

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/03/2021.

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 alginate, 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.

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 Engenharia 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

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.
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. 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. 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&lng=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. 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/analyser>. 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. 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. 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. 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. 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. 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_patogenicos_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.