

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E  
SENSIBILIDADE AO ÁCIDO PERACÉTICO POR *SALMONELLA*  
SPP. ISOLADA DE ABATEDOURO AVÍCOLA

RICARDO CAMPOS VIVIAN

BOTUCATU  
ABRIL DE 2014

RICARDO CAMPOS VIVIAN

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E SENSIBILIDADE AO ÁCIDO  
PERACÉTICO POR *SALMONELLA* SPP. ISOLADA DE ABATEDOURO AVÍCOLA

Dissertação apresentada  
ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, SP, como parte dos requisitos obrigatórios para  
obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e  
Segurança Alimentar

ORIENTADOR: PROF. ASS. DR. JOSÉ PAES DE ALMEIDA NOGUEIRA PINTO

BOTUCATU

ABRIL DE 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Vivian, Ricardo Campos.

Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola / Ricardo Campos Vivian. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Capes: 50505009

1. *Salmonella*. 2. Biofilme. 3. Ácido peracético. 4. Desinfecção e desinfetantes.

Palavras-chave: Ácido; Biofilme ; Peracético; *Salmonella*.

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E SENSIBILIDADE AO ÁCIDO PERACÉTICO POR  
*SALMONELLA* SPP. ISOLADA DE ABATEDOURO AVÍCOLA

RICARDO CAMPOS VIVIAN  
BOTUCATU, 03 DE ABRIL DE 2014

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto  
Orientador

---

Profa. Ass. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

---

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Este trabalho é dedicado à minha família e amigos  
que estão tão próximos de mim que já estão dentro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que foi generoso. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que me deram, em todos os momentos, a esperança para seguir em frente. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada. Dodô, você é o meu maior exemplo de companheirismo e determinação. E Oddie, pelas monstruosidades de cada dia.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas, sorrisos e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida. Faria tudo igual só para ter o privilégio de conhecê-los e tê-los em minha vida.

Ao meu orientador, Professor José Paes, companheiro de caminhada. Posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

À Professora Vera Rall pela confiança, amizade e por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. É um prazer tê-la na banca examinadora.

À UNESP, à FMVZ, ao IBB e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação acadêmica.

A local onde realizei minhas coletas, por ter me aberto às portas, mas que antes disso já havia me dado o broto daquilo que veio a ser esse trabalho. Em especial ao Samir, nossas conversas durante e para além dos turnos foram fundamentais.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

No meio do caminho tinha uma pedra.

Tinha uma pedra no meio do caminho.

Pulei a pedra e continuei o caminho.

Carlos Drummond de Andrade - modificado

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura 3D de um biofilme multi-espécie (XAVIER et al., 2008).....	11
FIGURA 2 - Presença do gene <i>adrA</i> em dez amostras de esteira de poliestireno.....	30
FIGURA 3 - Presença do gene <i>csgD</i> em dez amostras de esteira de poliestireno.....	30
FIGURA 4 - Perfil de produção de biofilme em diferentes materiais por <i>Salmonella</i> spp.....	33

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição da matriz do biofilme (SUTHERLAND, 2001).....	12
TABELA 2 – Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção dos genes produtores de biofilme nas cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	21
TABELA 3 - Número e percentual de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp. encontradas em função do período de abate em esteiras de poliestireno e lona, em um abatedouro avícola.....	27
TABELA 4 - Análise univariada dos fatores associados ao isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em amostras de abatedouro avícola.....	28
TABELA 5 – Chance de se encontrar uma amostra contaminada por <i>Salmonella</i> spp. em função de diferentes momento de coleta.....	28
TABELA 6 - Produção de biofilme por <i>Salmonella</i> spp. isolada de esteiras de abatedouro em diferentes materiais.....	34
TABELA 7 – Perfil de resistência de <i>Salmonella</i> spp. ao ácido peracético após a formação de biofilme.....	35

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
SUMÁRIO.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. CADEIA PRODUTIVA DO FRANGO E ASPECTOS DE SAÚDE PÚBLICA.....	4
2.2. MICROBIOTA DO FRANGO.....	6
2.3. SALMONELLA .....	6
2.3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MICRO-ORGANISMO.....	6
2.3.2. FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENIA DE SALMONELLA.....	9
2.4. BIOFILME.....	10
2.4.1. CONCEITOS.....	10
2.4.2. RELAÇÃO DO BIOFILME COM SALMONELLA .....	13
2.4.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BIOFILMES A AGENTES SANITIZANTES.....	14
2.4.4. BIOFILME E A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	15
2.4.5. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO BIOFILME.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS DAS ESTEIRAS PARA ANÁLISE.....	19
4.2. ISOLAMENTO DE SALMONELLA spp. (ANDREWS ET AL., 2001).....	20
4.3. PESQUISA DOS GENES PRODUTORES DE BIOFILME PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	20
4.3.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA.....	20
4.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO (PCR).....	21
4.3.3. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	22
4.4. VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	22
4.4.1. PREPARO DAS PLACAS.....	22
4.4.2. PREPARO DA CULTURA E INOCULAÇÃO NA PLACA.....	23
4.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	23
4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERICIDA DO ÁCIDO PERACÉTICO.....	24
4.5.1. MORTE BACTERIANA PELA AÇÃO DO ÁCIDO PERACÉTICO.....	24
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADA.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. ISOLAMENTO DO AGENTE.....	26
5.2. PESQUISA DES GENESENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA.....	29
5.3. PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	31
5.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERICIDA DO ÁCIDO PERACÉTICO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXO 1.....	50
ANEXO 2.....	66

## RESUMO

Apesar dos recentes avanços tecnológicos na indústria de alimentos, ainda se observa a ocorrência de inúmeras enfermidades de origem alimentar, devido à ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos, dentre eles os do gênero *Salmonella*. Dentre os produtos envolvidos em processos de contaminação por este agente, as carnes são as mais importantes, sendo a de aves o veículo em numerosos casos de infecções humanas. Além dos problemas em saúde pública, o micro-organismo causa grandes problemas devido à formação de biofilmes na indústria, sendo que esta ocorre em virtude da adesão dos micro-organismos em uma superfície de contato, a qual se fixam, constituem uma matriz de exopolissacarídeos e iniciam seu crescimento. Estes representam uma preocupação à indústria de alimentos por seu efeito como fonte de contaminação crônica, que aumenta as chances de veiculação do patógeno ao consumidor. Inúmeros são os fatores que condicionam o desenvolvimento do biofilme, entres eles o tipo de superfície e suas propriedades físico-químicas, já que as mesmas exercem influência direta sobre a adesão dos micro-organismos. Diversas medidas de controle para resolver o problema são empregadas na indústria, como o uso de sanitizantes, em destaque os à base de ácido peracético, que embora tenham o seu efeito sob células sésseis comprovado, a sua ação sob biofilmes ainda necessita de maior comprovação científica. Nesse sentido, os dados obtidos por este trabalho ratificaram a importância de *Salmonella* spp. como formadora de biofilme em diferentes superfícies, o que pode induzir a uma maior permanência destes micro-organismos no ambiente de processamento na indústria e, conseqüentemente, a uma maior chance de contaminação dos alimentos, com riscos ao consumidor. Nossos resultados também confirmaram que as propriedades físico-químicas da superfície dos diferentes materiais influenciaram diretamente na adesão dos micro-organismos, e, por conseqüência, no desenvolvimento do biofilme. De maneira simplificada, quanto maior a hidrofobicidade da superfície, maior a capacidade em promover o desenvolvimento do biofilme, tendo em vista que nos três materiais testados, foi na lona, o mais hidrofóbico, em que seu desenvolvimento foi mais observado, sendo que no poliestireno e no aço inoxidável os resultados mostraram-se menores. Das 59 cepas testadas, 34 (57,63%) foram capazes de produzir a matriz em pelo menos um dos materiais analisados. Nestes a lona se mostrou como o material mais eficiente em promover o crescimento da matriz pelo agente, com 34 (57,6%) das 59 cepas o fazendo, seguida do poliestireno, com 29 (49,1%), e por último do aço inoxidável, com 27 (45,8%) cepas formadoras de biofilme.

Quanto ao uso do ácido peracético, os resultados demonstraram que ele mostrou-se pouco eficiente no controle do biofilme, quando utilizado na concentração recomendada pelo fabricante e pelo órgão oficial competente. Isso porque das 34 cepas testadas, 15 (44,11%) foram sensíveis ao desinfetante (concentração de 0,2%), enquanto 19 (55,89%) foram resistentes. Nesse sentido, apenas quando a concentração foi elevada para 0,5% o desinfetante conseguiu um resultado completamente satisfatório, com todas as cepas sendo sensíveis.

Palavras-chave: *Salmonella*, biofilme, ácido peracético, esteira condutora de cortes de frango.

## ABSTRACT

Despite recent technological advances in the food industry, still observed the occurrence of numerous food borne illnesses due to ingestion of contaminated by pathogenic microorganisms, including members of the genus *Salmonella* spp. Among the products involved in processes of contamination by this agent, the steaks are the most important, being the vehicle of birds in numerous cases of human infections. In addition to problems in public health, the microorganism causes big problems due to the formation of biofilms in the industry, and this occurs because of the accession of microorganisms on a surface of contact, which are fixed, are an array of exopolysaccharides and begin their growth. These are a concern to the food industry for its effect as a source of chronic infection, which increases the chances of placement of the pathogen to the consumer. There are many factors that affect biofilm development, enters they the type of surface and its physicochemical properties, since they will directly influence the adhesion of microorganisms. Several control measures to solve the problem are employed in the industry, such as the use of sanitizers, featured in the peracetic acid, though they have proven their effect on sessile cells in biofilms its action still needs more scientific evidence. In this sense, the data obtained from this study confirm the importance of *Salmonella* spp. as forming biofilm on different surfaces, which can induce a greater permanence of these microorganisms in the processing environment in the industry and hence a greater chance of food contamination, with risks to the consumer. Our results also confirmed that the physicochemical surface properties of different materials directly influence the adhesion of microorganisms and, consequently, the development of the biofilm. In simple terms, the greater the hydrophobicity of the surface, the greater the ability to promote the development of the biofilm, in order that the three materials tested was the canvas, more hydrophobic , that further development was observed , while in polystyrene stainless steel and the results were smaller. Of the 59 strains tested, 34 (57,63%) were able to produce the matrix in at least one of the materials analyzed, these canvas proved to be the most efficient material to promote the growth of the matrix by the agent, with 34 (57,6%) of 59 strains doing so, then polystyrene , with 29 (49,1%) , and finally the stainless steel with 27 (45,8%) of biofilm forming strains.

Regarding the use of peracetic acid, the results showed that it proved ineffective in controlling biofilm when used at the concentration recommended by the manufacturer and by the official organ. This is because of the 34 tested, 15 strains (44,11%) were sensitive to the disinfectant (concentration 0,2%), while 19 (55,89 %) were resistant. In this sense, only when the

concentration was increased to 0,5% disinfectant achieved a completely satisfactory result, with all strains being sensitive.

Keywords : Salmonella, biofilm, peracetic acid, mat conductive broiler.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção avícola é um importante segmento do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior exportador mundial de carne de frango. A otimização dos fatores produtivos e a preocupação com a qualidade final do produto agregam valor e conquistam cada vez mais mercados (ABEF, 2014). De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), o Brasil é o terceiro produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, respectivamente. Em se tratando de exportações, porém, assume o primeiro lugar, seguido dos Estados Unidos e da União Europeia (ABEF, 2014).

A crescente produção de aves vem ao encontro das necessidades do mercado que, ao longo dos anos, aumentou a demanda por proteína animal. Este fato foi resultado de uma intensa propaganda do produto, da queda do seu preço para o consumidor final e das oscilações do mercado mundial de outras carnes (ABEF, 2014).

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O setor é representado por dezenas de milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras (ABEF, 2014).

A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica (ABEF, 2014).

Em 2011 a produção brasileira atingiu a marca histórica de 13, 058 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, com Estados Unidos e China. Desse total, cerca de 70% permanece no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país. O consumo per capita de carne de aves no Brasil está em aproximadamente 39 quilos por ano. Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2013 com a marca de 3,9 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países (ABEF, 2014).

Com esse desempenho, a carne de frango brasileira aumentou ainda mais sua presença na mesa dos consumidores no Brasil e no mundo (ABEF, 2014).

Paralelamente a esta maior produção e comercialização dos produtos avícolas, também ocorreu uma crescente necessidade, por parte dos órgãos competentes, em amparar e estabelecer normas e regras para que toda esta cadeia produtiva mantivesse rígidos padrões de qualidade, assegurando por consequência a qualidade do seu produto final.

Nesse sentido, o controle nas indústrias e estabelecimentos beneficiadores foi feito por meio da implementação das Boas Práticas de Fabricação e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC, que passou a ser exigido, no Brasil, pela Portaria nº46 de 10 de fevereiro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabeleceu as Normas Genéricas de Procedimentos para APPCC em Indústrias de Produtos de Origem Animal e pela Resolução nº326 de 30 de julho de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde que aprovou o Regulamento Técnico de Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos, ambas então visando estabelecer requisitos gerais e essenciais de higiene e boas práticas de fabricação para alimentos produzidos e fabricados para o consumo humano. (BRASIL, 1998; BRASIL, 1997).

Somada a esta legislação, destacam-se a Instrução Normativa (IN) nº70 de 10 de outubro de 2003 do MAPA, que instituiu o Programa de Redução de Patógenos e o Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus (BRASIL, 2003a); e a IN nº 78 de 03 de novembro de 2003 também do MAPA que por sua vez, aprovou as Normas Técnicas para o Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas Livres de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (BRASIL, 2003b).

Complementar a esta legislação há ainda a Portaria 1.428, de 02 de dezembro de 1993, do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993), aplicando-se também a todos os estabelecimentos que desenvolvam atividades relacionadas à alimentação. Esta portaria preconiza que produtores de gêneros alimentícios devem salvaguardar amostras de alimentos por 72 horas e estas devem estar à disposição das autoridades sanitárias para as eventuais análises laboratoriais necessárias, como na ocorrência de surtos (DDTHA, 2005).

A adoção de medidas de controle microbiológico teve como objetivo colocar no mercado alimentos que não oferecessem riscos à saúde dos consumidores. Isso porque, a ocorrência de surtos envolvendo alimentos, em destaque as carnes de aves, acarreta na não credibilidade da marca beneficiadora, gerando insegurança, quedas no consumo e perda de mercados (GOLAN, 2003).

Dados da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”, DTHA/CVE, da Secretaria de Estado da Saúde do estado de São Paulo, SES/SP, mostraram que no período de 1999 a 2003, cerca de 60% dos surtos de diarreia ocorridos no estado de São Paulo foram veiculados por alimentos (DDTHA, 2005).

Dentre os principais agentes envolvidos nas toxinfecções alimentares estiveram as enterobactérias, em especial as do gênero *Salmonella* (DDTHA, 2005). Os países em desenvolvimento são os que apresentam os maiores índices de infecções por este agente, devido à deficiência de saneamento básico, pobreza e superpopulação. Em áreas endêmicas, as salmoneloses são responsáveis por cinco por cento dos óbitos (EVEREST et al., 2001).

Segundo os mesmos dados da DTHA/CVE dos 459 surtos de diarreia com etiologia identificada, no mesmo período de 1999 a 2003, 325 (70,8%) foram causados por bactérias. Dentre os surtos por bactéria, 140 (43,1%) foram devido à *Salmonella* spp., envolvendo aproximadamente 3.001 pacientes. Estes dados ainda mostraram que dos 74 surtos por *Salmonella* com identificação do sorovar, 66 (89,2%) foram devido à *S. Enteritidis* (DDTHA, 2005).

Uma das causas reconhecidas como responsáveis pela contaminação de alimentos é a fixação das bactérias às superfícies de processamento, sendo que depois de fixadas, estas podem se transferir para o alimento ou para sua embalagem, conduzindo a contaminação do produto em diferentes fases de processamento (LEWIS, 2001). Essa ligação das células às superfícies de processamento pode ser o primeiro passo na formação de biofilmes (STEENACKERS et al., 2012).

Um biofilme pode ser genericamente definido como uma comunidade microbiana séssil caracterizada por células que estão ligadas a um substrato ou umas as outras, são incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, exibindo um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição genética (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Curiosamente, tem sido observado que a resistência das células do biofilme a sanitizantes é significativamente aumentada em comparação com o que é normalmente observado com as mesmas células quando planctônicas (GILBERT, ALLISON & MCBAIN, 2002; MAH & O'TOOLE, 2001; COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999). Assim, acredita-se que a formação do biofilme aumente a capacidade das bactérias em sobreviver às tensões que são comumente encontradas no processamento de alimentos, por exemplo, refrigeração, acidez, salinidade, e principalmente desinfecção (GIAOURIS, CHORIANOPOULOS & NYCHAS, 2012; BROOKS & FLINT, 2008; MORETRO & LANGSRUD, 2004), criando uma fonte persistente de micro-organismos, e por consequência, de contaminação. Como consequência, pode-se ter graves problemas de higiene e segurança e também perdas econômicas devido à deterioração precoce dos alimentos e redução do prazo de validade, pela presença em excesso desses micro-organismos (SHI & ZHU, 2009).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CADEIA PRODUTIVA DO FRANGO E ASPECTOS DE SAÚDE PÚBLICA

A produção de frango de corte tem impressionado pelo dinamismo e pela competência conquistados nas últimas décadas, com destaque para o Brasil, enquanto terceiro maior produtor de aves do mundo (USDA, 2013). Através da análise do desempenho da atividade avícola no Brasil, verificaram-se números surpreendentes, principalmente quando comparados aos de outras carnes. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), nos últimos dez anos (2003 a 2013), a produção de frango cresceu 146%, enquanto a de suínos, apenas 22% e a de bovinos 56,5% (FAO, 2013). O ganho de produtividade associado à coordenação da cadeia avícola colocaram o país como um dos mais eficientes produtores (ZILLI, 2003). Deste modo, com todos os avanços alcançados pela avicultura brasileira, juntamente com as relativas quedas nos custos e melhoria na qualidade do produto, o Brasil obteve uma maior inserção no mercado internacional, elevando-o como o maior exportador de carne de frango do mundo (USDA, 2013). Para FERNANDES & QUEIROZ (2003), outro fator de grande relevância para o aumento da produção brasileira de aves foi a implementação no início dos anos 60 do modelo de integração vertical.

Esse modelo permitiu que os produtores tivessem maiores rendimentos na produção, além de possuírem, dentro desse sistema, uma garantia de venda total do seu produto. Assim, as empresas integradoras aproveitaram o aumento da produção para elevar também as exportações brasileiras de carne de frango, já que era uma situação favorável para as vendas externas. Os autores ainda citaram que este sucesso também foi devido ao maior estímulo ao crescimento do setor agroexportador, resultado direto do dinamismo do comércio internacional e da expansão da capacidade tecnológica. A maior inserção dos produtos brasileiros em nível internacional demonstrou que existiam vantagens competitivas frente aos maiores produtores (FERNANDES & QUEIROZ, 2003).

Porém, o desenvolvimento tecnológico necessário para esse desenvolvimento, como o incremento da criação artificial dos animais que requer temperatura, aeração e umidade controladas, favoreceu também a multiplicação de micro-organismos. Além disso, o aumento e a concentração populacional de aves podem desencadear condições propícias à infecção, instalação e à propagação de agentes patogênicos. Assim, quando um controle adequado não

é implantado e mantido de maneira sistemática e rigorosa, muitas bactérias podem causar problemas na avicultura, desde a granja até o abatedouro (SALLES, 2007).

Quanto ao processo de abate desses animais, na maioria das plantas de processamento, a manipulação das carcaças bem como as próprias atividades de abate destes animais podem acabar por aumentar a microbiota contaminante, tendo em vista as inúmeras fontes de contaminação dentro da unidade de abate e processamento (GIORDANO, 2004). Desta forma, mais uma vez, quando os devidos cuidados não são observados, como aqueles relacionados aos Programas de Boas Práticas de Fabricação e Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle, as plantas de processamento de aves também podem favorecer a sobrevivência e transmissão de bactérias comensais levando à deterioração e, potencialmente, também a transmissão de bactérias patogênicas (HUYS et al., 2005).

Baseado nessa situação, se no passado a principal motivação do controle das infecções por *Salmonella* spp. em aves era reduzir as perdas decorrentes da doença clínica nos animais, atualmente, sua implicação na saúde pública tornou a prevenção da salmonelose uma realidade preocupante para toda a avicultura, tendo em vista que a principal via de contaminação humana é através do consumo de produtos avícolas (BETANCOR et al., 2005), em especial as carnes e derivados (SILVA & DUARTE, 2002).

Essa mudança de foco se deu pelo fato do agente ser uma bactéria responsável por graves infecções alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (TESSARI et al., 2003). A sua presença em alimentos é um relevante problema de saúde pública que não deve ser tolerado nos países desenvolvidos, e, principalmente, nos países em desenvolvimento, porque os sinais e sintomas podem ser mal diagnosticados, sobrecarregando ainda mais todo o sistema de saúde. A salmonelose é uma das principais zoonoses em todo o mundo (LOURENÇO et al., 2004), caracterizando-se por sua endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade de adoção de medidas de controle (GUERIN et al., 2005). Além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção na população humana, o controle desta doença é de grande interesse para a economia dos países em que ocorrem os surtos (TAITT et al., 2004).

Outro complicador dessa situação é o fato de que a maioria dos quadros transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado, fazendo com que a ocorrência da enfermidade na população humana seja extremamente subestimada (SANTOS et al., 2002). Vale salientar que a subnotificação é uma realidade mundial (ICMSF, 2002).

## 2.2. MICROBIOTA DO FRANGO

Na carne de aves diversos micro-organismos já foram detectados, entre eles os do grupo de deteriorantes, como como *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Shewanella putrefacins*, *Lactobacillos* sp. e *Brochothrix thermosphacta* (SILVA et al., 2001).

Entretanto, o grupo mais importante é sem dúvida o das bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (SILVA et al., 2001).

A microbiota da ave viva se encontra essencialmente na superfície externa, espaço interdigital, tegumentos cutâneos, no trato digestivo e, em menor grau, no aparelho respiratório. A contaminação se dá inicialmente pela retenção das bactérias numa camada líquida sobre a pele, a qual vai permitir que os micro-organismos possam se aderir convenientemente (SILVA, 1998). O tipo e o número de micro-organismos presentes na carne refletem o grau de higiene do abatedouro, como também as condições de armazenamento após o abate dos animais (SILVA et al., 2001).

## 2.3. SALMONELLA

### 2.3.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MICRO-ORGANISMO

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. estão amplamente distribuídas na natureza (VARNAM & EVANS, 1991). Estão presentes em um grande número de espécies animais, principalmente nas aves e nos suínos, sendo patogênica para humanos e muitas outras espécies animais (HOLT et al., 1994).

O gênero compreende bacilos Gram-negativos, compondo um dos grupos mais complexos da família Enterobacteriaceae, com mais de 2.610 sorovares (ISO, 2011).

Segundo POPOFF et al. (1997), o gênero *Salmonella* consiste somente de duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica*

subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*.

A classificação e a nomenclatura dessas bactérias sofreram modificações nos últimos anos e, atualmente, são baseadas em estudos moleculares. Do total de 2.610 sorovares do gênero *Salmonella*, 2.588 pertencem à *S. enterica* e 22 à *S. bongori*. Dentre os sorovares presentes em *S. enterica* 59,87% são da subespécie *enterica*. Dentre as salmoneloses humanas e animais, 99,5% são atribuídas à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (WEILL et al., 2007).

A designação dos sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* está relacionada com o local geográfico em que foi isolada pela primeira vez e seus sorovares não são mais escritos em itálico e têm sua primeira letra maiúscula, por exemplo, Enteritidis, Newport e Dublin. Para as demais, a nomenclatura segue o esquema de Kauffmann-White, que tem por base a composição antigênica das bactérias do gênero com relação aos seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (OLIVEIRA, 2000). Os diferentes antígenos de *Salmonella* spp. são identificados por meio de testes de imunoaglutinação com o emprego de anti-soros, preparados em coelhos, e cuja apresentação comercial se dá na forma de plasma liofilizado (TRABULSI et al., 2005).

Os antígenos O são designados através de números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* spp., sendo comum a vários sorovares. Segundo GORZYNSKI (1997), o polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), presente na camada peptidoglicana, é o principal antígeno de superfície dessas bactérias e sua especificidade antigênica deve-se a unidades repetidas de açúcares (tri, tetra ou pentassacarídeos); quanto ao antígeno Vi, este está presente apenas no sorotipo Typhi.

Já os antígenos flagelares (H) podem ocorrer em duas fases (1 e 2) e são designados por letras minúsculas. Como seu número é maior do que a quantidade de letras do alfabeto, a letra z é utilizada com indicadores numéricos (z1, z2, z3). A diferenciação entre as fases 1 e 2 ocorre quando uma célula de *Salmonella* spp. possuidora de um determinado antígeno flagelar se multiplica e dá origem a um clone que expressa outro antígeno flagelar. Os antígenos de fase 1 (ou específica) caracterizam alguns sorovares e aqueles de fase 2 são comuns a vários sorovares. Essa informação constitui um dos atributos utilizados para classificar *Salmonella* spp. (CAMPOS, 2005).

Estes micro-organismos não são produtores de esporos, anaeróbios facultativos, quimiotróficos, apresentam metabolismo tanto respiratório quanto fermentativo, têm a capacidade de reduzir nitratos a nitritos, fermentam glicose e geralmente não fermentam a lactose ou o fazem lentamente. E a maioria é móvel, através de flagelos peritíquios, com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum (ISO, 2011).

Produzem ácido e frequentemente gás a partir da fermentação da glicose e outros carboidratos, com exceção da *Salmonella* Typhi. São indol negativas, produtoras de ácido sulfídrico e são capazes de utilizar o citrato como única via metabólica (ISO, 2011).

O teste da lisina descarboxilase pode ser utilizado para distinguir espécies de *Salmonella* do gênero *Proteus*, que não apresenta essa enzima (QUINN et al., 2005). A uréia não é hidrolisada pelo gênero *Salmonella*, característica que também é utilizada na distinção de *Proteus* sp. (HOLT et al., 1994).

O crescimento de *Salmonella* spp. pode ser evitado se o alimento for mantido sob-refrigeração abaixo de 5°C. A temperatura ótima de crescimento do micro-organismo está na faixa de 35-43°C e a máxima é de até 49,5°C. Assim, alimentos quentes devem ser mantidos acima dessa temperatura e, embora 55°C já seja uma temperatura segura, 63°C é a recomendada em regulamentações (ICMSF, 1996). A habilidade de crescer em temperaturas abaixo de 7°C depende do sorovar envolvido. Cepas de *Salmonella* Typhimurium são capazes de crescer em temperaturas entre 5 e 6°C e as de *S. Agona*, abaixo de 6°C (VARNAM & EVANS, 1991).

Em relação aos fatores intrínsecos de um alimento, a atividade de água ( $A_w$ ) pode afetar o crescimento de *Salmonella* spp., sendo seu valor mínimo igual a 0,94 e o ótimo de 0,99. Esse micro-organismo pode viver um ano ou mais em alimentos com baixa  $A_w$ , como chocolate, pimenta e gelatina (ICMSF, 1996). Em relação ao pH, o valor mínimo para o crescimento é 3,8 e o máximo, 9,5, sendo o ótimo entre 7 e 7,5 (ICMSF, 1996). Os micro-organismos desse gênero têm ainda como característica serem resistentes à dessecação, ao congelamento e podem sobreviver por mais de nove meses em solos úmidos e protegidos da luz (DARWIN & MILLER, 1999).

Quanto ao alimento veiculador do patógeno, surtos de infecção alimentar causados por *Salmonella* spp. são conhecidos envolvendo os mais variados tipos, verificando-se, no entanto, que a carne de aves é a mais frequentemente envolvida (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* spp. presente na carne variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças. Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos, a carne de frango ainda é passível de contaminação bacteriana, especialmente por micro-organismos do gênero *Salmonella* que se encontram albergados no seu trato intestinal, podendo contaminar as carcaças bem como outros produtos caso o processo de abate não seja realizado com cuidados higiênicos (SALLES, 2007).

### 2.3.2. FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENIA DE SALMONELLA

A transmissão de *Salmonella* spp. ocorre, usualmente, pela via oral. Há também suspeitas de infecção via membranas mucosas, conjuntivas e pelo trato respiratório superior. A ocorrência da doença entérica se dá com a colonização do intestino delgado distal e início do cólon. Desequilíbrios da microbiota intestinal e peristaltismo reduzido são alguns dos fatores que colaboram para a colonização pelo patógeno (QUINN, 1994).

A capacidade de um micro-organismo obter sucesso na invasão de seus hospedeiros está diretamente relacionada aos seus fatores de virulência. Dentre estes, estão as fímbrias, as proteínas efetoras, os lipopolissacarídeos (LPS) e os antígenos de superfície. As fímbrias estão associadas à adesão em diferentes células epiteliais e possivelmente, à matriz celular, fato que facilita a entrada e permanência das bactérias no organismo alvo e as proteínas de superfície estão associadas à colonização do ceco e à excreção prolongada de *Salmonella* spp. nas fezes (TRABULSI et al., 2005).

A patogênese de *Salmonella* spp. está diretamente relacionada com a translocação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica e com a consequente alteração das funções celulares (SANO et al., 2007). *S. enterica* expressa pelo menos dois tipos de sistemas de secreção de proteínas do tipo III e que estão localizadas em ilhas de patogenicidade designadas por SPI-1 e SPI-2. Tais sistemas possuem funções diferenciadas no ciclo patogênico, a expressão de SPI-1 é necessária para iniciar a infecção do epitélio intestinal e a SPI-2 assume importância no estabelecimento da infecção sistêmica (SANTOS et al., 2007).

O sistema de secreção do tipo III é composto por um complexo de 20 proteínas que formam um canal na membrana da célula hospedeira. Uma vez formado, permite a exportação de outras proteínas, incluindo aquelas destinadas à captação da bactéria pela célula hospedeira (TRABULSI et al., 2005). A interação de *Salmonella* spp. com a célula hospedeira induz uma gama de respostas celulares, dentre elas um rearranjo profuso do cito esqueleto de actina, o qual leva à interiorização da bactéria. Outra reação provocada na célula é a produção de citocinas da resposta inflamatória, associadas à inflamação intestinal, diarreia e, nos casos crônicos, formação de fibrose com prejuízo da absorção (ZHOU & GALAN, 2001).

## 2.4. BIOFILME

### 2.4.1. CONCEITOS

A maior parte da atividade microbiana na natureza ocorre, não com as células individualizadas crescendo de maneira planctônica, livres, em suspensão, mas com os micro-organismos organizados em comunidades de diferentes graus de complexidade, associados a diversas superfícies, geralmente compondo um biofilme (IST, 2008). Dos micro-organismos frequentemente encontrados em um biofilme, as bactérias são o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução e a grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares são as principais características que as fazem organismos com grandes capacidades de produção de biofilme (NITSCHKE, 2006).

Em ambientes naturais, 95% a 99% dos micro-organismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento (PENG et al., 2002). Desta forma, a forma de vida bacteriana livre ou planctônica pode ser observada, simplesmente, como um mecanismo de translocação entre superfícies (WATNICK & KOLTER, 2000).

O biofilme é constituído por células aderidas a uma superfície, inerte ou viva, e embebidas numa matriz de exopolissacarídeo (IST, 2008). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (KYAW, 2008). Dessa forma, constituem um aspecto fundamental da ecologia e biologia bacteriana (WONG & O'TOOLE, 2011).

Do ponto de vista da segurança alimentar e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada em sua remoção. Se formados em materiais da linha de produção da indústria de alimentos, podem indiretamente acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria (FLACH et al., 2005).

Os micro-organismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (OLIVEIRA et. al., 2007). Quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos, o biofilme está estabelecido (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994). Dessa forma, biofilmes são definidos como formas de existência microbiana espacial e metabolicamente estruturadas em comunidades

embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007) e se caracterizam por células que exibem um fenótipo alterado quanto ao seu crescimento, expressão gênica e produção de proteínas (DONLAN & COSTERTON, 2002). As bactérias do biofilme possuem a mesma origem genética das bactérias planctônicas, entretanto, suas atividades bioquímicas diferem em 40%, o que as torna mais difíceis de serem eliminadas, pela maior resistência adquirida (MEDONLINE,2008).

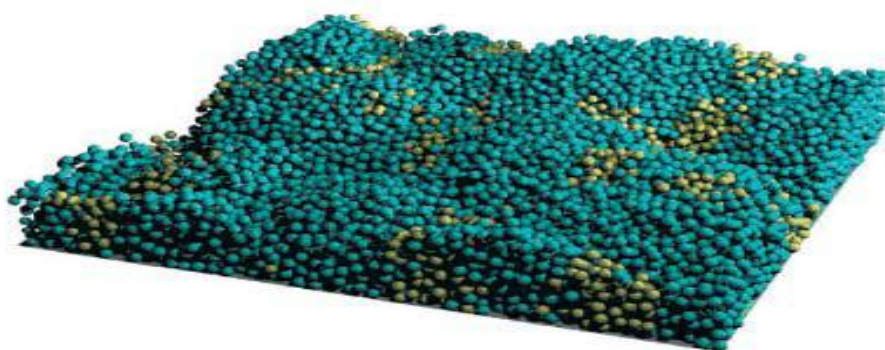


FIGURA 1 - Estrutura 3D de um biofilme multi-espécie (XAVIER et al., 2008)

CAIAZZA & O'TOOLE (2004) sugeriram que as bactérias, em resposta às mudanças das condições ambientais são capazes de alternar entre um estado de vida livre, virulenta e um estado aderido, menos virulento. Outros estudos indicaram que essa mudança de estado de vida livre para o modo de biofilme coincide com uma mudança no metabolismo (WHITE et al., 2010; HAMILTON et al., 2009).

Biofilmes microbianos podem existir como agregados mais ou menos confluentes, em camadas únicas ou arquiteturas tridimensionais. Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem o fluxo de líquido e gases, a dispersão de nutrientes e o descarte de componentes (STOODLEY et al., 2002). No que diz respeito à composição, observa-se que água é a fração mais significativa, podendo chegar a 97% da matriz do biofilme. Os micro-organismos, por sua vez, representam somente pequena parte, frequentemente 2 a 5% da matriz do biofilme, embora excretem substâncias poliméricas que predominam na matéria orgânica da massa seca do biofilme, como pode ser observado na Tabela 1. A matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana é responsável pela morfologia,

estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Ainda que haja a predominância de polissacarídeos em sua composição, esta também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos (SUTHERLAND, 2001).

TABELA 1 - Composição da matriz do biofilme (SUTHERLAND, 2001)

Componente	% na matriz
Água	até 97%
Células microbianas	2-5%
Polissacarídeos (homo e heteropolissacarídeos)	1-2%
Proteínas (incluindo enzimas)	< 1-2%
DNA e RNA	< 1-2%
Íons	Livre

Os fatores que condicionam a produção, desenvolvimento e manutenção desse biofilme são diversos, entre os quais se destacam o pH, a temperatura, o tipo de material e a rugosidade da superfície, a força iônica do meio, a velocidade e turbulência do fluido, a concentração de nutrientes do meio, as características dos micro-organismos presentes no meio, e ainda a presença de material particulado, de micronutrientes e de agentes antimicrobianos. Isso porque diferentes sinais ambientais vão gerar diferentes respostas nas regulações gênicas das bactérias e desta maneira no comportamento dos biofilmes (GUINEY, 1997).

#### 2.4.2. RELAÇÃO DO BIOFILME COM SALMONELLA

No que diz respeito à *Salmonella*., esse gênero é capaz de formar biofilmes de maneira bastante significativa e o faz em diferentes tipos de materiais, abióticos, entre eles, plástico, borracha, vidro e aço inoxidável, ou bióticos, como plantas, células epiteliais, cálculos biliares, uma habilidade que contribui para a sua resistência e persistência em ambos os ambientes de acolhimento (STEENACKERS et al., 2012). Biofilmes formados por *Salmonella* spp. em equipamentos e superfícies de processamento de alimentos servem como um reservatório persistente de contaminação, comprometendo a segurança alimentar e a saúde humana (VAN HOUTT & MICHELS, 2010).

Nesse contexto, destaca-se o fato de que assim como outras bactérias patogênicas, *Salmonella* spp. possuem fímbrias, que consistem em apêndices de membrana mais curtos que os flagelos. São compostas por apenas uma proteína estrutural, a pilina, dispostas de maneira helicoidal na superfície das bactérias Gram-negativas (TORTORA et al., 2000). Segundo SAUER & CAMPER(2001), as fímbrias e estruturas associadas têm se mostrado importantes na adesão e colonização de superfícies, sendo importantes na interação bactéria-hospedeiro, na persistência ambiental, na formação de biofilmes e colonização e invasão de células (GIBSON et al., 2007). Tais estruturas possuem resíduos hidrofóbicos de aminoácidos (ROSENBERG & KJELLEBERG, 1986), contribuindo para a hidrofobicidade da célula bacteriana com as superfícies e auxiliando ainda mais na agregação de novas bactérias. A principal função das fímbrias é superar a barreira de repulsão eletrostática inicial que existe entre uma célula e o substrato (CORPE, 1980).

HAMILTON et al. (2009) estudaram os perfis transcriptômico e proteômico de biofilmes de *Salmonella* spp.. Vários genes e proteínas envolvidas na fixação bacteriana, motilidade, detecção e resposta a disponibilidade de oxigênio, regulação gênica global, transporte e resposta ao estresse foram encontrados sendo diferentemente expressos em biofilmes quando comparados às células planctônicas. Curiosamente, também vários genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos mostraram-se diferentemente expressos (HAMILTON et al., 2009). Nesse contexto, dois genes têm papel de destaque, o *csgD* e o *adrA*.

O primeiro regula uma série de outros genes envolvidos na formação de biofilme por *Salmonella* spp. (GIBSON et al., 2006). Esse processo ocorre devido à sua principal função, que é, além da regulação das fímbrias, a ativação da produção de celulose, o que resulta na formação de uma matriz extracelular espessa (ZOGAJ et al., 2000). O gene *csgD* estimula a produção de celulose indiretamente, através da ativação da transcrição do gene *adrA*, que por

sua vez, estimula a produção de uma proteína homônima, que afeta positivamente a atividade enzimática da maquinaria biosintética da celulose. A co-expressão dos dois componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* spp. leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica com células compactadas, alinhadas formando uma matriz rígida (ZOGAJ et al., 2000).

#### 2.4.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BIOFILMES A AGENTES SANITIZANTES

Mecanismos de resistência proporcionam às células sésseis condições favoráveis de sobrevivência, o que as torna menos suscetíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos micro-organismos sob a forma planctônica (MORCK et al., 2001). Vários fatores têm sido sugeridos para explicar a resistência de biofilmes a agentes sanitizantes; bactérias em biofilmes, particularmente aquelas presentes nas camadas mais internas, apresentam taxas metabólicas e de crescimento reduzidas; a matriz de polímeros extracelulares age como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme; adicionalmente, a matriz de substâncias poliméricas extracelulares pode reduzir fisicamente a penetração do agente sanitizante; e células em biofilme são fisiologicamente distintas de células planctônicas e expressam fatores de proteção específicos, tais como bombas de efluxo e regulons (GILBERT et al., 2002). Além de limitar a difusão de sanitizantes, a matriz de exopolissacarídeos pode reagir e causar a inativação dos mesmos (VIDAL et al., 1997), pois se sabe que alguns sanitizantes químicos podem ter sua ação reduzida ou mesmo eliminada na presença de compostos orgânicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos. A aplicação incorreta de detergentes e sanitizantes pode também ser responsável pela aquisição da resistência. Isso está relacionado à utilização de doses subletais aplicadas em células em biofilmes (GILBERT et al., 2002).

A densidade bacteriana no interior do biofilme é outro fator que parece estar envolvido no aumento da resistência. Além disso, biofilmes formados por diferentes espécies, como os que são encontrados nas indústrias de alimentos, representam um maior risco, uma vez que estas podem proteger umas às outras durante a aplicação de agentes químicos. Esse fato é causado pela diferente resistência de uma respectiva espécie microbiana contra os agentes utilizados (VIDAL et al., 1997).

#### 2.4.4. BIOFILME E A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Na indústria de alimentos, os biofilmes podem se acumular em uma variedade de substratos como, por exemplo, aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, poliestireno, policarbonato, entre outros (PARIZZI et al., 2004).

Uma vez instalados, sabe-se que, caso não haja implantação de sistemas de qualidade nas indústrias alimentícias e aplicação efetiva de agentes de limpeza e sanitizantes, os micro-organismos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos (OLIVEIRA et al., 2010).

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação aos alimentos (PARIZZI et al., 2004). Sob determinadas condições, os micro-organismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular (MACEDO, 2006). Na linha de produção da indústria, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos, devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Dessa forma, constitui risco a saúde do consumidor (FLACH et al., 2005).

Alguns especialistas sugerem que a maioria dos surtos, cujos agentes etiológicos são transmitidos por alimentos, parece estar associada a biofilmes e justificam tal teoria com o fato dos surtos serem esporádicos, e não contínuos, assim como somente algumas porções dos produtos estarem contaminadas (ZOTTOLA, 2001).

Em relação à saúde pública, além do perigo de transmissão de agentes patogênicos ao consumidor, convém ressaltar que em um biofilme as bactérias são muito mais resistentes a um agente sanitizante, quando comparadas às mesmas células planctônicas (KYAW, 2008). É um senso comum que cada vez mais, o aumento da resistência gera um grande impacto negativo em várias atividades, principalmente as ligadas a alimentos, representando perdas significativas para indústrias (SIMÕES, PEREIRA & VIEIRA, 2003). Isso porque além de todos os problemas mencionados anteriormente, a formação de biofilmes microbianos ainda pode gerar danos em equipamentos através da biocorrosão, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão (JASS & WALKER, 2000).

#### 2.4.5. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO BIOFILME

Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos é essencial o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2006).

Nesse sentido, as instalações, equipamentos e utensílios utilizados devem ser lavados diariamente e devidamente desinfetados, neste caso, com o uso de substâncias microbidas previamente aprovadas pelo órgão competente. Isso porque, a limpeza imprópria, assim como a desinfecção de equipamentos realizadas de maneira ineficaz estão entre os principais fatores relacionados à contaminação dos produtos (JESSEN & LAMMERT, 2003). O design dos equipamentos em uma indústria alimentícia, assim como a escolha dos materiais de superfície e revestimento também são de extrema importância na prevenção da formação de biofilme. Até os programas de saneamento mais eficazes não conseguem compensar as deficiências básicas causada por design falhos de equipamentos, com cantos inacessíveis, frestas, fendas, juntas, válvulas e articulações, que são pontos vulneráveis para o acúmulo de biofilme (CHMIELEWSKI & FRANK, 2006). A combinação de um equipamento de alto padrão e um ambiente higienicamente concebido (sem fendas, espaços mortos, material de superfície, etc) permite uma limpeza eficaz. Um programa de saneamento efetivo remove todo material indesejável das superfícies, incluindo micro-organismos, corpos estranhos e resíduos provenientes de produtos de limpeza (DOSTI, GUZEL-SEYDIM & GREENE, 2005).

Na indústria da carne a adequação a um processo de higienização é julgado com base no cumprimento de um Processo Padrão de Higiene Operacional (PPHO) específico, durante o processo de limpeza, com a inspeção da higienização das instalações, equipamentos e utensílios, e também pela amostragem aleatória das superfícies de trabalho limpas para estimativa do número de bactérias sobreviventes após a higienização (GILL, BADONI & MCGINNIS, 1999)

Neste tipo de indústria, a higienização é dividida em duas etapas muito bem definidas: limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais (ANDRADE et al., 2008). Após a limpeza, o número de micro-organismos sobreviventes ainda é elevado, o que faz da sanitização procedimento obrigatório.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da portaria nº 15, de 23 de Agosto de 1988, definiu sanitizantes ou desinfetantes como formulações que têm na sua composição substância microbida que apresenta efeito letal sobre micro-organismos não esporulados (BRASIL, 1988).

A escolha do agente sanitizante depende, principalmente, do tipo de micro-organismo a ser destruído, assim como da natureza do equipamento a ser sanitizado. Os sanitizantes utilizados nas indústrias dentro das condições indicadas pelos fabricantes são aprovados em testes como os de suspensão e diluição de uso (PENG et al., 2002). Em contrapartida, existem algumas recomendações à sanitização de superfícies industriais que levam em consideração o número de células microbianas aderidas dentro de uma determinada área. Essas exigências são mais válidas do que testes em suspensão por se referirem as células microbianas no estado séssil. Para a *American Public Health Association* (APHA), agentes sanitizantes devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes em níveis aceitáveis, como, por exemplo, 2 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por cm<sup>2</sup> de micro-organismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização (APHA, 1992). Muitas vezes, a recomendação americana é considerada rígida para as condições brasileiras e, por isso, alguns pesquisadores e algumas instituições admitem contagens de até 50 UFC/cm<sup>2</sup> de superfície (ANDRADE et al., 2003).

No mercado atual, existem vários desinfetantes, com diferentes princípios ativos em sua composição. O sucesso na desinfecção depende de vários fatores, como modo de uso, concentração ideal, sobre quais micro-organismos o desinfetante atua, tempo de ação e a natureza do material a ser desinfetado. O sucesso no controle bacteriano no ambiente evita a contaminação de alimentos e também atua sobre o controle de patologias provocadas pelos micro-organismos comuns no ambiente (TORTORA, 2000). Os sanitizantes mais utilizados em superfícies de equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem princípios ativos dos grupos quaternários de amônio, compostos inorgânicos e orgânicos liberadores de cloro ativo, e compostos a base de ácido peracético, iodo e derivados (BRASIL, 1988).

Dentre esses, o de destaque, principalmente na indústria avícola, é o ácido peracético. Também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é um agente sanitizante que tem sido utilizado com bastante sucesso. É obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio. Sua eficiência é semelhante ou superior a do hipoclorito de sódio, e mais potente que o peróxido de hidrogênio. Trata-se de um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos micro-organismos, tendo uma rápida ação a baixas concentrações sobre um amplo espectro de micro-organismos. É esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico sendo, um sanitizante efetivo e sem efeito residual tóxico. Sua ação, contudo, é influenciada pela concentração, temperatura e tipo de micro-organismos (BLOCK, 1991).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo avaliar a formação de biofilme por *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola e testar a sensibilidade destes biofilmes ao ácido peracético.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram considerados objetivos específicos deste trabalho:

- O isolamento, por metodologia convencional, das cepas de *Salmonella* spp., a partir de dois diferentes materiais de esteira de abatedouro, poliestireno e lona;
- A comparação dos dois tipos de esteiras sobre o isolamento de *Salmonella* spp.;
- A verificação da distribuição da contaminação de *Salmonella* spp. em esteiras ao longo do processamento;
- A pesquisa da presença de dois genes envolvidos na produção de biofilme;
- A verificação e quantificação da produção de biofilme em lona, poliestireno e aço inoxidável, que são os componentes básicos de uma esteira;
- A avaliação da concentração do ácido peracético capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano, após a formação do biofilme.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. COLETA DAS AMOSTRAS DAS ESTEIRAS PARA ANÁLISE

As amostras foram coletadas em um abatedouro de frango sob Inspeção Federal localizado na cidade de Itapetininga, São Paulo e transportadas imediatamente em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Segundo representações de delineamento estatístico, para a determinação do número de amostras coletadas foram utilizados modelos baseados em dados de amostragem inteiramente casualizado, com posterior análise de variância.

Foram coletadas 120 amostras da superfície de cada um dos dois tipos de esteira presentes na sala de cortes do abatedouro, de poliestireno e de lona, totalizando 240 amostras. Para isso foram feitas vinte coletas, em cada uma delas foram coletadas seis amostras de cada um dos dois tipos de esteira. As amostras foram coletadas sempre nos mesmos pontos e sempre das mesmas esteiras, que transportavam o mesmo produto, *leg quarter*. A coleta foi feita com o uso de esponja estéril pré-hidratada em 10 mL de água peptonada tamponada. Para a padronização da área de coleta, a esponja tocava a esteira durante 10 segundos, tendo em vista a impossibilidade da parada do equipamento durante a produção. Ambas as esteiras eram movimentadas na mesma velocidade e de modo constante. Logo após a coleta, as esponjas eram novamente acondicionadas em sacos plásticos estéreis, sendo então adicionado o volume restante de água peptonada, completando-se 100 mL, sendo então o material acondicionado em caixa isotérmica. O intervalo de coleta foi estabelecido conforme o cronograma de produção do abatedouro, sendo a primeira realizada antes do início da produção (I), uma durante as atividades da manhã (II), uma logo após a parada para o almoço (III), uma no início das atividades da tarde (IV), uma durante a produção da tarde (V), e a última após o término das atividades (VI). Durante a parada para o almoço, entre os momentos III e IV, era realizado um procedimento de limpeza da sala, com a lavagem dos equipamentos e superfícies com água quente (com temperatura variável, mas sempre inferior a 60°C) e somente após o término das atividades era efetuado o procedimento completo de higienização, com a utilização de detergentes e sanitizantes, além da água.

#### 4.2. ISOLAMENTO DE SALMONELLA spp. (ANDREWS ET AL., 2001)

Para o isolamento de *Salmonella* spp., a esponja utilizada na amostragem de cada superfície era homogeneizada por dois minutos nos 100 mL de água peptonada tamponada, em um saco plástico estéril, empregando-se um *Stomacher* (Seaward). Após esse período, o homogeneizado era incubado a 35°C por 24 horas. A seguir, 1 mL era transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetrionato ao qual era adicionado um volume de 0,2 mL de iodeto de potássio a 0,1% imediatamente antes do uso. O tubo era incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL era transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo era semeada em placas de Petri contendo Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e placas contendo Agar Sulfito-Bismuto (BS). Após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias características de *Salmonella* spp. eram isoladas e repicadas para tubos de ensaio contendo Agar Tripticase Soja inclinado (TSA). Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. A partir desse crescimento foram feitos repiques em tubos de ensaio contendo Agar Tríplice Açúcar Ferro inclinado (TSI) e em tubos com Agar Fenilalanina inclinado, sendo os mesmos incubados a 35°C por 24 horas, como forma de triagem bioquímica do agente. Cepas com resultado compatível para *Salmonella* spp. foram então submetidas a testes bioquímicos complementares, empregando-se o sistema API-20E (Biomérieux). Após leitura positiva no API-20E, as cepas foram testadas frente ao soro polivalente, somático e flagelar (Procac do Brasil).

Para que não se superestimasse o número de cepas isoladas, foram utilizadas para os testes posteriores apenas uma cepa de cada amostra positiva para *Salmonella* spp.

#### 4.3. PESQUISA DOS GENES PRODUTORES DE BIOFILME PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

##### 4.3.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA, cada cepa foi incubada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 35°C por 24 horas. A seguir, 1 mL do caldo foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS

(Solução Tampão de Fosfato a 0,01 M e pH 7,2). Esse passo foi repetido mais duas vezes, com tempo de centrifugação de 5 minutos. A seguir, o sedimento ressuspendido em 200 µL de Tampão de Lise (50 mM Tris-H-Cl, 1 mM EDTA 0,025% Tween, 0,2 mg Proteinase K), incubado em banho-maria a 56°C por 1 hora e em seguida, a 95°C por mais 10 minutos. Ocorreu nova centrifugação a 13.000g por 5 minutos e o sobrenadante foi usado para a reação da PCR (ARNOLD et al., 2004).

#### 4.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO (PCR)

Para as reações da PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL num volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen), 0,75 µM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer* (Tabela 2), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL da amostra de DNA. A incubação realizada em Termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos (ARNOLD et al., 2004). Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, nesse caso com a utilização de uma cepa sabidamente não produtora de biofilme da nossa bacterioteca, e como controle positivo, uma cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

TABELA 2 – Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção dos genes produtores de biofilme nas cepas de *Salmonella* spp.

	Sequência – sentido 5' à 3'	T°C anelamento	pb
<i>csgD</i> foward	TGCGGACTCGGTGCTGTTGT		
<i>csgD</i> reverse	CAGGAACACGTGGTCAGCGG	60°C	123
<i>adrA</i> foward	GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT		
<i>adrA</i> reverse	GCCCATCAGCGCGATCCACA	60°C	92

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Blasé (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). *csgD*: número de acesso: NC 0031971; gene *csgD* 1252660; intervalo: 1229728 – 1230378. *adrA*: número de acesso: NC 0031971; gene *adrA* 1251904; intervalo: 438129- 439241.

#### 4.3.3. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Eletroforeses Power Supla Mo Del EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% em tampão de Ácido Bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Syber Green (2µL 10x/0,8 µL de amostra - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 50 ou 100bp, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

#### 4.4. VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Foi testada a produção de biofilme no aço inoxidável, poliestireno e lona. O primeiro compõe praticamente todas as superfícies e equipamentos de plantas de abate de aves e os demais são usados na fabricação das esteiras de transporte e manipulação dos produtos. A temperatura utilizada foi de 35°C, temperatura ótima de crescimento de *Salmonella* spp.

##### 4.4.1. PREPARO DAS PLACAS

Foram utilizados círculos (fichas), com diâmetro de 1 cm de aço inox, lona e poliestireno. Esses materiais foram devidamente lavados, secos e acondicionados em placas de Petri, que foram autoclavadas. A seguir, com o auxílio de uma pinça esterilizada, cada ficha foi depositada no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e com tampa.

#### 4.4.2. PREPARO DA CULTURA E INOCULAÇÃO NA PLACA

As cepas de *Salmonella* spp. que apresentaram o gene *adrA* e/ou *csgD* foram transferidas para tubos contendo Caldo Lúria- Bertani (LB) e incubadas a 35°C por 24h, para crescimento. A seguir, a cultura foi diluída até 10<sup>8</sup>UFC de bactérias com o auxílio do Densichek (Biomeriéux). Alíquotas de 300µL dessa diluição foram distribuídas, em triplicata, nas cavidades da placa e incubadas a 35°C por 96 horas.

#### 4.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Para a quantificação da produção de biofilme, as fichas foram transferidas para uma nova placa. Esse passo teve como objetivo evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no plástico, ao redor das fichas. Uma vez na placa nova, as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS com pH 7,2), para a remoção das células não aderidas e coradas com violeta cristal 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa novamente lavada. A seguir, o biofilme foi ressuscitado em 300 µL de ácido acético glacial, por 15 minutos, para assegurar a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µL foi transferido para uma microplaca de 96 poços e sua densidade óptica (OD) lida em um leitor de ELISA (Babsystems, Multiskan EX) a 540 nm.

O LB não inoculado foi semeado desde o início do teste, como controle negativo, para corrigir o valor da absorbância sendo realizada a média dos três poços.

As cepas testadas foram classificadas em níveis de produção de biofilme segundo STEPANOVIC et al. (2000). A partir das três repetições (OD) e de acordo com a relação entre OD e ODc (controle negativo), as cepas foram classificadas em não produtora de biofilme, produtora fraca, moderada ou forte, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} OD \leq ODc &= \text{não produtora de biofilme} \\ ODc < OD \leq (2 \times ODc) &= \text{fracaprodutorade biofilme} \\ (2 \times ODc) < OD \leq (4 \times ODc) &= \text{produtora moderadade biofilme} \\ (4 \times ODc) \leq OD &= \text{forte produtorade biofilme} \end{aligned}$$

#### 4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERICIDA DO ÁCIDO PERACÉTICO

Após a confirmação da produção de biofilme pelas cepas de *Salmonella* spp., foi testada a atividade sanitizante do ácido peracético, após a formação do biofilme. Nessa fase ocorreram etapas de preparo das placas, preparo da cultura e inoculação na placa, idênticas aos itens 4.4.1 e 4.4.2 respectivamente. Após essas etapas foi testada a sensibilidade das cepas ao ácido nas concentrações de 0,2 a 0,5%.

##### 4.5.1. MORTE BACTERIANA PELA AÇÃO DO ÁCIDO PERACÉTICO

Após período de incubação para a formação do biofilme, o meio de cultura foi removido dos poços e as fichas lavadas três vezes com solução tampão (PBS com pH 7,2) para a remoção das células não aderidas. A seguir, as fichas foram transferidas para tubos de ensaio com uma solução de água destilada e ácido peracético em concentração indicada pelo fabricante (0,2%), sendo os tubos incubados por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após incubação, foram submetidos ao *vortex*, em velocidade máxima, por 3 minutos, a fim de destacar o biofilme e suas células das fichas. Uma alíquota de 100µL deste material foi espalhada em placa de Agar TSA, que foi incubada a 35°C por 24h. Após esse período, foi realizada a leitura das placas, a fim de ser verificar a ação bactericida do ácido peracético, bem como quantificar essa capacidade através da contagem de UFC presentes na placa (CHORIANOPOULOS et al., 2008, modificado).

Considerando que a produção de biofilme foi realizada em triplicata para cada cepa testada, a análise da capacidade bactericida do ácido peracético foi realizada, então, pela contagem do número de UFC da cada uma das três placas de Agar TSA resultante, uma placa para cada poço onde a cepa foi testada. Foi considerada sensível a cepa que não apresentasse crescimento em nenhuma das placas, enquanto resistente àquela que apresentasse uma única UFC em pelo menos uma das placas.

*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi utilizada com o controle positivo enquanto nesta etapa foram consideradas como controle negativo 5 cepas, escolhidas de forma aleatória, que não fossem produtoras de biofilme em nenhum dos três materiais testados anteriormente.

Em um segundo momento, estas mesmas cepas ainda foram testadas de maneira idêntica a metodologia já descrita anteriormente, com a ressalva de neste caso não terem formado o biofilme previamente. Este procedimento teve por intenção demonstrar se a resistência a ser observada seria de fato pela presença da matriz ou como consequência de outro fator não analisado.

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADA

A análise estatística, bem como a escolha dos testes de comparação de todas as variáveis estudadas foi executada respeitando os pressupostos determinados pelos resultados característicos e comportamento das variáveis do estudo.

Para os resultados referentes à frequência de isolamento bem como o tratamento do número de cepas isoladas de cada esteira nos diferentes momentos foi utilizado o teste do qui-quadrado com posterior análise dos resíduos para identificar associações significativas com  $p < 0,001$ , este mesmo teste e análise foram utilizados para a avaliação da capacidade bactericida do ácido peracético.

Já para a produção de biofilme foi utilizado o teste Z de comparação de proporções entre grupos, também com posterior análise dos resíduos para identificar associações negativas com  $p < 0,001$ .

## 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ISOLAMENTO DO AGENTE

Das 240 amostras, 120 provenientes de cada esteira, divididas por sua vez em seis diferentes momentos de coleta, em função do período de abate, foram isoladas 59 diferentes cepas de *Salmonella* spp. provenientes cada uma de uma amostra diferente positiva para o micro-organismo. As cepas foram consideradas diferentes entre si por serem provenientes de diferentes amostras, ou seja, cada amostra positiva deu origem a apenas uma cepa. Destas amostras positivas para o agente, 16 (27%) foram provenientes da esteira de lona e 43 (73%) da de poliestireno.

Em modelo estatístico de investigação univariada de fatores associados à positividade, a chance de uma amostra de esteira de poliestireno estar contaminada com o agente, independentemente do número de cepas diferentes isoladas, foi de 24,1%, enquanto no caso na lona ela foi significativamente menor, 11,6% ( $p = 0,01$ ).

Uma possível explicação para esta diferença está no fato que enquanto a esteira de lona é única e lisa, a de poliestireno é formada por inúmeras pequenas peças encaixadas umas nas outras, exibindo uma grande quantidade de reentrâncias, que favorecem uma maior retenção de resíduos e micro-organismos.

Em relação à análise em função dos diferentes momentos de coleta, do ponto de vista biológico, nos primeiros horários foram observadas as menores chances de se encontrar o micro-organismo (Tabela 3), possivelmente devido ao fato dos equipamentos estarem higienizados e ainda não terem tido contato com os produtos. Desta forma, o aumento da exposição aos produtos que ocorre naturalmente durante o dia justifica as maiores chances do achado do agente durante o decorrer do processo.

No caso do poliestireno, o momento de maior contaminação ocorreu no final das atividades (VI) e essa contaminação se mostrou crescente no decorrer o dia, sendo os resultados significativamente diferentes entre cada momento. Novamente, a exposição natural e crescente que ocorre durante as atividades explica este aumento na frequência de isolamento.

Já para a lona, o momento de maior contaminação ocorreu logo após o retorno do almoço (IV), contudo neste material embora tenham havido diferenças biológicas na

frequência de isolamento, não houve diferença estatística, ou seja, a frequência se manteve constante, mostrando mais uma vez que a retenção de micro-organismos na lona é menor.

Outro ponto relevante é que a limpeza que ocorreu entre os momentos III e IV, feita somente com água morna, possivelmente tenha, contrariando as expectativas, não auxiliado na queda da contaminação, tendo em vista que nos dois materiais a frequência de isolamento ou se manteve ou aumentou após a sua execução. Possivelmente, por ação mecânica, a água sirva como um veículo de disseminação dos micro-organismos dentro do ambiente de processamento, quando utilizada abaixo da temperatura adequada (60°C), como o observado neste estabelecimento.

Já a limpeza pré-operacional, aquela feita logo após o término das atividades e com vistas à higienização para o próximo turno, com o uso de detergentes e sanitizantes, esta mostrou-se eficiente no controle da contaminação, já que apenas uma amostra positiva foi isolada após a sua realização, como neste tipo de estabelecimento é quase impossível se zerar a taxa de contaminação, o achado de apenas uma amostra positiva demonstra a eficácia deste procedimento de limpeza.

Ainda neste sentido, curiosamente, foi na lona, o material que teve as menores chances de se encontrar o micro-organismo que ocorreu o achado desta única amostra positiva. Nesse sentido, o encontro desta única amostra pode ser indicativo de que pode estar havendo a formação de biofilme na superfície, um dos objetos de nossa pesquisa. Isso porque será exatamente na lona que o patógeno será mais eficaz em promover crescimento desta matriz.

As Tabelas 3 e 4 demonstram, respectivamente, o comportamento biológico e a análise estatística dos isolamentos. A Tabela 4 revela separadamente a frequência de isolamento do agente, primeiro em função do tipo de material da esteira e em seguida do momento de coleta. Em ambos os casos foram observadas diferenças estatísticas, revelando que tanto o tipo de material da esteira como o momento de coleta influenciaram diretamente o encontro do patógeno.

TABELA 3 - Número e percentual de amostras positivas para *Salmonella* spp. encontradas em função do período de abate em esteiras de poliestireno e lona, em um abatedouro avícola.

Poliestireno						Momento da Coleta	Lona					
I	II	III	IV	V	VI		I	II	III	IV	V	VI
0	05	07	07	09	15	Amostras Encontradas	01	02	04	05	02	02
0	8,4	11,9	11,9	15,2	25,4	Percentual % (n=59)	1,7	3,4	6,9	8,4	3,4	3,4

Momento da coleta: (I) início da produção, (II) meio da manhã, (III) parada para o almoço, (IV) retorno do almoço, (V) meio da tarde, (VI) término da produção.

TABELA 4 – Análise univariada dos fatores associados ao isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de abatedouro avícola.

Fatores	Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.			
	N de coletas	% de Positividade	Nº Amostras Positivas	P-valor
Material da Esteira				0,01
Lona	120	13,3	16	
Poliestireno	120	35,8	43	
Momento de Coleta				0,01
Antes da produção - I	40	2,5	01	
Meio da manhã - II	40	17,5	07	
Parada para o almoço -III	40	27,5	11	
Retorno do almoço - IV	40	30,0	12	
Meio da tarde -V	40	27,5	11	
Fim das atividades - VI	40	42,5	17	

Ainda em relação às duas variáveis citadas anteriormente, esteira e momento, utilizando-se modelos estatísticos mais complexos, baseados em regressão logística, tornou-se

possível calcular a chance de uma amostra estar contaminada com o agente em função dessas variáveis. Este modelo é denominado estatisticamente como razão da chance, e os resultados podem ser observados na Tabela 5.

Nesta tabela os diferentes momentos foram comparados sempre com o último, que foi o que apresentou os maiores valores para o achado do micro-organismo.

Tabela 5 – Chance de se encontrar uma amostra contaminada por *Salmonella* spp. em função de diferentes momento de coleta.

Momento	Momento	Chance	Limite de Confiança – 95%	
VI	I	11,8	1,4	100
VI	II	2,0	0,6	6,7
VI	III	1,1	0,3	3,4
VI	IV	0,7	0,2	2,1
VI	V	1,0	0,3	2,9

Momento da coleta: (I) início da produção, (II) meio da manhã, (III) parada para o almoço, (IV) retorno do almoço, (V) meio da tarde, (VI) término da produção.

Baseado nestes mesmos modelos estatísticos em relação ao tipo de material de coleta as chances de uma amostra ser positiva foram 2,5 vezes maiores em amostras de poliestireno, quando comparadas às amostras de lona ( $P = 0,01$ ;  $OR = 2,5$ ;  $I\ 95\% = 1,2-5,2$ ), demonstrando mais uma vez que o material influenciou significativamente as chances do achado do micro-organismo.

Quanto à discussão destes resultados, a comparação com as informações disponíveis foi bastante dificultada, tendo em vista que a maioria dos estudos até o momento analisou a ocorrência do agente em carcaças de frangos e produtos avícolas, enquanto poucos foram os estudos que realizados amostrando superfícies de cortes e processamento, principalmente, daquelas localizadas em um setor específico do abatedouro, como no caso deste estudo.

Os dados em relação ao achado do agente em superfícies também foram extremamente variados. FUZIHARA, FERNANDES e FRANCO (2000) verificaram a presença de *Salmonella* spp. em 23,1% dos utensílios e 71,4% dos equipamentos, de 60 amostras de pequenos abatedouros de Mauá, São Paulo.

COSSI et al. (2013) verificaram que 15,6% das 32 amostras de mesas de açougues encontravam-se positivas para *Salmonella* spp. SAMULAK et al. (2011) também demonstraram a presença do micro-organismo em mesas de evisceração de abatedouro no estado do Paraná.

Nossos resultados confirmam a presença do micro-organismo em equipamentos e utensílios de abatedouro, como apontado por OLSEN et al. (2003) que citaram os equipamentos da linha de abate e processamento como potenciais fontes de contaminação cruzada para *Salmonella* spp.

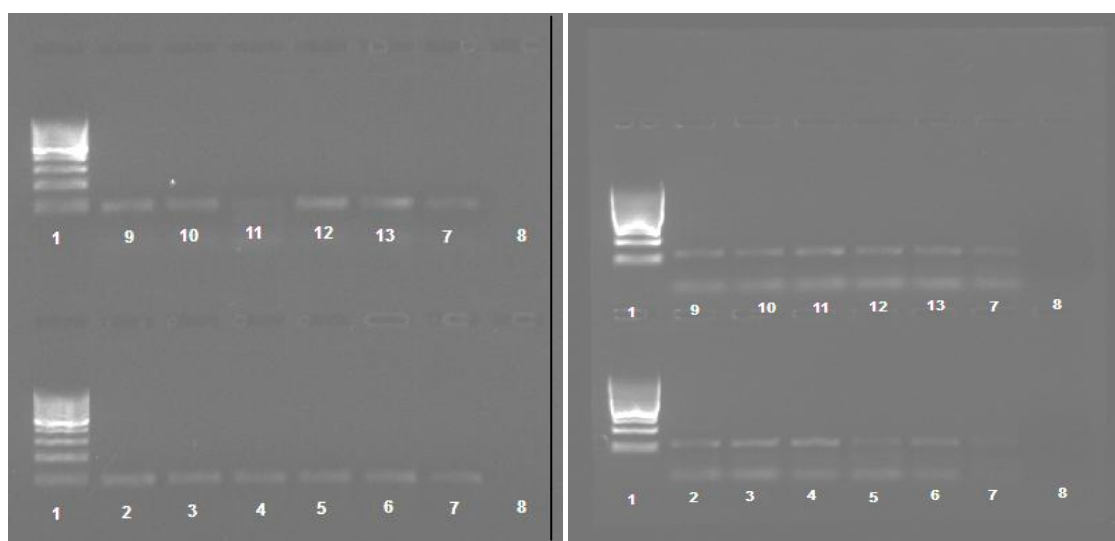
Já especificamente quanto ao uso da água no processo de limpeza, os nossos resultados concordaram com o encontrado por SOARES et al. (2014). No trabalho destes autores não foram observadas diferenças significativas para o isolamento de enterobactérias entre as esteiras transportadoras, independente do processo de limpeza. Não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de bactérias mesófilas nos momentos distintos de amostragem sobre a esteira transportadora que não tinha sido submetida ao processo de limpeza contínua com água a 45°C. E ao se comparar os períodos semelhantes de amostragem, também não foram observadas diferenças significativas entre as contagens dos mesmos micro-organismos obtidos a partir das esteiras transportadoras que foram ou não sujeitas à limpeza contínua com água a 45°C. Desta forma, a limpeza contínua com água não reduziu significativamente a contagem de micro-organismos, o que sugeriu a possibilidade de descartar este procedimento no processamento de frango.

## 5.2. PESQUISA DES GENESENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR SALMONELLA

Foram pesquisados dois dos genes implicados na produção de biofilme pelo micro-organismo, o *adrA* e o *csgD*, todas as 59 cepas, independentemente de qualquer variável anteriormente estudada, foram positivas para ambos os genes. A Figura 2 mostra a PCR de 10 cepas positivas para o gene *adrA*, enquanto a Figura 3 mostra a presença do gene *csgD* nas mesmas 10 cepas, provenientes de amostras de esteira de poliestireno positivas para o micro-organismo.

Estes resultados confirmam estudos anteriores. DANTAS et al. (2013) também encontraram ambos os genes em todas as 21 amostras analisadas. Já BAPTISTÃO et al. (2012)

observaram 93,3% de positividade para os mesmos genes em 30 cepas de *Salmonella* analisadas.



1 - Peso Molecular de 100pb; 2 a 6 e 9 a 13 - Amostras 38 a 47 (Peso Molecular 123pb); 7 - Controle Positivo ATTCC 14028; 8 - Controle Negativo.

FIGURA 2 – Presença do gene *adra* em dez amostras de esteira de poliestireno.

FIGURA 3 - Presença do gene *csgD* em dez amostras de esteira de poliestireno.

### 5.3. PRODUÇÃO DE BIOFILME

Embora a formação de biofilme por *Salmonella* spp. tenha sido muito bem descrita em vários materiais, pouco se sabe sobre essa capacidade em materiais de abatedouro. Isso porque embora se saiba que algumas cepas formem biofilmes em aço inoxidável, vidro e cloreto de polivinila (DJORDJEVIC et al., 2002; JOSEPH et al., 2001; MIRELES et al., 2001), a interação de *Salmonella* spp. com materiais, como a lona e o poliestireno ainda é desconhecida.

Neste estudo, a quantificação do biofilme se iniciou com um método baseado no seu cultivo em placas de microtitulação de 96 poços. Após a sua formação, foi utilizada coloração para detecção e reconhecimento do biofilme, e os resultados foram medidos por espectrofotometria. Diferentes métodos podem ser utilizados como os tubos teste, placas de microtitulação, microscopia, testes em placas de Agar Vermelho Congo, entre outros. No entanto, o método das placas de microtitulação permanece entre os ensaios mais frequentemente usados para investigação de biofilme (STEPANOVIC et al., 2004).

A avaliação da formação de biofilme por *Salmonella* spp., neste estudo, revelou que essas bactérias possuem capacidade de síntese de biofilme em diferentes superfícies, lona, poliestireno e aço inoxidável, apesar do fato de que algumas cepas tenham se comportado como não produtoras.

Das 59 cepas testadas, 34 (57,63%) foram capazes de produzir a matriz em pelo menos um dos materiais utilizados, nesse sentido a lona se mostrou como o material mais eficiente em induzir o crescimento da matriz pelo micro-organismo, com 34 (57,6%) das 59 cepas o fazendo, seguida do poliestireno, com 29 (49,1%), e por último do aço inox, com 27 (45,8%) cepas formadoras de biofilme.

Quando esses dados são agrupados, observou-se que 25 (42,37%) das 59 cepas foram capazes de produzir a matriz nos três materiais analisados, já em modelos de análise pareada, 27 (45,76%) cepas o fizeram tanto na lona e no aço inoxidável, como no poliestireno e no aço inoxidável, com uma variação das cepas e 25 (42,37%) formaram a estrutura no poliestireno e na lona.

A lona, por sua vez, ainda teve 2 (3,39%) das 59 cepas formando a matriz exclusivamente neste material, característica que não pôde ser observada nos demais materiais.

Estes resultados confirmaram os achados anteriores, que mostraram que a bactéria é capaz de formar biofilme em superfícies variadas (STEPANOVIC et al., 2003a; DJORDJEVIC et al., 2002; JOSEPH et al., 2001; MIRELES et al., 2001; RÖMLING e ROHDE, 1999).

Contudo, este comportamento foi apenas biológico, já que não houve diferença estatística significativa na produção entre os diferentes materiais, mesmo nos modelos de análise pareada ou em testes de agrupamento mais consistentes. Nesse sentido o que se observou foi apenas uma pequena tendência da lona ser mais eficaz na promoção da formação do biofilme.

Este resultado concorda com o encontrado por LU et al. (2011) que verificaram valores também semelhantes, 63% das suas cepas foram produtoras de biofilme nos diferentes materiais analisados.

Já SOLANO et al. (2002) observaram 97% de positividade para a produção de biofilme pelo micro-organismo, valores semelhantes aos encontrados por RIBEIRO et al. (2012) que notaram 98,3% das suas cepas como produtoras de biofilme. No estudo destes autores, 60,3% das cepas mostraram essa capacidade no aço inoxidável e 65,5% o fizeram no poliestireno, valores semelhantes aos observados no presente estudo.

MILAN et al. (2010) observaram a formação da matriz em todas as suas cepas, com diferentes contagens nos diferentes materiais analisados, sendo que o vidro mostrou-se como o material em que mais facilmente foi notado o crescimento, seguido do polietileno e do alumínio.

Em nosso estudo, as amostras ainda foram analisadas quanto ao seu perfil de produção, baseado na sua densidade óptica (OD), e posteriormente, classificadas como não produtora, fraca produtora, produtora moderada e forte produtora de biofilme, de acordo com STEPANOVIC et al. (2000).

Quanto à OD, a média produzida em todos os três materiais pelas 59 cepas foi de 0,097 com desvio padrão (DP) de 0,060. Nesse caso, o material influenciou significativamente na quantidade de biofilme produzido pelas cepas testadas, com diferenças estatísticas. A lona foi onde mais se notou o desenvolvimento da matriz pelo micro-organismo (OD média  $\pm$  DP de  $0,114 \pm 0,062$ ), seguida então pelo poliestireno ( $0,100 \pm 0,058$ ). Já o aço inox ( $0,077 \pm 0,056$ ) foi o menos eficaz em promover este desenvolvimento.

A distribuição dessa capacidade bem como do perfil de produção, em função do tipo de material, é demonstrada na Figura 4 e Tabela 6.

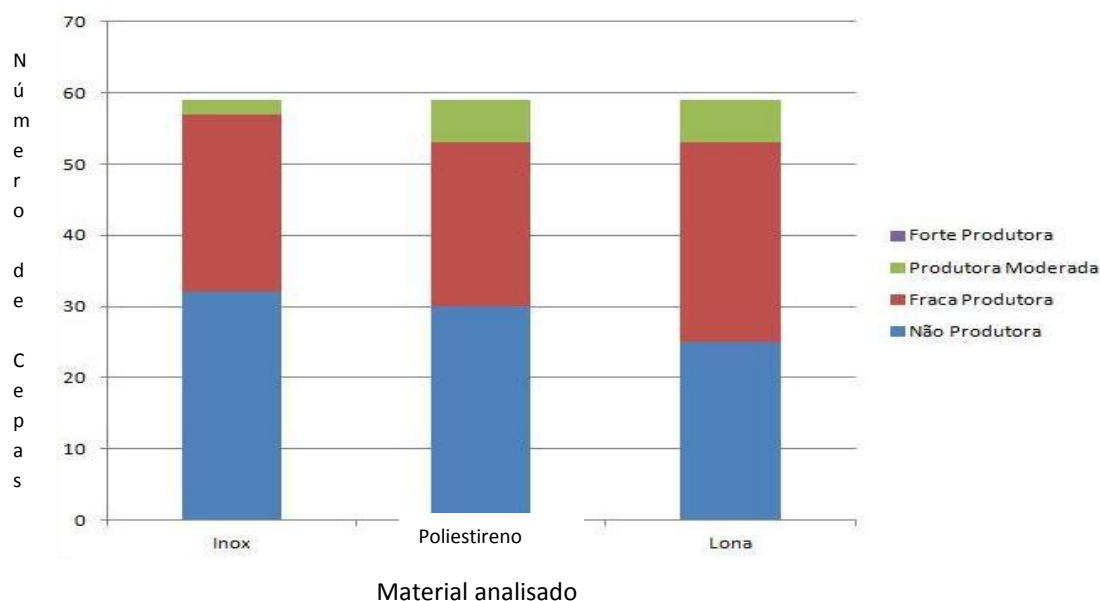


FIGURA 4 – Perfil de produção de biofilme em diferentes materiais por *Salmonella* spp.

TABELA 6 - Produção de biofilme por *Salmonella* spp. isolada de esteiras de abatedouro em diferentes materiais.

Material	Não Produtor (%)	Fraco (%)	Moderado (%)	Forte (%)	Total de Produtores (%)
Aço Inox	32 (54,2)	25 (42,4)	02 (3,4)	0	27 (45,8)
Lona	25 (42,4)	28 (47,4)	06 (10,2)	0	34 (57,6)
Poliestireno	30 (50,8)	23 (39)	06 (10,2)	0	29 (49,1)

Quanto a produção de biofilme, a discussão dos resultados encontrados neste trabalho foi fortemente afetada pela escolha dos materiais. O aço inoxidável foi escolhido por compor praticamente todas as superfícies de plantas de abate de aves, bem como por ser o material encontrado na estrutura das esteiras deste tipo de estabelecimento; o poliestireno, por ser o material mais comumente encontrado nas tubulações e redes de abastecimento de água, e ainda, juntamente com a lona, ser o material utilizado na confecção das esteiras por onde os produtos passam, embalados ou não, em suas diferentes fases de produção.

Em geral, considera-se que o aço inoxidável é um material hidrofílico enquanto a borracha, o plástico e a lona são hidrofóbicos (DONLAN 2002; SINDE e CARBALLO 2000). Esta

informação é de extrema relevância, pois foi previamente demonstrado que os micro-organismos, incluindo *Salmonella* spp., aderem em números mais elevados em materiais mais hidrofóbicos (DONLAN 2002; SINDE & CARBALLO 2000; CUNLIFFE et al., 1999). Como a adesão é o primeiro passo no complexo processo de formação de biofilme (DONLAN, 2002), esta poderia ser uma possível explicação para a capacidade destas bactérias em produzir biofilme em maior número na superfície da lona e do poliestireno. Esta constatação pôde ser observada também neste trabalho, como demonstra a Tabela 6. Nota-se que o aço, com características mais hidrófilas, foi o material que apresentou menos formação de biofilmes. O aço também foi o que apresentou maior número de cepas não produtoras, com 54,2%, seguido do poliestireno, 50,9%, e da lona, 42,4%.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERICIDA DO ÁCIDO PERACÉTICO

Essa análise foi realizada apenas nas cepas isoladas da lona. A escolha deste material resulta do fato de ter sido nele onde ocorreu a maior parte da produção de biofilme bem como o achado dos maiores valores desta produção.

Das 34 cepas testadas, 15 (44,11%) foram sensíveis ao desinfetante, preparado nas recomendações do fabricante e da ANVISA (concentração de 0,2%), enquanto 19 (55,89%) foram resistentes. O controle positivo mostrou-se como fracamente resistente e todas as cepas escolhidas como controle negativo foram sensíveis ao desinfetante, demonstrando uma possível relação entre a capacidade de produção de biofilme e a resistência ao agente sanitizante em questão.

Em virtude da considerável resistência observada, novos testes foram realizados com soluções mais concentradas do desinfetante para uma melhor avaliação do grau de resistência do agente ao sanitizante. Foram então preparadas soluções com as concentrações de 0,3, 0,4, e 0,5%, e as análises repetidas conforme a mesma metodologia já descrita. O perfil de resistência destas cepas às diferentes concentrações do ácido pode ser observado na Tabela 7.

TABELA 7 – Perfil de resistência de *Salmonella* spp. ao ácido peracético após a formação de biofilme.

Concentração (%)	Número de Cepas Resistentes	UFC Médio	Sensibilidade (%)	P-valor
0,2	19	543	32,1	0,001
0,3	17	166	39,3	0,057
0,4	08	17	71,4	0,015
0,5	0	0	100,0	0,004

Como pôde ser observado na Tabela 7, o aumento na concentração do ácido tem efeito direto sobre a sua capacidade sanitizante. Essa capacidade tem efeito máximo em uma concentração de 0,5%, onde não mais se notou a resistência do agente.

Contudo, como existem diversos fatores, que não somente biofilme, envolvidos na resistência de cepas de *Salmonella* spp. aos agentes sanitizantes, uma última etapa de testes foi realizada para se estudar melhor essa relação entre resistência e biofilme.

Nesta etapa, as mesmas 34 cepas testadas anteriormente foram novamente desafiadas frente ao ácido, com a diferença de que neste caso as cepas não haviam formado o biofilme previamente.

Nesta última análise, todas as cepas foram sensíveis ao desinfetante, na concentração de 0,2%, revelando uma estreita relação entre a produção de biofilme e a capacidade de resistência ao agente sanitizante.

Este resultado concorda com o encontrado por diversos autores. BULLA et al. (2012) demonstraram maior resistência ao sanitizante em 20 amostras de *Salmonella* Enteritidis em estágio de formação de biofilme, sendo que as mesmas cepas, quando testadas em fase planctônica frente ao ácido peracético a 0,5% apresentaram sensibilidade, com ausência de crescimento *in vitro*. SILVA et al. (2010) também demonstraram uma maior resistência de cepas de *Salmonella* Enteritidis ao mesmo ácido, quando comparada com as mesmas cepas quando não estavam formando a matriz.

Ao contrário, MARIN et al. (2009) em estudos de proteção de biofilmes contra desinfetantes demonstraram não ter havido diferenças significativas entre cepas formadoras e não formadoras de biofilmes. Contudo, neste estudo, foram testados outros desinfetantes que

não o ácido peracético, como o glutaraldeído, formaldeído e o peróxido de hidrogênio, sendo que todos se mostraram eficazes contra cepas de *Salmonella* spp. formadoras da matriz.

Quanto ao ácido peracético, quando utilizado nas concentrações indicadas tanto pelo fabricante como pela agência regulamentadora, este se mostrou pouco eficaz em promover a morte da bactéria quando protegida pelo biofilme. Isso somente ocorreu quando a concentração foi aumentada para 0,5%. Tal resultado é extremamente preocupante, já que a ineficácia do produto pode resultar na contaminação das superfícies, com a manutenção do agente no ambiente de processamento dos cortes de frango.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- *Salmonella* spp. foi isolada em ambos os tipos de materiais, em todos os momentos de coleta, ratificando a sua capacidade de aderir a diferentes superfícies e se manter no ambiente industrial ao longo do período de processamento do alimento
- das esteiras avaliadas, aquela constituída por poliestireno mostrou-se a mais contaminada, sendo esta maior contaminação provavelmente resultante tanto do design do equipamento, quanto da hidrofobicidade do poliestireno
- em relação ao perfil genético das cepas isoladas, embora dois dos genes envolvidos na produção do biofilme tenham sido encontrados em todas elas, a produção efetiva não foi observada em todas as avaliadas, revelando que embora a presença dos genes seja condição fundamental, a expressão desta propriedade também está relacionada a outros fatores, como variações sorológicas, presença de outros genes ainda não descritos ou pesquisados neste trabalho e condições ambientais, tais como o tipo de superfície e o grau de hidrofobicidade destas.
- as propriedades físico-químicas da superfície dos diferentes materiais influenciam diretamente na adesão dos micro-organismos, e por consequência no aparecimento do biofilme, sendo que dos materiais avaliados, aqueles mais hidrofóbicos, tais como a lona e o poliestireno estiveram mais sujeitos à contaminação
- em relação ao ácido peracético, este somente se mostrou totalmente efetivo em combater o biofilme pelo micro-organismo, quando utilizado em concentrações maiores que as recomendadas pelo fabricante, revelando uma estreita relação entre a produção de biofilme e o aumento da capacidade de resistência do agente ao desinfetante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEF. *Relatório Anual 2014*. São Paulo, 2014. Disponível em:  
< <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: março de 2014
- ALMEIDA, I.C. et al. Isolamento e identificação de *Salmonella* em carcaças de frango congelados e frescos, através de método rápido. *Higiene Alimentar*, v.14, n.70, p.59-62, 2000.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Hanover: EPS Group Inc., 1992.
- ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L. DE O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: Andrade N.J. *Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela, p.181-226, 2008.
- ANDRADE, N.J.; SILVA, R.M.M. DA; BRABES, K.C.S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciência e Agrotecnologia*, v.7, n.3, p.590-6, 2003.
- ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*, v.61, p.833-8, 1998.
- ANDREWS, W.H. et al. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association, p.357-380, 2001.
- ARAÚJO, L.V. *Biosurfatantes como agentes inibidores de adesão de Listeria monocytogenes em superfícies de aço inox*. 45f. Monografia. Medicina Veterinária - Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2006.
- ARNOLD, T.; SCHOLZ, H. C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of invA-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.51, n.10, p. 459-463, 2004.
- BAPTISTÃO, L. G.; BUDRI, P. E.; JÚNIOR, J. P. A.; RALL, V. L. M. Presença dos genes *csgD* e *adRA*, responsáveis pela formação de biofilme em *Salmonella* sp.. *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Santos, São Paulo, 2012.
- BAU, A.C. et al. *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas – RS. *Higiene Alimentar*, v.13, n.60, p.26, 1999.
- BETANCOR, L et al. An attenuated *Salmonella* Enteritidis strain derivative of the main genotype circulation in Uruguay is an effective vaccine for chickens. *Veterinary microbiology*, v.107, p.81-89, 2005.
- BLOCK, S. S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S. S. *Disinfection, sterilization and preservation*, 4 ed, Philadelphia: Lea Febiger, p.167-181, 1991.
- BOARI, C. A. *Formação de biofilme em aço inoxidável por Aeromonas hydrophila e Staphylococcus aureus sob diferentes condições de cultivo*. 80f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOTT, T. R. Aspects of Biofilm Formation and Destruction. *Corrosion Reviews*, 11, 1-24, 1993.

BRASIL. Instrução Normativa nº 70 de 10 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle Sanitário de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Secretaria de Defesa Agropecuária, *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, 2003a.

BRASIL. Instrução Normativa nº 78 de 03 de novembro de 2003. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Secretaria de Defesa Agropecuária, *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, 2003b.

BRASIL, Portaria nº46 de 10 de fevereiro de 1998. Manual Genérico de Procedimentos para APPCC em Indústrias de Produtos de Origem Animal. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, 1998.

BRASIL, Resolução nº326 de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico de Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Secretaria de Vigilância Sanitária, *Ministério da Saúde*, 1997.

BRASIL. Portaria 1.423 de 02 dezembro de 1993 - Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de alimentos, as diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de prestação de serviços na área de alimentos e o Regulamento Técnico para o estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para serviços e produtos na área de alimentos, *Ministério da Saúde*, 1993.

BROOKS, J. D., & FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, n.12, 2008.

BULLA, P.; PISSOLATO, B.; DIEDRICH, L.; LUZA, D.; FOLCHINI, I.; OLIVEIRA, A.; COSTA, C.; CASTOLDI, F.; PERDONCINI, G.; TONDO, E.; NASCIMENTO, V.; SANTOS, L.R. *Salmonella* Enteritidis: formação de biofilme em aço inoxidável, poliuretano e poliestireno e sua resistência a sanitizantes. *XXII Mostra de Iniciação Científica*, Universidade do Passo Fundo, Rio Grande do Sul, RS, 2012.

CAIAZZA, N. C. & O'TOOLE, G. A. SadB Is Required for the Transition from Reversible to Irreversible Attachment during Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, v.186, p.4476-4485, 2004.

CAIXETA, D. S. *Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável*. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CAMPOS, L. C. *Microbiologia*. São Paulo, *Atheneu*, 2005.

CAPELLETTI, R. V. *Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais*. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARVALHO, A.C. et al. Avaliação microbiológica da carne de ave mecanicamente separada. *Higiene Alimentar*, v.16, n.98, p.91-100, 2002.

CHARACKLIS, W. G. *Laboratory Biofilm Reactors*. In: Characklis, W. G.; Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 55-89, 1990.

CHMIELEWSKI, R.A.N.&FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on rubber. *LWT – Food Science and Technology*, v.39, p.11-19, 2006.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAM, S. A.; NYCHAS, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p. 1586-1596, 2008.

CHRISTENSEN, B. E. &CHARACKLIS, W. G. *Physical and Chemical Properties of Biofilms*. In: Characklis, W. G, Marshall, K. C. eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 93-130, 1990.

CORPE, W.A. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In: Adsorption of microorganisms to surfaces. G. Bitton and K.C. Marshal (Eds), *John Wiley & Sons, Inc, New York, USA*, p.105-144, 1980.

COSSI, M.V.C.; SILVA, D.A.L.; DIAS, M.R.; CASTILHO, N.P.A.; SOARES, P.F.; PINTO, P.A.S.; NERO, L.A. Identificação de *Salmonella* spp. em utensílios utilizados em açougues de Viçosa – MG. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo, v.11, n.1, 2013.

COSTA, E. T. R. *Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável*, 81f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., & GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, v.284, n.5418, p.1318–1322, 1999.

D'AOUST, J. et al. *Salmonella* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editores. *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2th ed. Washington: *American Society for Microbiology*, v. 7, p.141-77, 2001.

DANTAS, S.T.A.; VIVIAN, R.C.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; BAPTISTÃO, L.G.; ZANUTTO, M.R.; RALL, V.L.M. Pesquisa dos genes csgD e adrA envolvidos na produção de biofilme por *Salmonella* Enteritidis. *Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Natal, Rio Grande do Norte, 2013.

DDTHA. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004 CVE/CCD-SES. *Revista Saúde Pública*, v.39, n.3, p.515-518, 2005.

DARWIN, K.H. & MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.405-428, 1999.

DE CESARE, A., et al. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, v.66, n.9, p.1587-1594, 2003.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDBOROUGH, L.A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.2950–2958, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, p.881–890, 2002.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p.167-193, 2002.

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A. K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, p.19–24, 2005.

EVEREST, P., et al. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends in Microbiology*, v.9, n.7, p.316-320, 2001.

FAO . 2013. *Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO/ONU)*. <http://www.fao.org>. Acesso em: 03 de novembro de 2013.

FERNANDES FILHO, J. & QUEIROZ, A.M. *Transformações recentes na avicultura de corte brasileira: o caso do modelo de integração*, disponível em <http://www.fearp.usp.br/egna/resumos/FernandesFilho.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2013.

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

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. 1.ed, Porto Alegre: Artmed, 151-153p, 2002.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo, Editora Atheneu, 2002.

GAST, R.K. Paratyphoid infections. In.: SAIF, Y.M. *Diseases of Poultry*. 11 ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, p.583-613, 2003.

GENIGEORGIS, C. Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector. In: BURT, S. A. AND BAUER, F. (Eds), *New Challenges in Meat Hygiene: Specific problems in cleaning and disinfection, Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology*, p.29-47, 1995.

GERMANO, P.M.L. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Higiene Alimentar*, v.7, n.27, p.6-11, 1993.

GIAOURIS, E.; CHORIANOPOULOS, N. & NYCHAS, G. J. E. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces

as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection*, v.68, n.10, p.2149–2154, 2012.

GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTE, C.M.; KAY, W.W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Society for General Microbiology*, v.153, p.1131-1140, 2007.

GIBSON, D. L.; WHITE, A. P.; SNYDER, S. D.; MARTIN, S.; HEISS, C.; AZADI, P.; SURETTE, M.; KAY, W. W. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, v.188, p. 7722-7730, 2006.

GILBERT, P., ALLISON, D. G., & MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: Do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, v.92, n.1S, p.98S–110S, 2002.

GILL, C.O.; BADONI, M.; MCGINNIS, J.C. Assessment of the adequacy of cleaning of equipment used for breaking beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.46, p.1-8, 1999.

GIORDANO, L. Tecnologia per la produzione industriale di cotolette di pollo. *Eurocarni*, n.3, 2004. Disponível em: <<http://www.pubblicitaitalia.com/eurocarni/2004/3/5147.html>> Acesso em 30 de março de 2012.

GOLAN, E. H. Calculating the cost of foodborne illness - A new tool to value food safety risks. *Diet and Health*, v.1, n.2, p.6-7, 2003.

GORZYNSKI, E. A. *Enterobacteriaceae e Vibrionaceae*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.

GUERIN, P.J.; VOLD, L.A.A.; VILTSLAND P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. *Eurosurveillance*, v.10, n.1-3, p.48-50, 2005.

GUINEY, D.G. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *Journal of Clinical Investigation*, v.99, p.565–569, 1997.

HAMILTON, S.; BONGAERTS, R.J.; MULHOLLAND, F.; COCHRANE, B.; PORTER, J.; LUCCHINI, S.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; HINTON, J.C. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *Biomed Central Genomics*, v.10, p.599, 2009.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: *Williams & Wilkins*, p. 787, 1994.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; ELDERE, J.V.; HOLY, A.; SWINGS, J. Molecular diversity and characterization of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a poultry processing plant. *Applied Environmental Microbiology*, v.71, p.574–579, 2005.

ICMSF. *Microorganismos de los alimentos*. Acribia: Zaragoza, 2002.

ICMSF. *Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens*. London, *Blackel Academic & Professional*, p.513, 1996.

ISO. NWIP ISO/TR 6579-3 *Guidance for serotyping Salmonella*. Association Française de Normalisation, 2011.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. *Crescimento microbiano em biofilmes*. Publicado em 2005, Revisto em 2008. Disponível em < <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>>. Acesso em 14 de maio de 2013.

JASS, J. & WALKER, J.T. Biofilms and biofouling. Industrial biofouling - detection, prevention and control. J. T. Walker, S. Surman and J. Jass. New York, *John Wiley & Sons*, p.1-12, 2000.

JAY, J.M. Biofilmes. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed. 6ed. , p.673-674, 711p. 2005.

JESSEN, B. & LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.51, p.265–269, 2003.

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

JR, K. H. M., et al. Food safety issues for meat / poultry products and international trade. *Diet, Safety and Health*, USDA, AIB 789-4, p.1-2, 2004.

KYAW, C.M. *Biofilmes Microbianos*, 2008. Disponível em <[www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html](http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html)>. Acesso em 10 de maio de 2013.

LEMOS, A.L.S.C. Biofilmes. CTC- *TecnoCarnes. Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL*, v.12, n.1, 2002.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, n.4, p.999-1007, 2001.

LOURENÇO, M.C.S.; REIS, E.F.M.; VALLS, R. *Salmonella enterica* subsp *houtenae* sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.46, n.3, p.169-170, 2004.

LU, Y. ; DONG, H. ; CHEN, S. ; CHEN, Y. ; PENG, D.; LIU, X. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Pullorum strains. *African Journal of Microbiology Research*, v.5, p.2428-2437, 2011.

LUCCHESI, E. G. *Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas*. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MACEDO, J. *Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica*. 2008. Disponível em: <<http://www.aguaseguas.ufjf.br/ARTIGOBiofilmebacterianosWeb.PDF>>. Acesso em: 09 de maio de 2013.

MACEDO, J. *Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica*. 2006. Disponível em: <<http://www.aguaseguas.ufjf.br/ARTIGOBiofilmebacterianosWeb.PDF>>. Acesso em 14 de maio de 2013.

MAH, T. -F. C., & O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, v.9, n.1, p.34–39, 2001.

MARIN, C.; HERNANDIZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. Centro de Tecnología Animal, *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias*, Polígono la Esperanza, n.100, v.12400, 2009.

MEDONLINE. Medicina on Line. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. *Revista Virtual de Medicina*, 2008. Disponível em <www.medonline.com.br>. Acesso em 10 de maio de 2013

MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; DIAS, P.A.; TIMM, C.D. Formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis em diferentes superfícies. *XIX Congresso de Iniciação Científica*, UFPEL, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2010.

MIRELES, J.R. II; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella* enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, v.183, p.5848–5854, 2001.

MORAES, M.S.V. et al. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanitizantes químicos. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas, v. 17, n. 3, 1997.

MORCK, D.W.; OLSON, M.E.; CERI, H. Microbial Biofilms: preservation, control and removal. In: Block, SS, editor. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lippincott: Williams & Wilkins, p. 675-681, 2001.

MORETRO, T., & LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, v.1, p.107–121, 2004.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathology*, v.5, e1000213., 2008.

NIKOLAEV, Y.A. & PLAKUNOV, V.K. Biofilm -“city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologiya*, v.76, n.2, p.149-63, 2007.

NITSCHKE, M. *Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos*. Projeto de Pesquisa, EMBRAPA, CTAA, RJ, 2006

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, n.1, p.97-106, 2010.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinarian Microbiology*, v.124, p.187–191, 2007.

OLIVEIRA, S. J. *Guia Bacteriológico Prático*. Canoas, Ulbra, 2000.

OLSEN, J.E.; BROWN, D.J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, n.5, p.826-835, 2003.

PARIZZI, S. Q. F., et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives of Biology/Technology*, vol.47, p.77-83. ISSN 1516-8913. 2004.

PENG, J.S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, v.77, n.2, p.11-8, 2002.

PEREIRA, O. B. O. *Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

PERESI, J. T. M. et al. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes microbianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.58, n.1, p.41-6, 1999.

POPOFF, M. Y. et al. Supplement 1996 (Nº40) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, v.148, p.811-4, 1997.

QUINN, P.J. et al. *Microbiologia Veterinária*. Porto Alegre, Artmed, p.115-130, 2005.

QUINN, P. J. *Clinical Veterinary Microbiology*. England, Wolf Publishing, 1994.

ROSENBERG, M. & KJELLEBERG, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Advances in Microbiol Ecology*, v.9, p.353-393, 1986.

SÁ BARRETO, E.S. & RAMOS, S.M. Pesquisa de *Salmonella* em cortes congelados de frango comercializados no Município do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*, v.13, n.61, p.53-54, 1999.

SALLES, R.P.R. *Pesquisa de Salmonella spp. Em galinhas poedeiras e enterobactérias em ovos comerciais da região metropolitana de Fortaleza*. 2007. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2007.

SAMULAK, R.L.; ZANETTI, G.F.; RODRIGUES, S.A.; BITTENCOURT, J.V.M. Condição higiênico-sanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v.5, p.408-417, 2011.

SANO, G., et al. Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. *The Journal of Bacteriology*, v.189, n.22, p.8224-32, 2007.

SANTOS, F. B., et al. Genotypes, serotypes, and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* isolated from commercial North Carolina turkey farms. *Journal of Food Protection*, v.70, n.6, p.1328-1333, 2007.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK, H.; D'ANDREA, A.; ALBUQUERQUE, M. C.; RAMPANELLI, Y.; MACHADO, N. P.; RIOS, S.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridos entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Higiene Alimentar*, v.16, n.102-103, p.93-99, 2002.

SAUER, K. & CAMPER, A.K. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, v.184, n.4, p.1140-1154, 2001.

SHI, X., & ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, v.20, n.9, p.407–413, 2009.

SILVA, E.N. & DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. Campinas, v.4, n.2, 2002.

SILVA, I.D.; CARELI, R.T.; LIMA, J.C.; ANDRADE, N.J. Eficiência dos procedimentos de limpeza e de sanitização no controle da adesão de *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* em superfícies usadas em cozinhas domésticas. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, v.30, n.1, p.231-236, 2010.

SILVA, J.A. et al. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão. *Revista TeC Carnes*, Campinas, v.3, n.1, p.19-26, 2001.

SILVA, J.S. Microrganismos patogênicos em carne de frango. *Higiene Alimentar*, n.58, 1998.

SILVA, M.C.D. et al. *Salmonella* sp em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializadas em Maceió, AL. *Revista Higiene Alimentar*, v.18, n.121, p.80-84, 2004.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. *Water Science and Technology*, v.47, n.5, p.217-223, 2003.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide, *Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications*, Davis, CA, USA, p.58–62, 2009.

SINDE, E. & CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, v.17, p.439-447, 2000.

SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; ZANETTE, C. M.; NERO, L. A.; PINTO, J. P. A. N.; BARCELLOS, V. C.; BERSOT, L. S. Cleaning Conveyor Belts in the Chicken-Cutting Area of a Poultry Processing Plant with 45°C Water. *Journal of Food Protection*, v.3, p. 352-521, 2014.

STEENACKERS, H., HERMANS, K., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S.C.J. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, v.45, n.2, p.502-531, 2012.

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

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

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified micro titer-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, v.40, p.175-179, 2000.

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

SUMNER, J. et al. Have changes to meat and poultry food safety regulation in Australia affected the prevalence of *Salmonella* or of Salmonellosis? *International Journal of Food Microbiology*, v.92, n.2, p.199-205, 2004.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, n.5, v.9, p. 222-227, may, 2001.

TAITT, C.R.; SHUBIN, Y.S.; ANGEL, R. Detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by using a Rapid, Array-Based Immunosensor. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.1, p.152-158, 2004.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.P.S.; CASTRO, A.G.M.; ZANATTA, G.F., KANASHIRO, A.M.I. Incidência de *Salmonella* pintos de corte recém-nascidos. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, v.70, n.3, p.279-281, 2003.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, p.83, 2000.

TRABULSI, L. R., et al. *Microbiologia*, São Paulo, Atheneu, 2005.

USDA. 2013. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América. <http://www.fas.usda.gov>. Acesso em 13 de novembro de 2013.

VAN HOUDT, R. V. & MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, v.109,p.1117-1131, 2010.

VARNAM, A. H. & EVANS, M. G. Foodborne pathogens: an illustrated text. Londres, Wolfe, p.550, 1991.

VIDAL, D.R.; RAGOT, C.; THIBAUT, F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Annales Pharmaceutiques Françaises.*, v.55, n.2, p.49-54, 1997.

VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística. Editora: Elsevier, 360pg, 2004.

VIEIRA, M. J. *Estudo da formação de filmes biológicos por Pseudomonas fluorescens e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino*, 161f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 1995.

WATNICK, P. & KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.10, p.2675-9, 2000.

WEILL, F. X., et al. Clonal reconquest of antibiotic-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhi in Son La Province, Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.76, n.6, p.1174-1181, 2007.

WHITE, A.P.; WELJIE, A.M.; APEL, D.; ZHANG, P.; SHAYKHUTDINOV, R.; VOGEL, H. J.; et al. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PLoS ONE*, v.5, n.7, 2010.

WONG, G.C.L. & O'TOOLE, G.A. All together now: Integrating biofilm research across disciplines. *MRS Bulletin* 36, 339–342, 2011.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, v.3, p.2-13, 2008.

ZHOU, D. & GALAN, J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes and Infection*, v.3 (14-15), p.1293-8, 2001.

ZILLI, J. B. *Os fatores determinantes para a eficiência econômica dos produtores de frango de corte: uma análise estocástica*. 2003. 193f. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Esalq-USP. Piracicaba, 2003.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; ROMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, v.39, p.1452-1463, 2000.

ZOTTOLA, E.A. Reflections on *Salmonella* and other "wee beasties" in foods. *Food Technology*, v.55, p.60-67, 2001.

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

## ANEXO 1

Trabalho submetido à revista Ciência Rural no dia 05 de maio de 2014.

Ocorrência de *Salmonella* spp. em esteiras de abatedouro avícola  
do interior do estado de São Paulo

*Occurrence of Salmonella spp. in mats of poultry slaughterhouse  
in within the state of São Paulo*

Ricardo Campos Vivian<sup>1\*</sup>, Lívia Gramolini Baptista<sup>2</sup>, Vera Lúcia Mores Rall<sup>2</sup>, José  
Paes de Almeida Nogueira Pinto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Departamento de Higiene  
Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/UNESP - Botucatu, SP, Brasil \*  
rcamposvivian@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB/UNESP - Botucatu, SP, Brasil

#### Resumo

Apesar dos recentes avanços tecnológicos na indústria de alimentos, ainda se observa a ocorrência de inúmeras enfermidades de origem alimentar devido à ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos, dentre eles os do gênero *Salmonella*. Dentre os produtos envolvidos em processos de contaminação por este agente, as carnes são as mais importantes, sendo a de aves o veículo em numerosos casos de infecções humanas. A ocorrência e a quantidade do micro-organismo presentes na carne variam de acordo com os cuidados higiênicos no ambiente de processamento, tendo em vista que a presença do micro-organismo em equipamentos e utensílios pode

constituir uma fonte crônica de contaminação. Desta forma, o presente trabalho avaliou a presença do agente em esteiras de abatedouro de frango, correlacionando o achado com os diferentes materiais de esteira, poliestireno e lona, e momentos de coleta. Das 240 amostras foram isoladas 59 cepas de *Salmonella* spp., sendo 16 (27%) provenientes da esteira de lona e 43 (73%) da de poliestireno. Uma possível explicação para esta diferença está no fato que enquanto a esteira de lona é única e lisa, a de poliestireno é formada por inúmeras pequenas peças encaixadas umas nas outras, exibindo uma grande quantidade de reentrâncias, que favorecem uma maior retenção de resíduos e micro-organismos. Quanto ao momento de coleta, o aumento da exposição aos produtos que ocorreu naturalmente durante o dia justificou as maiores chances do achado do agente durante o decorrer do processo.

Palavras-chave: *Salmonella*, esteira, poliestireno, lona e momento.

#### Abstract

Despite recent technological advances in the food industry, still observed the occurrence of numerous foodborne illnesses due to ingestion of contaminated by pathogenic microorganisms, including members of the genus *Salmonella*. Among the products involved in processes of contamination by this agent, the steaks are the most important, being the vehicle of birds in numerous cases of human infections. The presence and quantity of microorganism in meat vary in hygienic care in processing environment, given that the presence of the microorganism in equipment and utensils can be a source of chronic infection. Thus, the present study shows the presence of the agent in the poultry slaughterhouse mats, correlating the findings with different materials treadmill, polystyrene and canvas, and time of collection. 240 samples of 59 strains of *Salmonella* spp. were isolated, 16 (27%) from the mat canvas and 43 (73%) of polystyrene. One

possible explanation for this difference is that while the belt bag is unique and smooth, the polystyrene is formed by numerous small pieces fitted each other, showing a lot of recesses that foster greater retention of waste and microorganisms. As the time of collection, the increased exposure to products that occurred naturally during the day justified the higher chances of finding the agent during the process.

Keywords: Salmonella, mat, polystyrene, canvas and time.

## Introdução

A produção avícola é um importante segmento do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior exportador mundial de carne de frango. A otimização dos fatores produtivos e a preocupação com a qualidade final do produto agregam valor e conquistam cada vez mais mercados (ABEF, 2014). De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), o Brasil é o terceiro produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, respectivamente. Em se tratando de exportações, porém, assume o primeiro lugar, seguido dos Estados Unidos e da União Europeia (ABEF, 2014).

A crescente produção de aves vem ao encontro das necessidades do mercado que, ao longo dos anos, aumentou a demanda por esta proteína animal. Este fato foi resultado de uma intensa propaganda do produto, da queda do seu preço para o consumidor final e das oscilações do mercado mundial de outras carnes (ABEF, 2014).

Nesse contexto, uma constante preocupação das autoridades são as possíveis enfermidades transmitidas por estes alimentos. Dentre os patógenos veiculados na avicultura, destacam-se os do gênero *Salmonella* spp. e a importância da disseminação deste micro-organismo vem sendo amplamente estudada na cadeia produtiva das aves

(SILVA & DUARTE, 2002). Isso porque estes micro-organismos são os maiores responsáveis por toxinfecções alimentares humanas. No mundo elas representam cerca de 10 a 15% de casos de gastroenterite aguda. Sendo as fontes mais comuns destes surtos alimentares, as carnes e derivados, em especial a de aves (JAY, 2006).

No Brasil, são escassos os dados epidemiológicos mostrando a importância do problema das salmoneloses em humanos, uma vez que a notificação de intoxicação por alimentos contaminados não é obrigatória (PICCOLLO et al., 1992). No entanto, Dados da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”, DTHA/CVE, da Secretaria de Estado da Saúde do estado de São Paulo, SES/SP, mostraram que no período de 1999 a 2003, cerca de 60% dos surtos de diarreia ocorridos no estado foram veiculados por alimentos (DDTHA, 2005).

Segundo os mesmos dados da DTHA/CVE dos 459 surtos de diarreia com etiologia identificada, neste período, 325 (70,8%) foram causados por bactérias. Dentre os surtos por bactéria, 140 (43,1%) foram devido à *Salmonella* spp., envolvendo aproximadamente 3.001 pacientes. Estes dados ainda mostraram que dos 74 surtos por *Salmonella* com identificação do sorovar, 66 (89,2%) foram devido à *S. Enteritidis* (DDTHA, 2005).

Baseado nessa situação, se no passado a principal motivação do controle das infecções por *Salmonella* spp. em aves era reduzir as perdas decorrentes da doença clínica nos animais, atualmente, sua implicação na saúde pública tornou a prevenção da salmonelose uma realidade preocupante para toda a avicultura, tendo em vista que a principal via de contaminação humana é através do consumo de produtos avícolas (BETANCOR et al., 2005).

A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* spp. presentes na carne variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças (SALLES, 2007). Assim, a contaminação desses produtos pode ocorrer pela presença do micro-organismo no ambiente de abate e processamento dos alimentos. Desta forma, se destaca o fato de que estes micro-organismos podem se aderir firmemente aos equipamentos e superfícies de processamento, constituindo uma fonte de contaminação crônica aos alimentos, quando os devidos cuidados higiênicos não são observados.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a presença de *Salmonella* spp. em esteiras de transporte de produtos de abatedouro e correlacionar o achado do micro-organismo com o tipo de material da esteira e com os diferentes momentos de coleta.

## Material e Métodos

### Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas em um abatedouro de frango sob Inspeção Federal localizado na cidade de Itapetininga, São Paulo e transportadas imediatamente em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Segundo representações de delineamento estatístico, para a determinação do número de amostras coletadas foram utilizados modelos baseados em dados de amostragem inteiramente casualizado, com posterior análise de variância.

Foram coletadas 120 amostras da superfície de cada um dos dois tipos de esteira presentes na sala de cortes do abatedouro, de poliestireno e de lona, totalizando 240 amostras. Para isso foram feitas vinte coletas, em cada uma delas foram coletadas seis

amostras de cada um dos dois tipos de esteira. As amostras foram coletadas sempre nos mesmos pontos e sempre das mesmas esteiras, que transportavam o mesmo produto. A coleta foi feita com o uso de esponja estéril pré-hidratada em 10 mL de água peptonada tamponada. Para a padronização da área de coleta, a esponja tocava a esteira durante 10 segundos, tendo em vista a impossibilidade da parada do equipamento durante a produção. Ambas as esteiras eram movimentadas na mesma velocidade e de modo constante. Logo após a coleta, as esponjas eram novamente acondicionadas em sacos plásticos estéreis, sendo então adicionado o volume restante de água peptonada, completando-se 100 mL, sendo então o material acondicionado em caixa isotérmica. O intervalo de coleta foi estabelecido conforme o cronograma de produção do abatedouro, sendo a primeira realizada antes do início da produção (I), uma durante as atividades da manhã (II), uma logo após a parada para o almoço (III), uma no início das atividades da tarde (IV), uma durante a produção da tarde (V), e a última após o término das atividades (VI). Durante a parada para o almoço, entre os momentos III e IV, era realizado um procedimento de limpeza da sala, com a lavagem dos equipamentos e superfícies com água quente (com temperatura variável, mas sempre inferior a 60°C) e somente após o término das atividades era efetuado o procedimento completo de higienização, com a utilização de detergentes e sanitizantes, além da água.

Isolamento de *Salmonella* spp. (ANDREWS et al., 2001)

Para o isolamento de *Salmonella* spp., a esponja utilizada na amostragem de cada superfície era homogeneizada por dois minutos nos 100 mL de água peptonada tamponada, em um saco plástico estéril, empregando-se um homogeneizador digital. Após esse período, o homogeneizado era incubado a 35°C por 24 horas. A seguir, 1 mL era transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetracionato ao qual era adicionado um volume de 0,2 mL de iodeto de potássio a 0,1% imediatamente antes do

uso. O tubo era incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL era transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo era semeada em placas de Petri contendo agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e placas contendo agar Sulfito-Bismuto (BS). Após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias características de *Salmonella* spp. eram isoladas e repicadas para tubos de ensaio contendo agar Trypticase Soja inclinado (TSA). Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. A partir desse crescimento foram feitos repiques em tubos de ensaio contendo agar Tríplice Açúcar Ferro inclinado (TSI) e em tubos com agar Fenilalanina inclinado, sendo os mesmos incubados a 35°C por 24 horas, como forma de triagem bioquímica do agente. Cepas com resultado compatível para *Salmonella* spp. foram então submetidas a testes bioquímicos complementares, empregando-se o sistema API-20E (Biomérieux). Após leitura positiva no API-20E, as cepas foram testadas frente ao soro polivalente, somático e flagelar (Procac do Brasil).

Para que não se superestimasse o número de cepas isoladas, foram utilizadas para os testes posteriores apenas uma cepa de cada amostra positiva para *Salmonella* spp.

#### Análise estatística

A análise estatística, bem como a escolha dos testes de comparação de todas as variáveis estudadas foi executada respeitando os pressupostos determinados pelos resultados característicos e comportamento das variáveis do estudo. Para os resultados referentes à frequência de isolamento bem como o tratamento do número de cepas isoladas de cada esteira nos diferentes momentos foi utilizado o teste do qui-quadrado

com posterior análise dos resíduos para identificar associações significativas com  $p < 0,001$ .

### Resultados e Discussão

Das 240 amostras, 120 provenientes de cada esteira, divididas por sua vez em seis diferentes momentos de coleta, em função do período de abate, foram isoladas 59 diferentes cepas de *Salmonella* spp. provenientes cada uma de uma amostra diferente positiva para o micro-organismo. As cepas foram consideradas diferentes entre si por serem provenientes de diferentes amostras, ou seja, cada amostra positiva deu origem a apenas uma cepa. Destas amostras positivas para o agente, 16 (27%) foram provenientes da esteira de lona e 43 (73%) da de poliestireno.

Em modelo estatístico de investigação univariada de fatores associados à positividade, a chance de uma amostra de esteira de poliestireno estar contaminada com o agente foi de 24,1%, enquanto no caso na lona ela foi significativamente menor, 11,6% ( $p = 0,01$ ).

Uma possível explicação para esta diferença está no fato de que enquanto a esteira de lona é única e lisa, a de poliestireno é formada por inúmeras pequenas peças encaixadas umas nas outras, exibindo uma grande quantidade de reentrâncias, que favoreceram uma maior retenção de resíduos e micro-organismos.

Em relação à análise em função dos diferentes momentos de coleta, do ponto de vista biológico, nos primeiros horários foram observadas as menores chances de se encontrar o micro-organismo (Tabela 1), possivelmente devido ao fato dos equipamentos estarem higienizados e ainda não terem tido contato com os produtos. Desta forma, o aumento da exposição aos produtos que ocorre naturalmente durante o dia justifica as maiores chances do achado do agente durante o decorrer do processo.

No caso do poliestireno, o momento de maior contaminação ocorreu no final das atividades (VI) e essa contaminação se mostrou crescente no decorrer o dia, sendo os resultados significativamente diferentes entre cada momento. Novamente, a exposição natural e crescente que ocorre durante as atividades explica este aumento na frequência de isolamento. Já para a lona, o momento de maior contaminação ocorreu logo após o retorno do almoço (IV), contudo neste material embora tenham havido diferenças biológicas na frequência de isolamento, não houve diferença estatística, ou seja, a frequência se manteve constante, mostrando mais uma vez que a retenção de micro-organismos na lona é menor.

Outro ponto relevante é que a limpeza que ocorreu entre os momentos III e IV , feita somente com água morna, possivelmente tenha, contrariando as expectativas, não auxiliado na queda da contaminação, tendo em vista que nos dois materiais a frequência de isolamento ou se manteve ou aumentou após a sua execução. Possivelmente, por ação mecânica, a água serviu como um veículo de disseminação dos micro-organismos dentro do ambiente de processamento, já que era utilizada abaixo da temperatura adequada (60°C).

Já a limpeza pré-operacional, aquela feita logo após o término das atividades e com vistas à higienização para o próximo turno, com o uso de detergentes e sanitizantes, esta mostrou-se eficiente no controle da contaminação, já que apenas uma amostra positiva foi isolada após a sua realização, como neste tipo de estabelecimento é quase impossível se zerar a taxa de contaminação, o achado de apenas uma amostra positiva demonstra a eficácia deste procedimento de limpeza.

As Tabelas 1 e 2 demonstram, respectivamente, o comportamento biológico e a análise estatística dos isolamentos. A Tabela 2 revela separadamente a frequência de isolamento do agente, primeiro em função do tipo de material da esteira e em seguida

do momento de coleta. Em ambos os casos foram observadas diferenças estatísticas, revelando que tanto o tipo de material da esteira como o momento de coleta influenciaram diretamente o encontro do patógeno.

Ainda em relação às duas variáveis, esteira e momento, utilizando-se modelos estatísticos mais complexos, baseados em regressão logística, tornou-se possível calcular a chance de uma amostra estar contaminada com o agente em função dessas variáveis. Este modelo é denominado estatisticamente como razão da chance, e os resultados podem ser observados na Tabela 3. Nesta tabela os diferentes momentos foram comparados sempre com o último, que foi o que apresentou os maiores valores para o achado do micro-organismo.

Baseado nestes mesmos modelos estatísticos em relação ao tipo de material de coleta as chances de uma amostra ser positiva foram 2,5 vezes maiores em amostras de poliestireno, quando comparadas às amostras de lona ( $P = 0,01$ ;  $OR = 2,5$ ;  $I\ 95\% = 1,2-5,2$ ), demonstrando mais uma vez que o material influenciou significativamente as chances do achado do micro-organismo.

Quanto à discussão destes resultados, a comparação com as informações disponíveis foi bastante dificultada, tendo em vista que a maioria dos estudos até o momento analisou a ocorrência do agente em carcaças de frangos e produtos avícolas, enquanto poucos foram os estudos que realizados amostrando superfícies de cortes e processamento, principalmente, daquelas localizadas em um setor específico do abatedouro, como no caso deste estudo.

Os dados em relação ao achado do agente em superfícies também foram extremamente variados. FUZIHARA, FERNANDES e FRANCO (2000) verificaram a presença de *Salmonella* spp. em 23,1% dos utensílios e 71,4% dos equipamentos, de 60 amostras de pequenos abatedouros de Mauá, São Paulo. COSSI et al. (2013) verificaram

que 15,6% das 32 amostras de mesas de açougues encontravam-se positivas para *Salmonella* spp. SAMULAK et al. (2011) também demonstraram a presença do micro-organismo em mesas de evisceração de abatedouro no estado do Paraná.

Nossos resultados confirmam a presença do micro-organismo em equipamentos e utensílios de abatedouro, como apontado por OLSEN et al. (2003) que citaram os equipamentos da linha de abate e processamento como potenciais fontes de contaminação cruzada para *Salmonella* spp.

Já especificamente quanto ao uso da água no processo de limpeza, os nossos resultados concordaram com o encontrado por SOARES et al. (2014). No trabalho destes autores não foram observadas diferenças significativas para o isolamento de enterobactérias entre as esteiras transportadoras, independente do processo de limpeza. Não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de bactérias mesófilas nos momentos distintos de amostragem sobre a esteira transportadora que não tinha sido submetida ao processo de limpeza contínua com água a 45°C. E ao se comparar os períodos semelhantes de amostragem, também não foram observadas diferenças significativas entre as contagens dos mesmos micro-organismos obtidos a partir das esteiras transportadoras que foram ou não sujeitas à limpeza contínua com água a 45°C. Desta forma, a limpeza contínua com água não reduziu significativamente a contagem de micro-organismos, o que sugeriu a possibilidade de descartar este procedimento no processamento de frango.

## Conclusão

*Salmonella* spp. foi isolada em ambos os tipos de materiais, em todos os momentos de coleta, ratificando a sua capacidade de aderir a diferentes superfícies e se manter no ambiente industrial ao longo do período de processamento do alimento. Das esteiras avaliadas, aquela constituída por poliestireno mostrou-se a mais contaminada,

sendo esta maior contaminação provavelmente resultante tanto do design do equipamento, quanto da hidrofobicidade do poliestireno. Quanto ao momento de coleta, o aumento da exposição aos produtos que ocorreu naturalmente durante o dia justificou as maiores chances do achado do agente durante o decorrer do processo.

#### Referências Bibliográficas

ABEF. **Relatório Anual 2014**. São Paulo, 2014. Disponível em:

< <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: março de 2014.

ANDREWS, W.H. et al. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. p.357-380.

BETANCOR, L. et al. An attenuated *Salmonella* Enteritidis strain derivative of the main genotype circulation in Uruguay is an effective vaccine for chickens. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.81-89, 2005.

COSSI, M.V.C. et al. Identificação de *Salmonella* spp. em utensílios utilizados em açougues de Viçosa, MG. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.11, p.1, 2013.

DDTHA. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004, CVE/CCD-SES. **Revista Saúde Pública**, v.39, n.3, p.515-518, 2005.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A. & FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and disseminations of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.63, n.12, p.1749-1753, 2000.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Maryland: Aspen Publishers, 2006. 525p.

- OLSEN, J.E. et al. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.5, p.826-835, 2003.
- PICOLLO, R. C. et al. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo em 1991. **Higiene Alimentar**, v.6, n.23, p.28-30, 1992.
- SALLES, R.P.R. **Pesquisa de Salmonella spp. Em galinhas poedeiras e enterobactérias em ovos comerciais da região metropolitana de Fortaleza.** 2007. 80f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.
- SAMULAK, R.L. et al. Condição higiênico-sanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.5, p.408-417, 2011.
- SILVA, E.N. & DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.2, 2002.
- SOARES, V. M. et al. Cleaning Conveyor Belts in the Chicken-Cutting Area of a Poultry Processing Plant with 45°C Water. **Journal of Food Protection**, v.3, p. 352-521, 2014.

TABELA 1 - Número e percentual de amostras positivas para *Salmonella* spp. encontradas em função do período de abate em esteiras de poliestireno e lona, em um abatedouro avícola.

Poliestireno						Momento da Coleta	Lona					
I	II	III	IV	V	VI		I	II	III	IV	V	VI
0	05	07	07	09	15	Amostras Encontradas	01	02	04	05	02	02
0	8,4	11,9	11,9	15,2	25,4	Percentual % (n=59)	1,7	3,4	6,9	8,4	3,4	3,4

Momento da coleta: (I) início da produção, (II) meio da manhã, (III) parada para o almoço, (IV) retorno do almoço, (V) meio da tarde e (VI) término da produção.

TABELA 2 – Análise univariada dos fatores associados ao isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de abatedouro avícola.

Fatores	Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.			P-valor
	N de coletas	% de Positividade	Nº Amostras Positivas	
Material da Esteira				0,01
Lona	120	13,3	16	
Poliestireno	120	35,8	43	
Momento de Coleta				0,01
Antes da produção - I	40	2,5	01	
Meio da manhã - II	40	17,5	07	
Parada para o almoço -III	40	27,5	11	
Retorno do almoço - IV	40	30,0	12	
Meio da tarde -V	40	27,5	11	
Fim das atividades - VI	40	42,5	17	

Tabela 3 – Chance de se encontrar uma amostra contaminada por *Salmonella* spp. em função de diferentes momento de coleta.

Momento	Momento	Chance	Limite de Confiança – 95%	
VI	I	11,8	1,4	100
VI	II	2,0	0,6	6,7
VI	III	1,1	0,3	3,4
VI	IV	0,7	0,2	2,1
VI	V	1,0	0,3	2,9

Momento da coleta: (I) início da produção, (II) meio da manhã, (III) parada para o almoço, (IV) retorno do almoço, (V) meio da tarde e (VI) término da produção.

## ANEXO 2

Normas da revista Ciência Rural para a publicação de artigos:

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelo .doc, .pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

#### 9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus : INPA, 1979. 95p.

#### 9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

#### 9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. Sampling techniques. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

#### 9.4. Artigo

completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Product Research, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. Ciência Rural , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

## 9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

## 9.6. Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

## 9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

## 9.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

## 9.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings... Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. Maturitas, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. Anais... Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.