.

As amostras 27, 28 e 41 demonstram que as meias carcaças que entraram para resfriamento mantiveram-se contaminadas após as 24h de resfriamento e a câmara de resfriamento também sofreu contaminação demonstrando pelos isolados 29 e 32.

A amostra 33 demonstra a entrada da carcaça contaminada, correlacionando novamente com os isolados 29 e 32 da câmara e observa-se quem mesmo após o resfriamento, foi isolado novamente do mesmo ponto, demonstrado pelo isolado 39. Mesmo após desossa e refile, os cortes desta peça mantiveram-se contaminados, demonstrados pelos isolados 37 e 38 e sugere-se que o isolado 40, da esteira de refile dos respectivos cortes tenha ocorrido devido a matéria prima contaminada.

As colônias isoladas foram confirmadas conforme **Tabela 3** pelos testes físico-químicos.

**Tabela 3:** Perfil físico-químico das cepas de *P. aeruginosa* isoladas

Amostra	TSI/24h	BHI 42°C/24h	OXIDASE	MOVIMENTO	PIGMENTO B
<b>ATCC27853</b>		(-)	(+)	(+)	(+)
<b>06</b>	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H <sub>2</sub> S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>15</b>	Glicose (-) Sac, Lac (+); Gás (-), H <sub>2</sub> S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)

17	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(+)
18	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
19	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
20	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
21	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
22	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(-)
23	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(+)
25	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
27	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(-)
28	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
29	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
30	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(-)
31	Glicose (+); Sac, Lac (+); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
32	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
33	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(-)	(+)	(+)
34	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(-)
35	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(+)
36	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(+)
37	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(+)
38	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(+)
39	Glicose (-); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
40	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(+)	(+)	(+)	(+)
41	Glicose (+); Sac, Lac (-); Gás (-); H2S (-)	(-)	(+)	(+)	(-)

## 6.2 Intensidade de produção de biofilme das cepas isoladas

Com relação a formação de biofilmes foram testadas as 19 amostras isoladas de *P. aeruginosa*, pois as amostras isoladas 17, 28, 34, 37, 39 e 40 não demonstraram mais crescimento em placa. A **Tabela 4** contém os resultados fenotípicos de produção de biofilme.

**Tabela 4:** Produção de Biofilme de *P. aeruginosa* em leitura de 570 nm, sendo os valores considerados para produção de biofilme acima de 0,1.

<b>Amostra</b>	<b>Média Produção Biofilme (QUadruplicata)</b>	<b>Valores indicativos para classificação (Stepanovic, et. al, 2000)</b>	<b>Classificação</b>
<b>B</b>	0,083		
<b>ATCC 27853</b>	2,450	0,332<2,450	FORTE
<b>6</b>	0,058	0,058≤0,083	NÃO PRODUTOR
<b>15</b>	1,248	0,0332<1,248	FORTE
<b>18</b>	0,060	0,060≤0,083	NÃO PRODUTOR
<b>19</b>	0,338	0,332<0,338	FORTE
<b>20</b>	0,273	0,166≤0,273≤0,332	MODERADO
<b>21</b>	0,023	0,023≤0,083	NÃO PRODUTOR
<b>22</b>	0,089	0,083≤0,089≤0,199	FRACO
<b>23</b>	1,025	0,332<1,025	FORTE
<b>25</b>	0,008	0,008≤0,083	NÃO PRODUTOR
<b>27</b>	0,099	0,083≤0,099≤0,166	FRACO
<b>29</b>	0,148	0,083≤0,148≤0,166	FRACO
<b>30</b>	0,176	0,166≤0,176≤0,332	MODERADO
<b>31</b>	0,161	0,083≤0,161≤0,166	FRACO
<b>32</b>	-0,006	-0,006<0,083	NÃO PRODUTOR
<b>33</b>	0,000	0,000<0,083	NÃO PRODUTOR
<b>35</b>	0,001	0,001<0,083	NÃO PRODUTOR
<b>36</b>	0,599	0,332<0,599	FORTE
<b>38</b>	0,079	0,079≤0,083	NÃO PRODUTOR
<b>41</b>	0,273	0,166≤0,273≤0,322	MODERADO

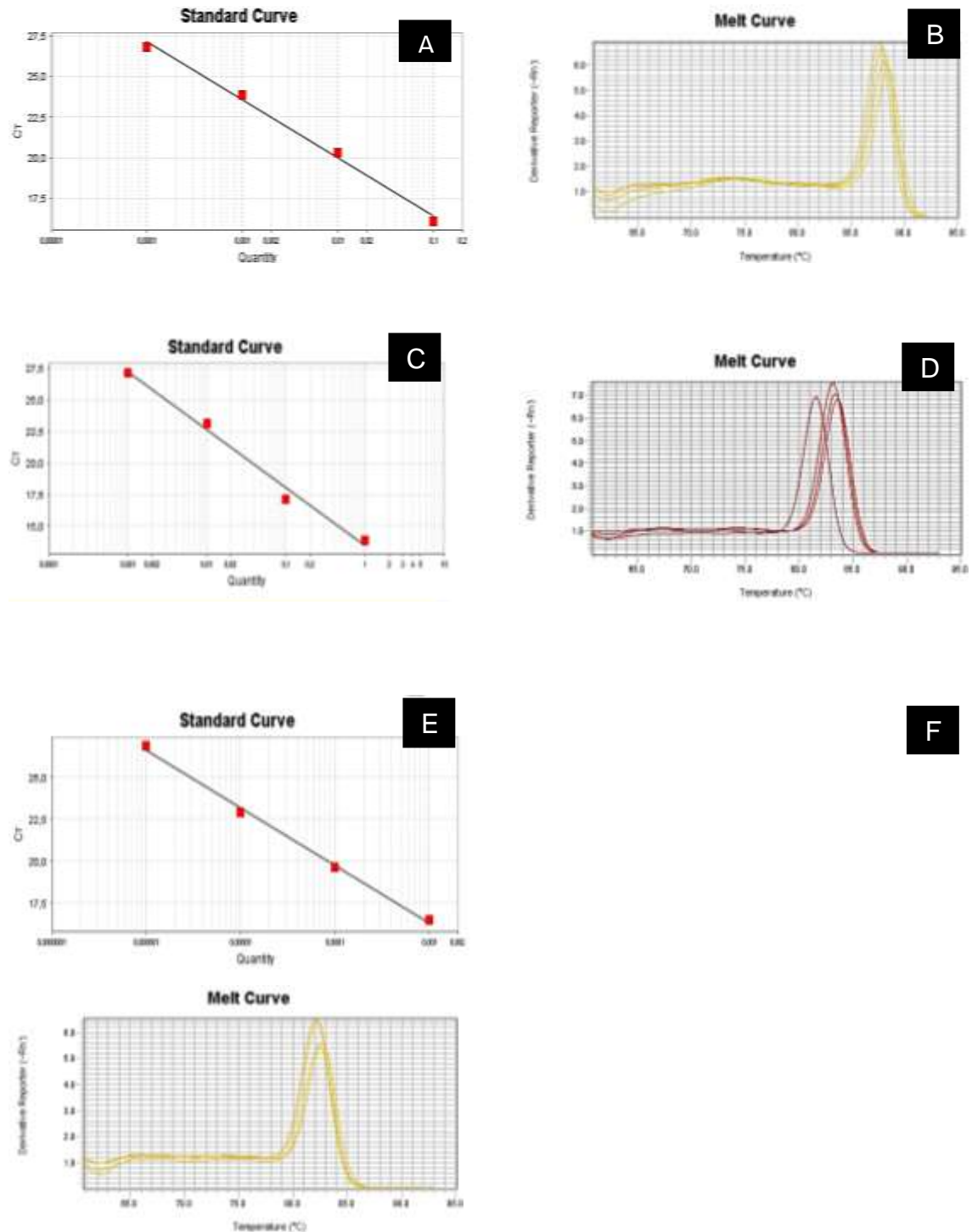
\* Valores de 2xD.O.c.: 0,166 e 4xD.O.c.: 0,322

Com os resultados das médias dos dados da espectrofotometria para cada amostra em quadruplicata, foram comparados os valores para definição da intensidade de produção de biofilme segundo Stepanovic et al (2000) onde, as amostras isoladas 15, 19, 23 e 36 demonstraram ter produção mais intensa de biofilme através da análise de espectrofotometria. As amostras 20, 30 e 41 demonstraram produção moderada. As amostras isoladas 22, 27, 29 e 31 resultaram valores indicativos de fraca produção e as amostras 06, 18, 21, 25, 32, 33, 35 e 38 não apresentaram valores indicativos de produção de biofilme.

Em relação ao total de amostras analisadas, 57,9% apresentaram formação de biofilme.

### 6.3 Eficiência dos primers oprL, 16S, algU e algD

A eficiência das reações com os alvos de expressão gênica, *algU* e *algD*, e o alvo normalizador 16S foram demonstrados através da curva padrão realizada individualmente para cada alvo (**Figura 3**).



**Figura 3:** Curva padrão para análise da eficiência dos genes (A) *algU*, (C) *algD* e (E) 16S. Curvas de dissociação (*melting*) para verificação da temperatura de *melting* e análise do produto amplificado dos genes (B) *algU*, (D) *algD* e (F) 16S.

Os qPCRs para expressão gênica foram padronizados de modo que a amplificação apresentasse Ct menor que 30. Os dados da curva padrão e os Cts obtidos podem ser observados nas **Tabelas 5 e 6**.

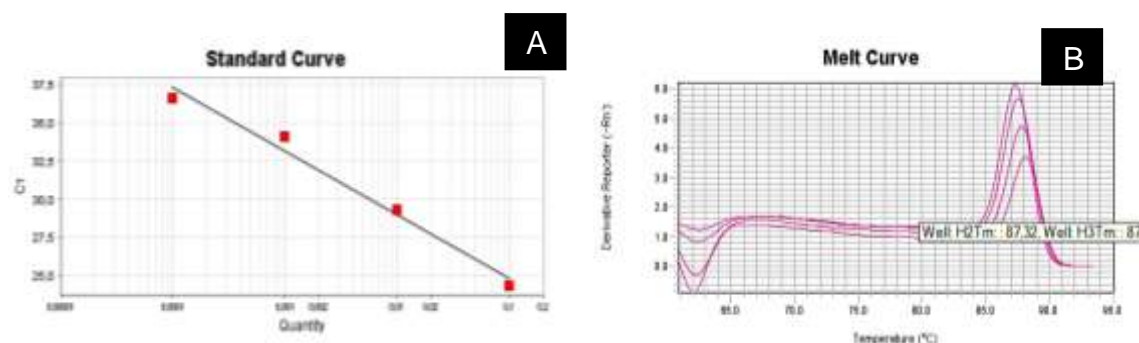
**Tabela 5:** Dados de eficiência obtidos a partir da curva padrão de cada alvo em análise de RT-qPCR.

Alvos	Slope	R <sup>2</sup>	Eficiência
<i>algU</i>	-3,583	0,994	90,143
<i>algD</i>	-4,594	0,988	65,082
16S	-3,45	0,997	94,931

**Tabela 6:** Valores de Ct e Temperatura de dissociação (*melting*) das reações com os genes *algU*, *algD* e 16S.

Diluição	Valores de Ct			Temperatura de <i>Melting</i>		
	<i>algU</i>	<i>algD</i>	16S	<i>algU</i>	<i>algD</i>	16S
Pura		13,86	16,47	81,6	82,08	
1:10	16,06	17,13	19,61	87,64	83,04	82,24
1:100	20,29	23,19	22,92	87,96	83,36	82,4
1:1000	23,84	27,15	26,86	88,12	83,52	82,72
1:10.000	26,83			88,45		82,78

Para o alvo *oprL*, a eficiência foi analisada a partir do DNA extraído da amostra P15 e analisado slope, eficiência e R<sup>2</sup> assim como nos genes para expressão gênica (**Figura 4**).



**Figura 4:** Curva padrão para análise da eficiência do gene *oprL* (A) e curvas de dissociação (*melting*) para verificação da temperatura de *melting* e análise do produto amplificado do gene *oprL* (B).

O alvo *oprL* não foi utilizado para expressão gênica, apenas como confirmação da presença da *P. aeruginosa*. Dessa forma, o limiar de detecção foi acertado juntamente com a presença de uma curva de dissociação (*melting*)

concordante com a do controle positivo (ATCC27853) e sua temperatura de *melting*. As tabelas a seguir descrevem os valores de eficiência obtidos através das reações de qPCR para o alvo oprL (**Tabelas 7 e 8**).

**Tabela 7:** Valores referentes a eficiência,  $R^2$  e slope da curva padrão produzida a partir das diluições de amostra de DNA da amostra P15.

<b>Alvo</b>	<b>Slope</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>Eficiência</b>
<b>oprL</b>	-4,152	0,981	74,11

**Tabela 8:** Valores de Ct e temperatura de *melting* durante a amplificação do alvo oprL com a amostra P15.

<b>Diluição</b>	<b>Valores de Ct</b>	<b>Temperatura de <i>Melting</i></b>
	<i>oprL</i>	<i>oprL</i>
<b>Pura</b>		
<b>1:10</b>	24,35	87,32
<b>1:100</b>	29,28	87,48
<b>1:1000</b>	34,07	87,8
<b>1:10.000</b>	36,59	88,12

Os valores de Ct obtidos durante a análise demonstram que, a partir da diluição de 1:100, as amostras tiveram amplificação tardia o que pode ser consequência da quantidade baixa de material disponível na amostra diluída ou ainda a degradação do DNA da amostra.

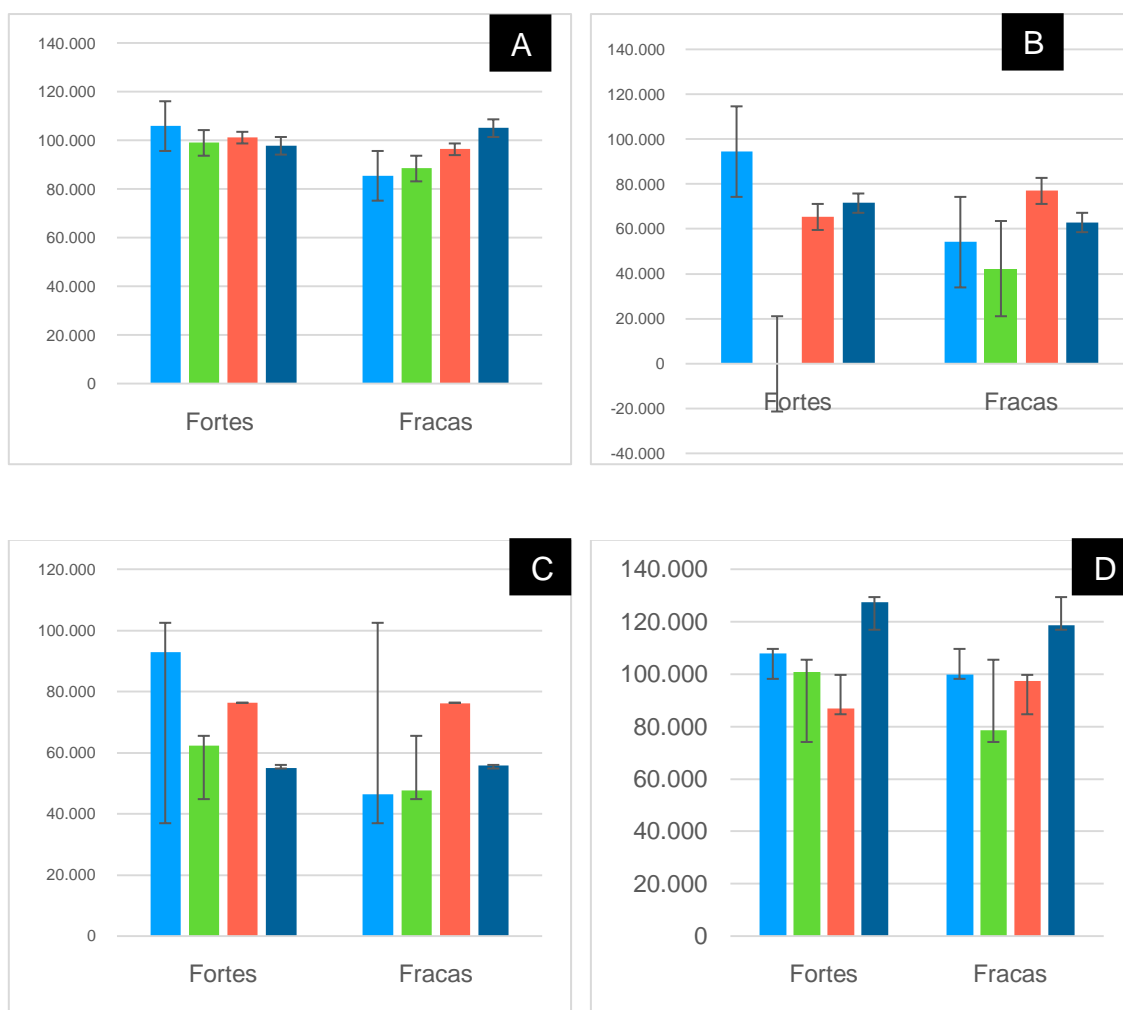
Todas as amostras foram analisadas com o alvo oprL para confirmação da espécie (**Tabela 9**). As amostras foram confirmadas, porém as amostras P19 e a P29 apresentaram um valor de Ct alto com uma curva de dissociação (*melting*) compatível com uma amostra positiva nas replicatas. Tal fato sugere a baixa quantidade de material da amostra, mas com a presença da bactéria. Todas as amostras possuíam a quantidade de 0,5 na escala de MC Farland.

**Tabela 9:** Valores de Ct e temperatura de *melting* demonstrando a amplificação do alvo oprL durante os ciclos da reação de qPCR com a amostra P15.

<b>Amostra</b>	<b>Alvo</b>
	<b>oprL</b>
<b>ATCC27853</b>	22,23
<b>15</b>	24,25
<b>19</b>	38,65
<b>22</b>	28,74
<b>23</b>	20,51
<b>27</b>	32,93
<b>29</b>	38,34
<b>31</b>	27,50

#### 6.4 Expressão gênica e análise estatística

A análise de expressão gênica foi realizada comparando os dados dos alvos com a normalização pelo 16S e pela quantificação do RNA total (obtida pelo fluorímetro Qubit). Os gráficos da expressão por gene mostram uma alta variação das amostras em cada grupo nas duas normalizações utilizadas (Figura 5).



**Figura 5:** Gráfico de expressão gênica dos genes (A) *algD* normalizado pelo gene 16S; (B) *algD* normalizado pelo QUIBIT; (C) *algU* normalizado pelo gene 16S; (D) *algU* normalizado pelo QUIBIT. O gráfico apresenta a normalização separada entre as fortes produtoras e fracas produtoras, demonstrando, através do desvio padrão que não há diferença significativa de expressão entre as duas classificações fenotípicas.

Mas as análises estatísticas demonstraram que os valores entre as amostras fortes e fracas, normalizadas pelos valores obtidos de 16S e pela quantificação do material (Qubit), não possuem diferença estatística quando avaliado com  $p < 0,05$  (**Tabela 10**).

**Tabela 10:** Valores do teste estatístico de Wilcoxon Pareado e valor de p da comparação da quantificação relativa para os genes algD e algU em relação as amostras obtidas no estudo.

Comparação	Wilcoxon	Valor de p <sup>1</sup>
algD por 16S	13	0,2
algD por Qubit	13	0,2
algU por 16S	13	0,2
algU por Qubit	11	0,48

<sup>1</sup> A diferença estatística adotada foi de  $p < 0.05$ .

Sendo assim, as análises demonstraram que não houve diferença significativa entre as expressões gênicas de biofilme, relacionadas aos alvos algU e algD, mesmo que a análise fenotípica tenha demonstrado que as cepas possuem diferença de produção, sendo classificadas em forte e fracas produtoras de biofilme.

## 7 DISCUSSÃO

Apesar de algumas cepas apresentarem mucosidade caracterizada macroscopicamente e nas colônias isoladas indicar que há maior produção de alginato fenotipicamente, a correlação da mucosidade com a intensidade de produção de biofilme não foi observada, visto que as amostras classificadas em fortes produtoras 15 e 19 apresentaram-se com aspecto seco e rugoso. LAILA e SANTOS (2016) apontam que a produção de alginato depende da virulência

da cepa no momento de formação do biofilme. O fornecedor da cepa ATCC® 27853<sup>TM</sup> descreve, ainda, que normalmente podem crescer dois tipos de colônias sendo o tipo predominante rugoso, áspero, baixo convexo com aproximadamente 2 mm de diâmetro, enquanto o tipo secundário é inteiro, brilhante, liso e pequeno.

O demonstrado nas coletas quanto ao local de maior achado de contaminação por *P. aeruginosa*, meias carcaças anteriormente ao resfriamento em câmara, é sugestivo de que a contaminação seja adquirida principalmente da microbiota animal, porém causada pela falha nos procedimentos de manipulação, possivelmente durante a esfolagem, o que pode ocasionar a contaminação das carcaças por micro-organismos presentes na pele e pelo dos animais. Como já citado, CASELANI (2010) e NESPOLO (2013) citam que a principal contaminação ocorre durante os procedimentos de abate, esfolagem e evisceração das carcaças, se estes procedimentos não forem devidamente executados.

O baixo número de isolados após o resfriamento sugere que a refrigeração das carcaças sob aspersão de água potável, ou seja, clorada em até 1 ppm, conforme Portaria de Consolidação nº 05/2017/ANVISA, possa inibir o crescimento das cepas ou até inviabilizá-las. MEYER (1994) refere que a ação do cloro sobre a matéria orgânica tem ação oxidativa, o que impede o funcionamento enzimático no micro-organismo. SOUZA e DANIEL (2005) demonstraram que apesar do consumo rápido de cloro residual livre em contato com a matéria orgânica, a constante presença deste sugere esse efeito. A tecnologia de aspersão de água para refrigeração de carcaças foi aprovada pela Resolução nº 02/2011/SDA/DIPOA, com o intuito de se diminuir as perdas durante o resfriamento de carcaças em câmaras devido a evaporação de água das carcaças. O matadouro-frigorífico implantou o sistema durante a coleta de amostras. Nesse processo, foi observado que as cepas demoraram mais de 48h para exibir o crescimento de colônias ou ainda não demonstraram crescimento.

A intensidade de produção de biofilme pelas cepas isoladas demonstrou que essa produção pode depender do meio em que se encontra, do estímulo para ativar essa virulência, e da própria virulência individual de cada cepa, não necessariamente correlacionando a produção com a capacidade de *P.*

*aeruginosa* produzirem biofilme. Em seu estudo, FERREIRA (2005) demonstrou que cepas ambientais dificilmente apresentaram alta produção de alginato, já que em infecção pulmonar de pacientes com fibrose cística este polissacarídeo teve produção exacerbada e, mesmo com a baixa produção de alginato, todas apresentam o sistema genético que codifica a produção deste tipo de polissacarídeo. Nos isolados dessa pesquisa, as cepas apresentaram comportamentos diferentes mesmo em meios semelhantes, o que sugere que o fator ambiental não foi o que determinou a virulência de cada cepa analisada. VITAL-LOPEZ, REIFMAN e WALLGYIST (2015) demonstraram que fontes de energia para a produção de metabólitos por *P. aeruginosa*, não necessariamente interferem na produção de biofilme, e que genes essenciais relacionados a essa produção também não são específicos, sugerindo assim que dados não-intuitivos podem ser encontrados a cada formação.

Em relação à confirmação genotípica da amostra, mesmo as amostras que apresentaram um valor de Ct desfavorável para o alvo oprL (maior que 36), foram confirmadas pois apresentavam curva de dissociação coincidente com as amostras positivas confirmadas e amplificaram para os genes algU e algD, que segundo Ferreira (2005) são específicos da espécie.

Nas análises de quantificação relativa para a expressão dos genes algD e algU, levando em consideração as amostras fortes e fracas produtoras de biofilme e a forma de normalização (16S e quantificação das amostras pelo Qubit), não houve diferença significativa, ou seja, independentemente do tipo de amostra e forma de normalização para os alvos pesquisados, não houve diferença quanto a sua expressão gênica.

Mesmo que a expressão gênica não tenha demonstrado diferença, fatores ambientais e diferentes estímulos estressantes às cepas podem ocasionar a produção fenotípica diferenciada de alginato. O sistema de alginato, por estar presente em todas as cepas de *P. aeruginosa*, deve desempenhar um papel importante na fisiologia e sobrevivência normais desse organismo na natureza, talvez como parte da resposta do organismo ao estresse ambiental. AlgU é um gene que desempenha um papel central nestes processos. O controle da atividade de AlgU é exercido por mucA e mucB (algN) e pode estar relacionado ao sensoriamento de condições ambientais adversas (DERETIC et al., 1994). Sobrepostas a este sistema, há mutações que inativam a mucA e aliviam a

algU do controle negativo, permitindo a expressão constitutiva de promotores como algD e a conversão da bactéria para mucóide (DERETIC et al., 1994). Dessa forma, a genética e virulência intrínseca da cepa podem se aliar a fatores ambientais. Assim, os isolados de *P. aeruginosa* mucóides podem ser mutantes selecionados in vivo com um sistema fechado em um estado de expressão de produção ou não produção de alginato, pois o gene algU seria um modulador para transcrição de algD que ativa modificação das células para mucóides.

## 8 COCCLUSÕES

Este estudo portanto demonstrou que a frequência de isolamento de *P. aeruginosa* em carcaças é alta, porém que com a metodologia de refrigeração aplicada a contaminação é drasticamente reduzida. Isolados de *P. aeruginosa* de carcaças e ambiente de processamento bovino apresentam diferentes comportamentos de produção de biofilme, mas geneticamente a expressão referente a produção de alginato não apresentou diferença significativa.

## 9 REFERÊNCIAS

ALCANTARA, M. et al. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.6, 2012. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/15>. Acesso em: 12/04/2017.

AMARAL, P.H. **Programas de Autocontrole em um matadouro-frigorífico de bovinos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Monografia para obtenção do Título de Engenheira de Alimentos. Porto Alegre, 2010

ANDREATTI FILHO, R.L. et al. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis* em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira**. V. 12, p. 115-119, 2011. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/3774>. Acesso em: 13/04/2018.

ANDRADE, H. V.; QUEIROZ, V.M. de. Importância das ferramentas da qualidade BPF/APPCC no controle dos perigos nos alimentos em um laticínio. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**. v. 1. Uberaba, 2011. Acesso em: 18/09/2016. Disponível em: <http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/view/342>

ATCC. *American Type Culture Collection*. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27583™). Acesso em: 20/05/2017. Disponível em: <https://www.atcc.org/~ps/27583.ashx.2017>. e <https://www.atcc.org/search?q=atcc%2027583&sort=relevancy>

BRASIL, **RDC N° 12, 02 DE JANEIRO DE 2001**. Aprova o Regulamento Técnico para sobre padrões microbiológicos para alimentos. Órgão Emissor: ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acesso em: 03/08/2016.

Disponível em:  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffdd-f6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffdd-f6-3767-4527-bfac-740a0400829b)

BRASIL, **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamentação da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e da Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, subordinada a uma inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, DF, 2017. Disponível em:  
[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm).  
Acesso em: 12/06/2017.

BRASIL, **Resolução nº 002 de 09 de agosto de 2011**. Aprova tecnologia do sistema de aspersão aplicado no processo de resfriamento de meias carcaças de bovídeos. Brasília, 2018. Disponível em:  
[http://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-2-2011\\_115355.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-2-2011_115355.html). Acesso em: 23/02/2018.

BRASIL, **Resolução nº 02/DIPOA de 09 de agosto de 2011**. Aprova tecnologia do sistema de aspersão aplicado no processo de resfriamento de meias-carcaças de bovídeos e o Anexo desta resolução. Brasília, 2011. Disponível em: [http://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-2-2011\\_115355.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-2-2011_115355.html). Acesso em: 23/02/2019.

BOUTIN, S. et.al. One time quantitative PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* to discriminate intermittent from chronic infection in cystic fibrosis. **Journal of Cystics Fibrosis**, v.17, p. 348-355, 2018. Disponível em: [https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993\(18\)30001-8/abstract](https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993(18)30001-8/abstract). Acesso em: 12/12/2018.

CAIXETA, D.S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes produzidos por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Repositório Institucional UFLA. Lavras, 2008. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/2267>. Acesso em: 26/06/2017.

CASELANI, K. **Avaliação dos controles microbiológicos e do programa de redução de patógenos no abate de bovinos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). UNESP. Jaboticabal, 2010. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/mvp/m/78343.pdf>. Acesso em: 13/05/2017.

COSTA, K.A.D., et al. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75-82, Juiz de Fora, 2016. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/viewFile/512/405>. Acesso em: 21/02/2017.

DERETIC, V. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to Mucoidy in Cystic Fibrosis: Environmental Stress and Regulation of Bacterial Virulence by Alternative Sigma Factors. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 2773-2780, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205429/>. Acesso em: 23/02/2019.

DOURAGHI, M. Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 55, ed. 2, p. 50-53. Jun, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4718328/> - Acesso em: 10/12/2017.

FERREIRA, L.L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Vigilância Sanitária. 2005. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8542>. Acesso em: 26/09/2018.

FORMIGONI, I. Posição do Brasil no mercado de Pecuária de corte mundial. Farmnews, 2019 Disponível em: <http://www.farmnews.com.br/mercado/mercado-de-pecuaria-de-corte-mundial>. Acesso em: 25/02/2019.

FUENTEFRIA, D. B., et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol.41, n.5, pp.470-473, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822008000500007&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822008000500007&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 15/10/2018.

GARCIA, K. C. de O. D. **Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies utilizadas na indústria de processamento e comercialização de frango de corte e derivados.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). UNESP. Botucatu, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/132128?locale-attribute=es>. Acesso em: 26/09/2017.

GIAOURIS, E. et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**. v.97, p. 298–309. Dublin, 2014.

GIAOURIS, E. et. al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v.6, artigo 841, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26347727>. Acesso em: 12/03/2018.

GIRARDELLO, R. Estudo da formação de biofilme por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção urinária. **Biblioteca Digital Brasileira de Dissertações e Teses**. Londrina, 2007. Disponível em: [http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UEL\\_4e6bc4c09b83c9e5cd6e77a2856f1f2a](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UEL_4e6bc4c09b83c9e5cd6e77a2856f1f2a). Acesso em: 26/12/2018.

GOBETTI, M. et al. Cell–cell communication in food related bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 120, ed. 1-2, p. 34–45. Torino, Itália, 2007.

GHOLAMI, S. et al. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. **Materials Science in Semiconductor Processing**. V. 32, p. 362-370, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.004>. Acesso em: 12/07/2017.

IDT. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer 3.1. Acesso: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. 2017.

KASNOWSKI, M.C. et al Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, 2010. Disponível em: [faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/.../fxPTiYWerLkT9Si\\_2013-6-25-16-32-0.pdf](faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/.../fxPTiYWerLkT9Si_2013-6-25-16-32-0.pdf). Acesso em: 11/07/2017.

KIEVIT, T.R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Environmental Microbiology**, v.11, p.279-288, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>. Acesso em: 12/04/2017.

KOSTAKI, M. et. al. Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. **US National Library of Medicine National Institute of Health Applied and Environmental Microbiology**. p. 2586-2595, 2012.

LAILA, H.J.E.A. e SANTOS, R.C.V. Aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde. V. 17, n. 1, p.125-144. Santa Maria, 2016. Acesso em: 16/05/2017. Disponível em: <https://www.periodicos.unifra.br/index.php/disciplinarumS/article/view/1914>

MASSON, G.C.I.H et al. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. Archives of

**Veterinary Science**, v.17, n.1, p.1-14, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287590053>. Acesso em: 25/04/2018.

NBCI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso em: 2017

NEVES, B.D. **Diferenças na expressão gênica de isolados de campo e de frigorífico de Salmonella resistente aos antimicrobianos e desinfetantes**. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Dissertação para obtenção Título de Mestre em Ciência Animal com ênfase em Biologia Molecular. Lages, 2014. Disponível em: [http://www.cav.udesc.br/arquivos/id\\_submenu/757/dissertacao\\_07\\_03\\_15.pdf](http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/757/dissertacao_07_03_15.pdf). Acesso em: 14/09/2018.

MATSUYAMA, B.Y., et al. Mechanistic insights into c-di-GMP–dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of National Academic Sciences of EUA**, v.113, p. E209-E218, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4720306/>. Acesso em: 13/11/2017.

MCCARTHY, N. As carnes mais consumidas em todo o mundo. **Revista eletrônica Forbes**, 2019. Disponível em: <https://forbes.uol.com.br/listas/2019/02/as-carnes-mais-consumidas-em-todo-o-mundo/>. Acesso em 25/02/2019.

MEYER, S.T. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, p.99-110. Rio de Janeiro, 1994. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v10n1/v10n1a11>. Acesso em: 21/01/2018.

NESPOLO, N.M. **Epidemiologia molecular de Escherichia coli patogênica em diversas etapas do abate bovino**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva). Jaboticabal, 2013.

OLIVEIRA, D.C.V. de. **Produção de biofilme por *Salmonella* sp. isolada de frango**. Dissertação (Mestrado em Biologia de parasitas e microorganismos). Botucatu, 2011. Disponível em: [http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga\\_me\\_2011\\_debora\\_oliveira.pdf](http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_me_2011_debora_oliveira.pdf). Acesso em: 12/04/2018.

RAMINI, K. et al. Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** p. 254– 263. Adiar, India, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22592059>. Acesso em: 19/08/2016.

REID S.D., BETTING D.J., WHITTAM T.S. **Molecular Detection and Identification of Intimin Alleles in Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR**. *Journal of Clinical Microbiology*. v.37, n.8, p.2719-2722, 1999.

RESENDE, J.G.O.S. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio**. Universidade Federal de Lavras – UFLA. Dissertação para a obtenção do título de Mestrado. Lavras, 2005. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/35927886\\_Formacao\\_de\\_biofilme\\_em\\_aco\\_inoxidavel\\_por\\_Pseudomonas\\_spp\\_e\\_seu\\_controle\\_por\\_peroxido\\_de\\_hidrogenio\\_e\\_dicloro\\_isocianurato\\_de\\_sodio](https://www.researchgate.net/publication/35927886_Formacao_de_biofilme_em_aco_inoxidavel_por_Pseudomonas_spp_e_seu_controle_por_peroxido_de_hidrogenio_e_dicloro_isocianurato_de_sodio). Acesso em: 12/07/2017.

SALES, M.L. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 4607-4616, 2014. Disponível em: <https://www.geneticsmr.com/articles/3274>. Acesso em: 16/09/2018.

SCHMIDT H., et al. **Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli***. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.3, p.701-705, 1995.

SCHULTSZ C., et al. **Detection of enterotoxigenic Escherichia coli in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR.** Journal of Clinical Microbiology, v.32, n.10, p.2393-2397, 1994.

SMITH, R.S., IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p.56-60, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403000080?via%3Dihub>. Acesso em: 23/04/2017.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli* e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, p. 111-117, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v10n2/a04v10n2.pdf>. Acesso em: 19/01/2019.

SREY, S. et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585. Jun. 2013. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/234405272\\_Biofilm\\_formation\\_in\\_food\\_industries\\_A\\_food\\_safety\\_concern](https://www.researchgate.net/publication/234405272_Biofilm_formation_in_food_industries_A_food_safety_concern). Acesso em: 15/09/2018.

STOCCO, C.W. Controle de qualidade microbiológico em frigorífico. **Revista Spacios**, v. 38, p. 9, 2017. Disponível em: <http://www.revistaespacios.com/a17v38n22/a17v38n21p09.pdf>. Acesso em: 12/09/2016.

TRENTIN, D. S. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **ResearchGate**, 2014. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/260544548\\_Biofilmes\\_bacterianos\\_patogonicos\\_Aspectos\\_gerais\\_importancia\\_clinica\\_e\\_estrategias\\_de\\_combate](https://www.researchgate.net/publication/260544548_Biofilmes_bacterianos_patogonicos_Aspectos_gerais_importancia_clinica_e_estrategias_de_combate). Acesso em: 11/07/2017.

VASUDEVAN, P., et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p.179–185, 2003.

VITAL-LOPEZ, F.G. et al. Biofilm Formation Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial metabolism. *PLOS Computational Biology* v.11, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4592021/>. Acesso em: 15/09/2018.

WANG, H., et al. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Control*, v. 32, p. 650-658. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.047>. Acesso em: 25/08/2018.

WINCKLER, M. G. G. **Implantação de Boas práticas de fabricação em matadouro- frigorífico do estado de Mato Grosso e Rondônia**. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2007.

ZHANG, Y. Models of *Pseudomonas* Growth Kinetics and Shelf Life in Chilled *Longissimus dorsi* Muscles of Beef. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, p. 713 – 722, 2011. Disponível em: <https://www.ajas.info/journal/view.php?number=22511> Acesso em: 23/09/2018.