

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec**  
**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Determinantes de virulência e de resistência, capacidade de formação de biofilmes e suscetibilidade a antimicrobianos naturais em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento do sul do Rio Grande do Sul**

**Maiara Lindemann Zehetmeyr**

**Pelotas, 2016**

**Maiara Lindemann Zehetmeyr**

**Determinantes de virulência e de resistência, capacidade de formação de biofilmes e suscetibilidade a antimicrobianos naturais em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento do sul do Rio Grande do Sul**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva  
Orientador de estágio: MSc. Louise Haubert

Pelotas, 2016



Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

Z41d Zehetmeyr, Maiara Lindemann

Determinantes de virulência e de resistência, capacidade de formação de biofilmes e suscetibilidade a antimicrobianos naturais em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento do sul do Rio Grande do Sul / Maiara Lindemann Zehetmeyr; Wladimir Padilha da Silva, orientador; Louise Haubert, coorientadora. — Pelotas, 2016.

81 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. *Salmonella* spp.. 2. Multirresistência. 3. Antimicrobianos naturais. 4. Biofilmes. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Haubert, Louise, coorient. III. Título.

CDD : 614.511

Maiara Lindemann Zehetmeyr

Determinantes de virulência e de resistência, capacidade de formação de biofilmes e suscetibilidade a antimicrobianos naturais em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento do sul do Rio Grande do Sul

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 02 de dezembro de 2016

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)  
Doutor em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (USP)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Pohl Sehn  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEl)

---

MSc. Isabela Schneid Kröning  
Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEl)

Dedico este trabalho à minha  
família e ao meu namorado.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTEC, pela oportunidade de realização da graduação;

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Wladimir Padilha da Silva, pela orientação, oportunidade e ensinamentos;

À minha orientadora de estágio, Louise Haubert pela paciência, amizade, dedicação, incentivo e ajuda, além de tantos conhecimentos transmitidos;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, por todos ensinamentos e momentos divertidos, em especial à Carla pela amizade, carinho e a oportunidade de trabalhar com ela, à Darla e Isabela por toda a ajuda durante os experimentos e meus colegas de estágio durante a graduação Ytacyana, Isadora e Cristiano pela amizade;

Aos professores do Núcleo de Biotecnologia, por todo aprendizado;

À minha família pelo amor, apoio e compreensão, em especial ao meu irmão, Marcelo pelo incentivo, por sempre me mostrar o melhor caminho e por não medir esforços para me ajudar e me ver feliz;

Ao meu namorado, Felipe pelo incentivo, companheirismo, dedicação, paciência, amor e carinho. Por todas as vezes que me ajudou nos estudos, mesmo sem entender o assunto e muitas vezes sem paciência continuava do meu lado, sempre acreditando na minha capacidade e torcendo;

À minha prima, Liane pela amizade e dormir tantas vezes de luz ligada para poder estudar no quarto até mais tarde;

A todos, que de alguma maneira me ajudaram na conclusão dessa etapa.

**Muito Obrigada!**

## Resumo

ZEHETMEYR, Maiara Lindemann. **Determinantes de virulência e de resistência, capacidade de formação de biofilmes e suscetibilidade a antimicrobianos naturais em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento do sul do Rio Grande do Sul.** 2016. 81f. Trabalho de Conclusão – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

*Salmonella* spp. é um dos principais micro-organismos associados às doenças transmitidas por alimentos (DTA). O mecanismo de patogenicidade bacteriano é regulado por fatores de virulência, sendo que a presença, bem como a expressão desses fatores, são determinantes para a ocorrência das doenças. Muitos isolados de *Salmonella* spp. envolvidos em surtos de DTA têm apresentado um perfil de resistência, e muitas vezes de multirresistência a antimicrobianos, dificultando o tratamento da salmonelose. Além disso, muitos isolados também apresentam capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas, dificultando a sua remoção e aumentando a resistência aos desinfetantes, podendo contaminar alimentos manipulados sobre essas superfícies. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a presença de genes de virulência, o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos, bem como verificar a capacidade de formar biofilmes e a suscetibilidade a antimicrobianos naturais de 26 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento. Foi avaliada a presença dos genes de virulência *hilA*, *invA*, *pefA*, *spvC* e *sefA*, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O fenótipo de resistência a antimicrobianos foi avaliado através do método de difusão em ágar, utilizando-se 15 antimicrobianos. Para determinação do perfil genotípico de resistência, utilizou-se a técnica de PCR, visando a identificação de 13 genes de resistência a antimicrobianos (*blaZ*, *strA*, *strB*, *tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetM*, *tetL*, *tetO*, Tn916-1545, *sul1*, *sul2* e *dfrG*). A resistência ao cloreto de benzalcônio foi determinada através da concentração inibitória mínima (CIM). Os isolados multirresistentes foram avaliados quanto à sensibilidade ao sobrenadante livre de células (SLC) de *Lactobacillus curvatus* LC254 e ao extrato de *Butia odorata*, bem como foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes em superfície de aço inoxidável a 22 °C e 10 °C. Todos os isolados portavam, pelo menos, um gene de virulência: *hilA* (100%), *invA* (100%), *pefA* (19,2%), *spvC* (15,4%) e *sefA* (3,8%). Onze isolados apresentaram perfil de resistência a antimicrobianos e, desses, 7 foram considerados multirresistentes e 5 portavam genes de resistência. Quanto à CIM para o cloreto de benzalcônio, 21 (80,8%) isolados apresentaram CIM de 32 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto 5 (19,2%) apresentaram CIM de 64 µg.mL<sup>-1</sup>. Os isolados multirresistentes não foram inibidos pelo SLC de *L. curvatus* LC254, porém, todos foram inibidos pelo extrato de *Butia odorata* e apresentaram a capacidade de formar biofilme. Conclui-se que os isolados avaliados apresentam genes de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos. Além disso, o extrato de *Butia odorata* tem potencial para inibir isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. com capacidade de formar biofilmes, podendo ser utilizado como uma estratégia no controle de micro-organismos na indústria de processamento de alimentos.



**Palavras-chave:** *Salmonella* spp.; multirresistência; antimicrobianos naturais; biofilmes



## Abstract

ZEHETMEYR, Maiara Lindemann. **Determinants of virulence and resistance, ability to form biofilms and susceptibility to natural antimicrobials in *Salmonella* spp. isolates from food, animal feed components and processing environments in the south of Rio Grande do Sul.** 2016. 81f. Final Project – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

*Salmonella* spp. is one of the major microorganisms associated with foodborne diseases (DTA). The mechanism of bacterial pathogenicity is regulated by virulence factors, and the presence, as well as the expression of these factors, are determinant for the occurrence of the diseases. Many isolates of *Salmonella* spp. involved in outbreaks of DTA have shown a resistance profile, and often multi-resistance, to antimicrobials, making it difficult to treat salmonellosis. In addition, many isolates have also shown the ability to form biofilms on abiotic surfaces, becoming more difficult to be removed and increasing resistance to disinfectants, even contaminating food handled on these surfaces. The objective of this study was to evaluate the presence of virulence genes, the phenotypic and genotypic profiles of antimicrobial resistance, as well as the ability to form biofilms and the susceptibility to natural antimicrobials from 26 isolates of *Salmonella* spp. that come from food, animal feed components and processing environments. The presence of the virulence genes *hlyA*, *invA*, *petA*, *spvC* and *setA* were evaluated through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The antimicrobial resistance phenotype was evaluated by the agar diffusion method, using 15 antimicrobials. In order to determine the genotype resistance profile, was used the PCR technique to identify 13 antimicrobial resistance genes (*blaZ*, *strA*, *strB*, *tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetM*, *tetL*, *tetO*, *Tn916-1545*, *sul1*, *sul2* and *dfxG*). Resistance to benzalkonium chloride was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC). The multi-resistant isolates were evaluated for sensitivity to the cell-free supernatant of *Lactobacillus curvatus* LC254 and *Butia odorata* extract, as well as the ability to form biofilms on stainless steel surfaces at 22 ° C and 10 ° C. All isolates carried at least one virulence gene: *hlyA* (100%), *invA* (100%), *petA* (19.2%), *spvC* (15.4%) and *setA* (3.8%). Eleven isolates presented antimicrobial resistance profile, of which 7 were considered multi-resistant and 5 presented resistance genes. For the MIC for benzalkonium chloride, 21 (80.8%) isolated had MICs of 32 µg.mL<sup>-1</sup>, while 5 (19.2%) had MICs of 64 µg.mL<sup>-1</sup>. The multi-resistant isolates were not inhibited by the cell-free supernatant of *L. curvatus* LC254, but all were inhibited by the *Butia odorata* extract and showed the ability to form biofilm. It is concluded that the evaluated isolates present virulence genes and antimicrobial resistance profile. In addition, *Butia odorata* extract has the potential to inhibit multi-resistant isolates of *Salmonella* spp. with the ability to form biofilms, and may be used as a strategy in the control of microorganisms in the food processing industry.

**Keywords:** *Salmonella* spp.; multi-resistance; natural antimicrobials; biofilms



## Lista de Figuras

- Figura 1 Atividade antimicrobiana presente no sobrenadante livre de células de *Lactobacillus curvatus* LC254 contra isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento.....38
- Figura 2 Atividade antimicrobiana do extrato de *Butia odorata* contra isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento e cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.....39
- Figura 3 Média da concentração bacteriana (log UFC.cm<sup>-2</sup>) em superfície de aço inoxidável na temperatura de 20 °C e 10 °C em isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento .....40



## Lista de Tabelas

Tabela 1 Sequência de oligonucleotídeos utilizados para confirmação e verificação de genes de virulência em <i>Salmonella</i> spp. ....	29
Tabela 2 Sequência de oligonucleotídeos utilizados para verificação de genes de resistência em isolados de <i>Salmonella</i> spp. com perfil de resistência fenotípico a antimicrobianos.....	31
Tabela 3 Perfil de resistência fenotípico e genotípico a antimicrobianos em isolados de <i>Salmonella</i> spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento.....	36
Tabela 4 Diâmetro dos halos de inibição de isolados de <i>Salmonella</i> spp. pelo extrato de <i>Butia odorata</i> .....	39



## Sumário

1 Introdução.....	13
2 Objetivo.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 Revisão bibliográfica.....	16
3.1 Características do gênero <i>Salmonella</i> .....	16
3.2 Genes de virulência.....	18
3.2.1 Gene <i>hilA</i> .....	18
3.2.2 Gene <i>invA</i> .....	18
3.2.3 Gene <i>sefA</i> .....	19
3.2.4 Gene <i>pefA</i> .....	19
3.2.5 Gene <i>spvC</i> .....	19
3.3 Resistência aos antimicrobianos.....	20
3.4 Antimicrobianos naturais.....	22
3.4.1 Bacteriocinas.....	23
3.4.2 Extrato de plantas.....	23
3.5 Formação de biofilmes.....	24
4 Material e Métodos.....	27
4.1 Isolados bacterianos.....	27
4.2 Extração do DNA bacteriano.....	27
4.3 Confirmação do gênero <i>Salmonella</i> .....	28
4.4 Presença de genes de virulência.....	28



4.5 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos.....	29
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio.....	30
4.7 Presença de genes de resistência.....	30
4.8 Suscetibilidade aos antimicrobianos naturais.....	32
4.8.1 Bacteriocina.....	32
4.8.2 Extrato de <i>Butia odorata</i> .....	33
4.9 Formação de biofilmes.....	33
5 Resultados.....	35
5.1 Confirmação do gênero <i>Salmonella</i> .....	35
5.2 Presença de genes de virulência.....	35
5.3 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos.....	35
5.4 Determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio.....	36
5.5 Presença de genes de resistência.....	36
5.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos naturais.....	37
5.6.1 Bacteriocina.....	37
5.6.2 Extrato de <i>Butia odorata</i> .....	38
5.7 Formação de biofilmes.....	40
6 Discussão.....	41
7 Considerações finais.....	47
Referências.....	48
Apêndices.....	65



## 1 Introdução

As bactérias do gênero *Salmonella* são patogênicas aos humanos e animais, e estão entre os micro-organismos mais comumente envolvidos em doenças transmitidas por alimentos (DTA) (BRASIL, 2016; CDC, 2011; MADIGAN, 2004). As DTA são caracterizadas pela ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos ou toxinas por eles produzidas (BRASIL, 2001). De acordo com o Ministério da Saúde (2016), de 2007 até a metade de 2016 foram notificados 6.632 surtos de DTA no Brasil, com um total de 118.104 doentes e 17.186 hospitalizados. Dentre os micro-organismos identificados, as bactérias estiveram presentes em 90,5% dos casos, sendo *Salmonella* spp. a mais envolvida (BRASIL, 2016).

A salmonelose é uma infecção alimentar causada por *Salmonella* spp. e está principalmente associada aos alimentos de origem animal, como carnes e ovos (MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2009). Os sintomas e a gravidade da salmonelose variam de acordo com o sorotipo e a saúde do hospedeiro, sendo que gestantes e idosos são mais sensíveis às infecções. Normalmente, em casos de doenças auto-limitantes, como gastroenterite, não é necessário o uso de antimicrobianos (CHAITRAM; JEVITT; TENOVER, 2003).

No entanto, os antimicrobianos são utilizados em casos mais graves, e apesar da suscetibilidade do patógeno frente aos antimicrobianos, muitos isolados envolvidos em surtos de salmonelose apresentam perfil de resistência, e muitas vezes de multirresistência, dificultando o tratamento da doença (DIAS et al., 2013; OLIVEIRA, 2005). Assim, é importante a identificação fenotípica e genotípica do perfil de resistência aos antimicrobianos, possibilitando buscar alternativas, como os antimicrobianos naturais, como estratégia para a utilização em alimentos prevenindo a multiplicação de patógenos multirresistentes (BURT, 2004; OLIVEIRA, 2005).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos gera preocupação, uma vez que estão amplamente distribuídos na natureza, tendo como reservatório natural o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo humanos, bem como animais de sangue frio (ALLERBERGER et al., 2002; JAY, 2005). A legislação brasileira preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de qualquer tipo de alimento, por causa do risco de salmonelose (BRASIL, 2001). A identificação fenotípica da presença de *Salmonella* spp. em alimentos é importante para que sejam adotadas

medidas de controle nos ambientes de processamento bem como na manipulação de alimentos, possibilitando a diminuição de surtos envolvendo esse patógeno. Além disso, a identificação genotípica também é importante e deve estar associada à identificação fenotípica para a confirmação do gênero (MONTEIRO, et al., 2016). Ainda, após a confirmação da presença de *Salmonella*, podem ser analisados genes de virulência para determinar o potencial de virulência dos isolados (CHAUDHARY et al., 2015).

Outro fator de virulência importante em *Salmonella* spp. é capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas e bióticas (WINFIELD; GROISMAN, 2003). O biofilme ocorre em quatro etapas: adesão das células planctônicas a uma superfície, expansão, maturação e dispersão (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Nos biofilmes, as bactérias são capazes de resistir às condições de estresse, bem como aos antimicrobianos e desinfetantes (HOIBY et al., 2010; JENSEN et al., 2010).

Diante do exposto, objetivou-se determinar o perfil de resistência a antimicrobianos em 26 isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento, bem como a presença de genes de resistência e virulência. Ainda objetivou-se avaliar a capacidade de formação de biofilmes pelos isolados e a sua suscetibilidade frente a antimicrobianos naturais.



## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos, componentes de ração animal e ambientes de processamento, detectar a presença de genes de resistência e virulência, determinar a capacidade de formação de biofilmes e verificar a suscetibilidade dos isolados multirresistentes a antimicrobianos naturais.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Confirmar o gênero *Salmonella* através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- b) Avaliar a presença de genes de virulência;
- c) Determinar a resistência a antimicrobianos nos isolados de *Salmonella* spp.;
- d) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cloreto de benzalcônio nos isolados de *Salmonella* spp.;
- e) Avaliar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos;
- f) Determinar a sensibilidade ao sobrenadante livre de células de *Lactobacillus curvatus* LC254 nos isolados multirresistentes;
- g) Determinar a sensibilidade ao extrato de *Butia odorata* nos isolados multirresistentes;
- h) Avaliar a capacidade de formação de biofilmes nos isolados multirresistentes de *Salmonella* spp.





### 3 Revisão bibliográfica

#### 3.1 Características do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* se caracteriza por bactérias com morfologia de bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, não produtores de esporos e móveis pela produção de flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares Pullorum e Gallinarum. São micro-organismos que apresentam multiplicação na faixa de 35 °C a 40 °C, sendo a temperatura ótima de 37 °C, pH na faixa entre 6,5 e 7,5 e atividade de água com valores entre 0,94 e 0,99 (JAY, 2005).

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (BRENNER et al., 2000). Foi proposta a inclusão de mais uma espécie, *S. subterranea*, isolada em coleta de sedimento de uma região aquífera nos Estados Unidos da América (SHELOBOLINA et al., 2004; BAILEY et al., 2010). Porém, a espécie apresenta similaridade de 96,4% com *S. bongori*, fato pelo qual a comunidade científica não entrou em consenso sobre a sua inclusão (BAILEY et al., 2010).

*Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies designadas por nomes ou algarismos romanos, são elas: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV), *S. enterica* subespécie *indica* (VI). *Salmonella bongori* apresenta apenas uma subespécie, *bongori* (V) (GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

O esquema de Kauffman-White ainda classifica os membros do gênero *Salmonella* de acordo com os sorotipos e sorovares, baseando-se na diferenciação de antígenos somáticos (O), flagelares de fase 1 e fase 2 (H1 e H2) e capsulares (VI) presentes. São conhecidos mais de 2.600 sorovares de *Salmonella*, dos quais a maior parte é formado por *S. enterica* subsp. *enterica*, que possui o maior número de sorovares responsáveis pelas enfermidades em humanos e animais (BAILEY et al., 2010; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído na natureza, sendo o seu reservatório os animais de sangue quente, incluindo o trato intestinal humano (ALLERBERGER et al., 2002; JAY, 2005). São principalmente associados aos produtos cárneos, como linguiças produzidas a partir de diversos tipos de carne,

salsichão, morcela, toucinho e carnes resfriadas (DORTA; KADOTA; NAKAMATS, 2015; SPRICIGO et al., 2008). A contaminação de diversos alimentos pode ser associada à contaminação cruzada, onde o manipulador pode contaminar outros alimentos após a manipulação de um produto contaminado. Essa contaminação pode ser associada à falta de higiene com as mãos e utensílios utilizados no preparo de alimentos, tanto nas indústrias como nas residências, bem como a falta de treinamento dos manipuladores na indústria (SOARES; ALMEIDA; NUNES, 2016).

A transmissão aos humanos ocorre geralmente pela ingestão de alimentos contaminados com o micro-organismo, sendo que a dose infectante pode variar de  $10^7$  a  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, da virulência do sorovar e da composição química do alimento carreador (FAVRIN; JASSIM; GRIFFITHS, 2001; JAY, 2005). Porém, de acordo com a legislação, a presença de 1 UFC já torna o alimento inapropriado para consumo, sendo preconizada a ausência do micro-organismo em 25 g do alimento analisado (BRASIL, 2001). Após a ingestão do alimento, *Salmonella* spp. é capaz de sobreviver ao pH ácido do estômago, passando por ele e penetrando no epitélio intestinal, localizando-se nas camadas epiteliais mais profundas (OLIVEIRA, 2005; ABRAHAMS; HENSEL, 2006).

As doenças causadas por *Salmonella* variam de acordo com o sorotipo que causou a infecção e podem ser divididas em três grupos: febre tifoide, febre paratifoide e salmoneloses. A transmissão da febre tifoide ocorre pelo consumo de alimentos ou água contaminados com fezes ou urina de doentes, portadores ou oligossintomáticos, uma vez que o único reservatório e hospedeiro natural de *S. Typhi* é o homem (LAMBERTUCCI; NOBRE JÚNIOR; ÁVILA, 2005). O tratamento é realizado com o uso de antimicrobianos, porém, há resistência a antimicrobianos de uso comum. A febre paratifoide é semelhante a febre tifoide, porém, apresenta sintomas mais brandos, e é causada por *S. Paratyphi* A, B e C (CDC, 2016). A salmonelose é a forma clínica mais comum, causada por sorovares não tifoides, caracterizada por gastroenterites, uma vez que os sintomas costumam aparecer entre 12 a 72 horas após a ingestão de alimento contaminado (RAFFATELLU et al., 2008). Por se tratar de uma doença auto-limitante, normalmente não é necessário o tratamento com antimicrobianos, apenas a reposição de fluidos, sendo que os sintomas costumam desaparecer em 4-7 dias (CHAITRAM; JEVITT; TENOVER, 2003). Entretanto, em casos mais severos pode ser necessário hospitalização e antibioticoterapia para o tratamento dos sintomas clínicos.

### 3.2 Genes de virulência

Bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. apresentam um mecanismo de patogenicidade regulado por fatores de virulência. Possuem e expressam genes que codificam esses fatores, diferenciando, desta forma, micro-organismos patogênicos de não patogênicos (VIEIRA, 2009). Os fatores de virulência favorecem a colonização no hospedeiro, alterando sua fisiologia e, conseqüentemente, o aparecimento dos sintomas, caracterizando as doenças (VIEIRA, 2009).

Todos os sorotipos de *Salmonella* spp. são considerados potencialmente patogênicos, porém, existem algumas diferenças na sua virulência (KARASOVA et al., 2009). Essas diferenças podem ser relacionadas com a capacidade de perder e adquirir novos fatores de virulência durante o tempo, através da adaptação a novos ambientes e hospedeiros (SUEZ et al., 2013).

#### 3.2.1 Gene *hilA*

O gene *hilA* está localizado em uma região altamente conservada do genoma de *Salmonella* spp., e dessa forma vem sendo utilizado para a identificação do gênero *Salmonella*. Crăciunaș et al. (2012) utilizaram esse gene para identificar diferentes sorovares de *Salmonella*, sendo encontrado em 100% dos isolados analisados.

Esse gene codifica a proteína HilA, regulando uma das fases mais importantes da patogênese de *Salmonella* spp., que é a fase de invasão celular e apoptose dos macrófagos (BODDICKER; KNOSP; JONES, 2003).

#### 3.2.2 Gene *invA*

O gene de virulência *invA* é encontrado nos diferentes sorovares de *Salmonella*, e é considerado um gene conservado, podendo ser utilizado como padrão para identificação de *Salmonella* spp. pela técnica de PCR (AMINI et al., 2010; MALORNY et al., 2004).

Esse gene codifica a proteína InvA, presente na membrana interna da bactéria, sendo responsável pela invasão das células epiteliais do hospedeiro. Em

estudo anterior foi confirmado que a função do gene é aumentar a capacidade de invasão (GALÁN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992).

### 3.2.3 Gene *sefA*

O operon *sef* (*Salmonella Enteritidis Fimbriae*) é composto por quatro genes: ABCD. O gene *sefA* é um desses genes, sendo responsável pela translocação e formação da fímbria SEF14 que tem função na etapa de infecção, posterior a colonização do epitélio intestinal, e é considerada essencial na aderência e sobrevivência bacteriana em macrófagos (EDWARDS; SCHIFFERLI; MALOY, 2000). Esse gene codifica a subunidade proteica SefA da fímbria, além disso, está envolvido na adesão de *Salmonella* a certas regiões do trato gastrointestinal, como nas placas de Peyer do intestino delgado (LIU et al., 2011).

### 3.2.4 Gene *pefA*

Friedrich et al. (1993) identificaram um segmento de 13,9 kb em um plasmídeo de 90kb, o qual codifica proteínas de membrana externa envolvidas na biossíntese de fímbrias em bactérias entéricas. Nessa mesma região se encontra o operon *pef* (*Plasmid encoded fimbriae*), que é composto por quatro genes: A, B, C e D.

As fímbrias auxiliam na colonização das células intestinais através da ligação a regiões específicas e contribuem para o acúmulo de fluidos intestinais, causando diarreia líquida (BAÜMLER et al., 1996; CHU; CHIU, 2006).

### 3.2.5 Gene *spvC*

*Salmonella* spp. possui uma região altamente conservada de 8 kb, formada pelo operon *spv* (*Salmonella Plasmid Virulence*), possuindo 5 genes: R, A, B, C e D (HONG et al., 2008; PAESOLD et al., 2002). Esta região é responsável por potencializar a disseminação sistêmica do patógeno nas células do hospedeiro (HEITHOFF et al., 2008).

### 3.3 Resistência a antimicrobianos

Drogas antimicrobianas atuam sobre os micro-organismos alterando processos importantes de sobrevivência, como a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica nos ribossomos, inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática, alterações na síntese dos ácidos nucleicos e alteração nos metabolismos celulares (MADIGAN et al., 2016; NEU, 1992).

A resistência adquirida aos antimicrobianos é a capacidade de um micro-organismo em resistir a um agente antimicrobiano ao qual seria normalmente sensível, resultando em tratamentos ineficazes, possibilitando infecções persistentes e a transferência da resistência para outros micro-organismos. Já a resistência natural ocorre quando a espécie bacteriana é resistente a um determinado antimicrobiano (MADIGAN et al., 2004). Os principais mecanismos que levam à resistência são a inativação enzimática da molécula antimicrobiana, a alteração do alvo celular, efluxo do antimicrobiano e a alteração da permeabilidade reduzindo o nível intracelular do antimicrobiano (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

Pode-se classificar a resistência aos antimicrobianos como intrínseca, adquirida e adaptativa (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A resistência intrínseca ou natural se compreende como todas as propriedades naturais fornecidas pelas características de um micro-organismo que limitam a ação dos agentes antimicrobianos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A resistência adquirida se caracteriza quando um micro-organismo anteriormente sensível a determinado antimicrobiano, passa a ser resistente pela aquisição de novo material genético, através de plasmídeos, *transposons* e DNA puro, ou ainda como resultado de mutações (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A resistência adaptativa é um aumento temporário da capacidade bacteriana em sobreviver a uma injúria devido a alteração nos genes e/ou expressão de proteínas, como resultado da exposição a fatores ambientais (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Isolados de *Salmonella* spp. com perfil de resistência e muitas vezes de multirresistência, a qual se caracteriza pela resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (EFSA, 2013), representam um problema de saúde pública. O uso de antimicrobianos em animais de produção é uma das possíveis causas de isolados de *Salmonella* com perfil de resistência (SILVA; DUARTE, 2002). Vários estudos avaliando o perfil de resistência de isolados de *Salmonella* em alimentos

vem sendo realizados, demonstrando altas taxas de resistência (ALALI et al., 2010; CARRAMIÑANA et al., 2004; DUARTE et al., 2009; SAKARIDIS et al., 2011; SOUZA et al., 2010).

A sensibilidade de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos varia de acordo com o sorotipo (CARRAMIÑANA et al., 2004; MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2009). Poucos anos atrás os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento das salmoneloses eram a ampicilina, o cloranfenicol e o sulfametoxazol-trimetoprim (MUTHU et al., 2011). Com o surgimento de resistência a esses antimicrobianos, o seu uso foi reduzido e estes foram gradualmente substituídos por fluorquinolonas, como a ciprofloxacina (SOUZA et al., 2010). O surgimento recente de isolados resistentes a ciprofloxacina representa um grave problema de saúde pública, limitando o tratamento atualmente disponível para salmonelose (LINDGREN et al., 2009; MUTHU et al., 2011).

Bactérias patogênicas com perfil de resistência, como *Salmonella*, geralmente apresentam genes de resistência para as diferentes classes de antimicrobianos (GLENN et al., 2013). Diferentes sorovares multirresistentes de *Salmonella* obtidos de animais, alimentos e humanos nos Estados Unidos da América e Canadá, apresentaram os genes de resistência associados à tetraciclina, onde foram detectados alguns genes como *tetA* e *tetB*, sendo que o gene *tetA* foi detectado em 80% dos isolados (GLENN et al., 2013). Muitos genes de resistência associados as tetraciclinas estão localizados em elementos genéticos móveis. Em bactérias Gram-negativas, os genes *tet* estão frequentemente localizados em plasmídeos conjugativos, explicando a grande disseminação desses genes entre bactérias (HENTSCHKE et al., 2010; VILACOBIA et al., 2013).

A resistência às sulfonamidas em *Salmonella* tem sido atribuída ao gene *sul*, onde são identificados três principais genes: *sul1*, *sul2* e *sul3* (VAN HOEK et al., 2011). A resistência à trimetoprima é atribuída à expressão da variante resistente da enzima diidrofolato redutase, e de acordo com a estrutura, essas enzimas são subdivididas em duas famílias, que são codificadas pelos genes *dfrA* e *dfrB* (VAN HOEK et al., 2011).

Segundo BUFFET-BATAILLON et al. (2012), a resistência aos antimicrobianos pode estar relacionada com a resistência aos desinfetantes. Uma vez que nas indústrias de processamento de alimentos são utilizados desinfetantes, como o cloreto de benzalcônio, com a função de eliminar micro-organismos existentes,

podem surgir isolados com perfil de resistência a este composto. O uso excessivo desses desinfetantes pode gerar uma pressão seletiva, tornando micro-organismos resistentes a esses agentes, induzindo a seleção de bactérias resistentes tanto aos antimicrobianos bem como aos desinfetantes, caracterizando a ocorrência de resistência cruzada (BJORLAND; SUNDE; WAAGE, 2001; BUFFET-BATAILLON et al., 2012; SUNDHEIM et al., 1998).

A caracterização genotípica e o monitoramento da resistência representam importantes ferramentas na epidemiologia de *Salmonella* spp., permitindo maior controle sobre a disseminação de sorovares de importância em saúde pública, além da escolha de um tratamento eficaz (BRASIL, 2012). Essa compreensão ainda revela a necessidade da busca por novos métodos de tratamento dos sintomas clínicos de doenças causadas por *Salmonella*, a necessidade de controle no uso de agentes antimicrobianos em animais de produção, bem como a utilização de antimicrobianos de origem natural na conservação de alimentos.

### **3.4 Antimicrobianos naturais**

A partir do surgimento de patógenos resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados, houve um aumento no interesse por antimicrobianos naturais, bem como sua aplicação em alimentos como produtos cárneos a fim de prolongar a vida de prateleira e preservar a qualidade (WORAPRAYOTE, et al., 2016).

O uso de conservantes químicos na indústria de alimentos tem sido questionado pelo potencial efeito tóxico e carcinogênico (SCHAUBSCHLÄGER et al., 1991; TOMPKIN, 2005), evidenciando a vantagem do uso de antimicrobianos naturais como conservantes. Segundo BALCIUNAS et al. (2013), os consumidores estão buscando alternativas mais naturais, buscando alimentos sem a adição de conservantes sintéticos, podendo utilizar na biopreservação, extensão da vida útil de produtos e ainda para ação antimicrobiana contra patógenos de importância clínica, inibindo inclusive micro-organismos multirresistentes. Atualmente estão liberados para aplicação em carnes e produtos cárneos as substâncias antimicrobianas lisozima, lactoferrina e nisina (DAVIDSON; BRANEN, 2005).

### 3.4.1 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular, apresentando ação bactericida ou bacteriostática sobre diversos micro-organismos (JACK; TAGG; RAY, 1995). Podem ser sintetizadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, porém, só é permitido o uso comercial de bacteriocinas oriundas de bactérias ácido lácticas (BAL) (ARTHUR; CAVERA; CHIKINDAS, 2014). O interesse pelas bacteriocinas produzidas por BAL teve crescimento nas últimas décadas, o que se deve ao seu potencial de utilização na conservação de alimentos e como alternativa na antibioticoterapia (CLEVELAND et al., 2001; COTTER; ROSS; HILL, 2013; VAN HELL; MONTALBAN-LOPEZ; KUIPERS, 2011).

As bacteriocinas podem ser classificadas em duas principais classes, classe I: lantibióticos e classe II que pode ser subdividida em quatro grupos (IIa, IIb, IIc, e IId) (WORAPRAYOTE, et al., 2016). Em sua maioria, são termoestáveis e estáveis ao longo de uma ampla faixa de pH (2,0 a 10) (CLEVELAND et al., 2001). Um exemplo de bacteriocinas são as sakacinas, produzidas por linhagens de *Lactobacillus* spp., as quais apresentam atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes*. Entre as bacteriocinas dessa classe, a Sakacina P é a que tem sido mais investigada (COCOLIN; RANTSIOU, 2007).

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode ser dividido entre aquelas que apresentam atividade principalmente no envelope celular e aquelas ativas nas células afetando a expressão de genes e a produção de proteínas (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

### 3.4.2 Extrato de plantas

Compostos naturais comumente encontrados em plantas, ervas e temperos têm apresentado funções antimicrobianas e podem ser uma fonte de agentes antimicrobianos contra patógenos de origem alimentar (AL-REZA et al., 2010). Existe interesse no uso de compostos antimicrobianos naturais como agentes para conservação de alimentos e bebidas, inibindo ou controlando a multiplicação de micro-organismos patogênicos através de propriedades antimicrobianas,



bacteriostáticas e antioxidantes (NYCHAS; TASSOU; SKANDAMIS, 2003; SHAN et al., 2007).

As plantas possuem vias de metabolismo secundário, as quais originam diversos compostos, como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos entre outros, podendo ser específicos de determinadas famílias, gênero ou espécies, e podem ser aplicadas na biomedicina e indústrias de alimentos (COWAN, 1999). Entretanto, a quantidade e qualidade desses compostos podem ser amplamente influenciadas pelos fatores climáticos, como temperatura, água, idade da planta, radiação ultra violeta (UV), altitude e patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários podem fazer parte da produção de medicamentos, fragrâncias, corantes e inseticidas (TOSS, 2010). O Brasil é um dos países com a maior biodiversidade, e essa biodiversidade permite a busca por novos produtos. Com o aumento do perfil de resistência de bactérias aos antimicrobianos sintéticos, a investigação de compostos naturais de plantas, como extratos de plantas e óleos essenciais, tem se tornado uma importante estratégia para descoberta de novas classes de antimicrobianos naturais para a preservação de alimentos (BURT, 2004). Além da preservação, os pesquisadores também propõem fazer o uso dessas substâncias antimicrobianas para controlar micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos pelos alimentos (BURT, 2004).

Uma das plantas que apresenta esse potencial é o *Butia odorata*, pertencente ao gênero *Butia*. No Brasil, o gênero *Butia*, dividido em diversas espécies e subespécies, se encontra nas regiões sudeste, centro-oeste e sul, podendo ocorrer ainda no Uruguai, Argentina e Paraguai (HENDERSON, GALEANO e BERNAL, 1995; LORENZI et al., 2004). *Butia odorata*, assim como outras plantas, apresenta metabólitos secundários que podem exercer atividade antimicrobiana sobre micro-organismos patogênicos, porém, não há trabalhos publicados que indicam esta propriedade antimicrobiana.

### **3.5 Formação de biofilmes**

Biofilmes podem ser definidos como comunidades estruturadas de células bacterianas envoltas em uma matriz polimérica produzida por elas, aderidas a

superfícies bióticas ou abióticas (DONLAN; COSTERTON, 2002; HALL-STOODLEY et al., 2006).

As bactérias presentes nos biofilmes estão, geralmente, protegidas de condições de estresse, como antibióticos, desinfetantes e sistema imune do hospedeiro, conseqüentemente, são extremamente difíceis de serem erradicadas (BURMOLLE et al., 2010; HOIBY et al., 2010; JENSEN et al., 2010).

*Salmonella* spp. é um dos micro-organismos com capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (WINFIELD; GROISMAN, 2003). A formação de biofilmes ocorre em quatro etapas. Primeiro ocorre a adesão das células em sua forma livre sobre a superfície, ocorre uma interação célula-superfície através de ligações fracas, as quais passam a produzir uma matriz polimérica, é considerada a única etapa reversível na formação dos biofilmes. Assim ocorre a sua expansão pelo aumento da densidade populacional e a adesão de células planctônicas secundárias. Na maturação, além do aumento populacional e a produção da matriz polimérica, ocorre o aumento das ligações célula-célula e célula-superfície, tornando irreversível a formação dos biofilmes, após esse período, células planctônicas podem se desprender do biofilme, colonizando superfícies adjacentes e formando outros biofilmes, bem como podem causar contaminação de alimentos manipulados sobre a superfície (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

JOSEPH et al. (2001) demonstraram a capacidade de *S. Weltevreden* em formar biofilmes sobre superfícies de plástico, cimento e aço inoxidável. STEPANOVIC et al. (2004) testaram a capacidade de formação em 122 isolados de *Salmonella* spp. isolados de humanos, animais e alimentos, e observaram que todos apresentavam capacidade de formar biofilmes em microplacas de poliestireno.

Estirpes de *Salmonella* que se apresentam em comunidades de biofilmes são mais resistentes, o que permite a sobrevivência em ambientes abióticos e a disseminação do patógeno em determinadas superfícies (STEENACKERS, et al., 2012). VESTBY et al. (2009) encontraram uma correlação entre a capacidade de formação de biofilmes em 111 isolados de *Salmonella* isolados de ração e fábricas de ração para peixes e sua persistência no ambiente da fábrica. Assim, a persistência de *Salmonella* spp. em indústrias de alimentos podem contaminar diversos alimentos que chegam ao consumidor podendo causar infecções,

demonstrando a importância da investigação da capacidade de formação de biofilmes.



## 4 Material e Métodos

### 4.1 Isolados bacterianos

Foram selecionados 26 isolados de *Salmonella* spp. da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPel) oriundos de alimentos (n=15), componentes de ração animal (n=5) e ambientes de processamento (n=6).

Os isolados foram previamente sorotipados pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 4.2 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada pelo método de pérolas de vidro, adaptado a partir de GREEN e SAMBROOK (2012).

Os 26 isolados e as cepas padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *S. Enteritidis* ATCC 13076 foram cultivados em 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Himedia®) durante 24 horas a 37 °C. Após a incubação o cultivo foi centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm. O *pellet* formado foi ressuspensionado em 100 µL de STES [Tris-HCl 0,2 M; NaCl 0,5 M; SDS 0,1 %; EDTA 0,01 M; pH 7,6] (Synth®) e foram adicionados 100 µL de pérolas de vidro (pérolas de zircônia/sílica 0,1 mm, BioSpec) e 150 µL de fenol-clorofórmio (1:1) (Synth®). Após, a mistura foi homogeneizada em vortex por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, foram coletados 80 µL do sobrenadante, sendo precipitado com etanol absoluto (Synth®) (2 vezes o volume) e NaCl 5M (Synth®) (0,1 vez o volume inicial). A mistura foi incubada a -70 °C durante 30 minutos, com posterior centrifugação por 20 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado 2 vezes com 125 µL de álcool 70% (Synth®), em seguida, foi colocado para secar a 37 °C. O DNA foi eluído com 35 µL de água ultrapura e adicionado 1 µL de RNase (10 µg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen™). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Eppendorf®) e diluídas a 10 ng.µL<sup>-1</sup>, sendo armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

### 4.3 Confirmação do gênero *Salmonella*

A confirmação do gênero foi realizada pela técnica de PCR, identificando a presença do gene *hilA*. Para a PCR foi utilizado Go Taq® Green Master Mix (Promega®), de acordo com instruções do fabricante. Foram adicionados, em cada microtubo 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix (2X), 1 µL do *primer hilA forward*, 1 µL do *primer hilA reverse*, 8,5 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA a 10 ng.µL<sup>-1</sup>. Utilizou-se, como controle positivo da reação, a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028. A PCR foi realizada utilizando os *primers* apresentados na Tabela 1 e as condições de amplificação para os genes avaliados seguiram os protocolos descritos pelos autores dos respectivos *primers*.

Os produtos gerados na reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante 70 minutos, e em seguida, o gel foi analisado em fotodocumentador (Loccus®, L-Pix Touch).

### 4.4 Presença de genes de virulência

A técnica de PCR foi empregada para verificar a presença dos genes *invA*, *sefA*, *pefA* e *spvC*. Para cada reação, foi utilizado Go Taq® Green Master Mix (Promega®), de acordo com instruções do fabricante. Foram adicionados, em cada microtubo 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix (2X), 1 µL do *primer forward*, 1 µL do *primer reverse*, 8,5 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA a 10 ng.µL<sup>-1</sup>. Como controle positivo das reações foi utilizada a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028, exceto para o gene *sefA*, onde foi utilizada a cepa padrão *S. Enteritidis* ATCC 13076. A PCR foi realizada com a sequência de *primers* apresentados na Tabela 1 e as condições de amplificação para os genes avaliados seguiram os protocolos descritos pelos autores dos respectivos *primers*.

Os produtos gerados na reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante 70 minutos, e em seguida, o gel foi analisado em fotodocumentador (Loccus®, L-Pix Touch).

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para confirmação e verificação de genes de virulência em *Salmonella* spp.

Gene	Sequência (5'–3')	Produto (pb)*	Referência
<i>hilA</i>	F: GCGAGATTGTGAGTAAAAACACC R: CTGCCCGGAGATATAATAATCG	413	Craciunas et al., 2012
<i>invA</i>	F: TTGTTACGGCTATTTTGACCA R: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521	Swamy et al., 1996
<i>sefA</i>	F: GCAGCGGTTACTATTGCAGC R: TGTGACAGGGACATTTAGCG	330	Woodward e Kirwan, 1996
<i>pefA</i>	F: TTCCATTATTGCACTGGGTG R: AAGCCACTGCGAAAGATGCC	497	Haneda et al., 2001
<i>spvC</i>	F: CGGAAATACCATCTACAA ATA R: CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	Swamy et al., 1996

F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

\* pb: número de pares de bases do fragmento analisado.

#### 4.5 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

A análise da suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando ágar Mueller-Hinton (MH, Oxoid®), de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Os 26 isolados foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia®) durante 24 horas a 37 °C. Após esse período, foram diluídos em solução salina 0,85% para a escala de turbidez 0,5 de McFarland. O inóculo foi semeado em três direções com o auxílio de um *swab* sobre placas de Petri contendo ágar MH. Em seguida, foram adicionados discos impregnados com os antimicrobianos.

Foram testados 15 antimicrobianos: ampicilina 10 µg (AMP), amoxicilina/ácido clavulânico 30 µg (AMC), cefotaxima 30 µg (CTX), cefalotina 30 µg (CFL), gentamicina 10 µg (GEN), tobramicina 10 µg (TOB), estreptomicina 10 µg (STR), tetraciclina 30 µg (TET), imipinem 10 µg (IMP), cloranfenicol 30 µg (CLO), ácido nalidíxico 30 µg (NAL), ciprofloxacina 5 µg (CIP), sulfonamida 300 µg (SUL), sulfametoxazol-trimetoprim 25 µg (SUT), trimetoprima 5 µg (TRI), adquiridos da

empresa Laborclin®. Após incubação a 37 °C durante 24 horas, os halos de inibição foram medidos, sendo os isolados considerados resistentes, intermediários ou sensíveis de acordo com as normas do CLSI. Foram considerados multirresistentes, quando apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. O teste foi realizado em duplicata e como controle da técnica foi utilizada a cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### **4.6 Determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio**

A concentração inibitória mínima para cloreto de benzalcônio foi determinada de acordo com WU et al. (2015).

Os 26 isolados e a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram cultivados em TSA durante 24 horas a 37 °C. Após esse período, foram diluídos em solução salina 0,9% para a escala de turbidez 0,5 de McFarland. Foram aliqüotados 100 µL em 900 µL de solução salina 0,9%, atingindo assim uma concentração de 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. A partir dessa diluição, foi adicionado 1 µL (10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) sobre as placas de Petri contendo ágar MH com concentrações variáveis de cloreto de benzalcônio (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 e 512 µg.mL<sup>-1</sup>), com posterior incubação a 37 °C por 24 horas.

A CIM para o cloreto de benzalcônio foi determinada como sendo aquela que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata.

#### **4.7 Presença de genes de resistência**

A técnica de PCR para avaliação de genes de resistência foi realizada como descrito anteriormente (item 4.3), sendo avaliados somente os isolados que apresentaram perfil de resistência para a classe antimicrobiana do gene correspondente.

Foram analisados os genes para classe dos β-Lactâmicos (*blaZ*), aminoglicosídeos (*strA* e *strB*), tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetM*, *tetL*, *tetO* e Tn916-1545) e inibidores da síntese do folato (*sul1*, *sul2* e *dfrG*). Foram utilizadas as sequências dos *primers* apresentados na Tabela 2 e as condições de cada reação seguiram os protocolos dos autores dos respectivos *primers*.

Os produtos gerados na reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante 70 minutos, e em seguida, o gel foi analisado em fotodocumentador (Loccus®, L-Pix Touch).

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para verificação de genes de resistência em isolados de *Salmonella* spp. com perfil de resistência fenotípico a antimicrobianos.

Classe dos antimicrobianos	Gene	Sequência (5'–3')	Produto (pb*)	Referência
β-Lactâmicos	<i>blaZ</i>	F: ACTTCAACACCTGCTGCTTTC	172	Martineau et al. (2000)
		R: TGACCACTTTTATCAGCAACC		
Inibidores da síntese do folato	<i>sul1</i>	F: ATGGTGACGGTGTTCCGGCATTCTG	840	Grape et al. (2003)
		R: CTAGGCATGATCTAACCCTCGGTCT		
	<i>sul2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	Kern et al. (2002)
		R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT		
	<i>dfrG</i>	F: TTTCTTTGATTGCTGCGATG	422	Bertsch et al. (2013)
		R: CCCTTTTTGGGCAAATACCT		
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	F: GTAATTCTGAGCACTGT	953	Frech e Schwarz (2000)
		R: CCTGGACAACATTGCTT		
	<i>tetB</i>	F: ACGTTACTCGATGCCAT	1169	Frech e Schwarz (2000)
		R: AGCACTTGTCTCCTGTT		
	<i>tetK</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT	360	Strommenger et al. (2003)
		R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA		
	<i>tetL</i>	F: CAAACTGGGTGAACACTG	1028	Pang et al. (1994)
		R: CCTGTTCCCTCTGATAAA		
<i>tetM</i>	F: AGTGGAGCGATTACAGAA	158	Strommenger et al. (2003)	
	R: CATATGTCCTGGCGTGTCTA			
<i>tetO</i>	F: AATGAAGATTCCGACAATTT	781	Li et al. (2007)	
	R: CTCATGCGTTGTAGTATTCCA			



	Tn916-1545	F: GCGTGATTGTATCTCACT R: GACGCTCCTGTTGCTTCT	1028	Li et al. (2007)
Aminoglicosídeos	<i>strA</i>	F: TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG R: CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	645	Kehrenberg e Schwarz (2001)
	<i>strB</i>	F: ATCGTCAAGGGATTGAAACC R: GGATCGTAGAACATATTGGC	510	Kikuvi et al. (2007)

F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

\* pb: número de pares de bases do fragmento analisado.

#### 4.8 Suscetibilidade aos antimicrobianos naturais

A suscetibilidade aos antimicrobianos naturais foi realizada apenas com os isolados caracterizados como multirresistentes (n=7).

##### 4.8.1 Bacteriocina

A bacteriocina utilizada neste estudo é produzida pelo isolado *L. curvatus* LC254, previamente caracterizado por SEHN (2015).

Os isolados multirresistentes e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram cultivados em caldo BHI durante 24 horas a 37 °C. Foram inoculados 2 µL do cultivo em 20 mL de ágar BHI, que foram colocados, em seguida, em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram adicionados 10 µL do sobrenadante livre de células (SLC) contendo a bacteriocina, que estava armazenado a -20 °C. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e, após esse período, verificou-se a atividade da bacteriocina sobre os isolados multirresistentes, conforme LEWUS; MONTVILLE (1991). Como controle negativo, foram utilizados 10 µL de PBS e, como controle positivo, foi utilizada a cepa padrão *L. monocytogenes* ATCC 7644, devido a inibição de sua multiplicação pela bacteriocina (SEHN, 2015).

#### 4.8.2 Extrato de *Butia odorata*

O teste foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar MH (CLSI, 2015). Os isolados multirresistentes e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram cultivados em ágar TSA durante 24 horas a 37 °C. Foram diluídos em solução salina 0,85% para a escala de turbidez 0,5 de McFarland. Com o auxílio de um *swab*, o inóculo foi semeado em três direções sobre o ágar, onde foram adicionados discos de papel e, sobre esses discos, foram adicionados 20 µL de extrato polar de *Butia odorata*. Como controle do teste foi adicionado sobre a placa contendo *S. Typhimurium* ATCC 14028 um disco impregnado com o antimicrobiano estreptomicina. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, e após esse período, os halos de inibição foram medidos. O teste foi realizado em duplicata.

#### 4.9 Formação de biofilmes

Os isolados multirresistentes e a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram cultivados em ágar TSA durante 24 horas a 37 °C. Após esse período os isolados foram diluídos em solução salina 0,85% para a escala de turbidez 0,5 de McFarland. A partir dessa diluição foram aliquotados 1 mL para cada tubo contendo 9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia®) contendo cupom de aço inoxidável (AISI 304) de 1 cm<sup>2</sup>. Os tubos foram incubados a 22 °C e 10 °C, durante 48 horas. Após esse período os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de água Peptonada 0,1% (AP, Oxoid®), e ficaram imersos por 1 minuto em repouso para retirada das células planctônicas fracamente aderidas ao aço inoxidável. Em seguida, os cupons foram transferidos para tubos contendo 10 mL de AP 0,1%, e submetidos a agitação em vortex por 2 minutos para retirada das células sésseis (ROSADO, 2009 *apud* ANDRADE, et al. 1998).

A partir desse tubo foram realizadas diluições seriadas em 0,9 mL de AP 0,1%, e cada diluição foi semeada em superfície em placas contendo ágar TSA. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após esse período foi realizada a contagem das colônias em cada diluição, e posteriormente realizado o cálculo para a verificação da formação de biofilme pelos isolados. O teste foi realizado em triplicata.

**Cálculo:**

$$\text{UFC.cm}^{-2} = ((\text{VD}/\text{VA}) * \text{contagem na placa}) / \text{área}$$

VD (volume diluente): 10 mL

VA (volume alíquota): 0,1 mL

Área:  $1,0 \times 2 = 2,0 \text{ cm}^2$



## **5 Resultados**

### **5.1 Confirmação do gênero *Salmonella***

Os fragmentos do gene *hilA* utilizados para a confirmação do gênero foram amplificados e visualizados nos 26 isolados (100%), conforme demonstrado no Apêndice B.

### **5.2 Presença de genes de virulência**

Os fragmentos do gene de virulência *invA* foram amplificados nos 26 isolados (100%), enquanto que os demais genes de virulência foram amplificados em um número menor de isolados, sendo o gene *pefA* visualizado em 5 isolados (19,2%), *spvC* em 4 isolados (15,4%) e *sefA* em 1 isolado (3,8%), conforme demonstrado no Apêndice B.

### **5.3 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos**

Todos os 26 isolados (100%) foram sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, cefalotina, tobramicina, imipinem e ciprofloxacina. Foi observada resistência para sulfonamida e estreptomicina em 6 isolados (23,1%), ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol-trimetoprim e trimetoprima em 4 isolados (15,4%) e cloranfenicol em 3 isolados (11,5%). Resistência intermediária foi observada para gentamicina e estreptomicina em 2 isolados (7,7%) e para tetraciclina e sulfonamida em 1 isolado (3,8%). Multirresistência foi observada em 7 isolados (26,9%), e 15 isolados (57,7%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Os fenótipos e genótipos de resistência de cada isolado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Perfil de resistência fenotípico e genotípico a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento.

Isolados	Fenótipo de resistência	Genótipo de resistência
S1	STR -TET-SUL	<i>tetA-sul1</i>
S2	AMP-GEN-STR-CLO-NAL-SUL-SUT-TRI	-
S6	AMP-NAL-SUT-TRI	-
S9	AMP-STR-TET-CLO-SUL-SUT-TRI	<i>tetB-sul2-strA-strB</i>
S12	STR-TET-SUL	<i>tetA-sul1</i>
S13	NAL	-
S15	STR	-
S19	STR-TET-SUL	<i>tetA-sul1</i>
S20	STR	-
S23	AMP-GEN-STR-TET-CLO-NAL-SUL-SUT-TRI	<i>tetA-strA-strB-sul1</i>
S25	SUL	-

#### 5.4 Determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio

Vinte e um isolados (80,8%) apresentaram CIM igual a 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e os demais 5 isolados (19,2%) (S5, S6, S10, S23 e S25) apresentaram CIM igual a 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 5.5 Presença de genes de resistência

Dos 10 isolados com perfil fenotípico de resistência analisados, 5 (50%) apresentaram genes de resistência. Destes, 3 isolados (60%) apresentaram genes de resistência para duas classes de antimicrobianos (tetraciclina e inibidores da síntese do folato) e 2 isolados (40%) apresentaram genes de resistência para três classes de antimicrobianos (tetraciclina, inibidores da síntese do folato e aminoglicosídeos), conforme genótipo de resistência apresentado anteriormente na Tabela 3.

Todos isolados com perfil de resistência para a classe das tetraciclinas (100%) apresentaram genes de resistência para a respectiva classe, sendo o *tetA* verificado em 4 isolados (80%) e *tetB* em 1 isolado (20%). Somente 2 isolados (25%)

resistentes para a classe dos aminoglicosídeos apresentaram os genes de resistência *strA* e *strB*, sendo que ambos foram encontrados nos 2 isolados (100%). Para a classe dos inibidores da síntese do folato, 5 isolados (71,4%) apresentaram genes de resistência, sendo que *su1* foi verificado em 4 isolados (80%) e *su2* em 1 isolado (20%).

Os demais genes de resistência analisados (*blaZ*, *tetK*, *tetM*, *tetL*, *tetO*, Tn916-1545 e *dfrG*) não foram detectados em nenhum isolado resistente conforme demonstrado na Tabela 3.

## **5.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos naturais**

### **5.6.1 Bacteriocinas**

A bacteriocina presente no SLC do isolado *L. curvatus* LC254 não apresentou atividade antimicrobiana contra os isolados multirresistentes e a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028, apresentando atividade apenas contra o micro-organismo indicador *L. monocytogenes* ATCC 7644 com halo de inibição de 20 mm, conforme Figura 1.

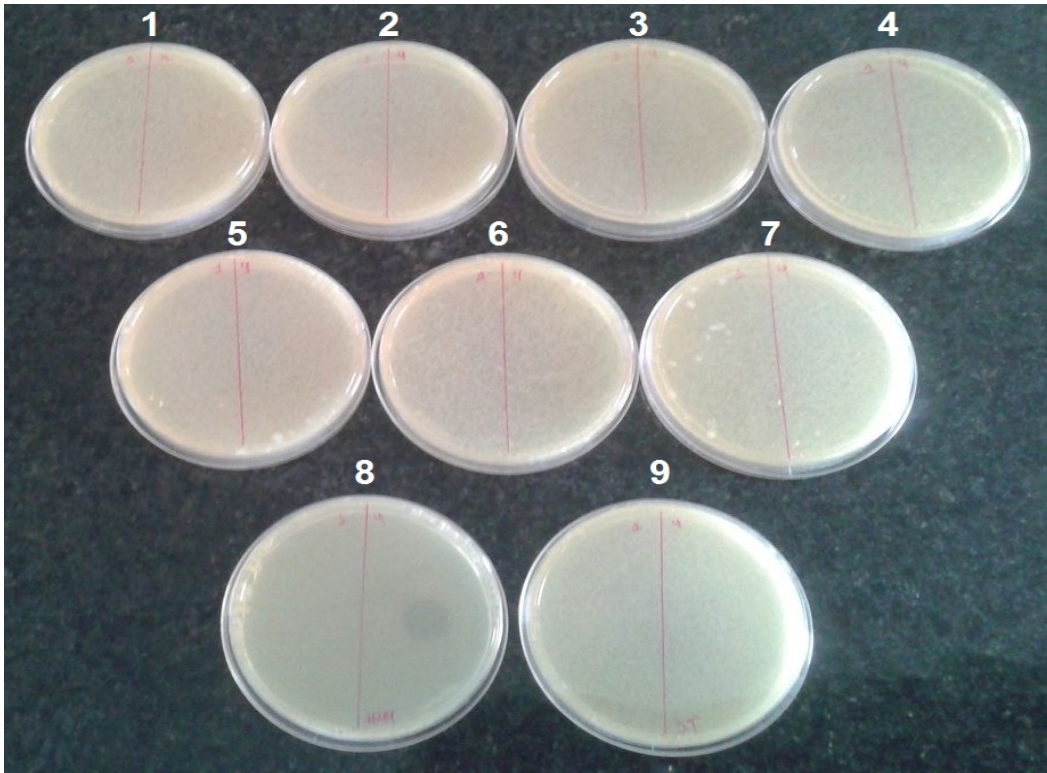


Figura 1 - Atividade antimicrobiana presente no sobrenadante livre de células de *Lactobacillus curvatus* LC254 contra isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento. 1: S1; 2: S2; 3: S6; 4: S9; 5: S12; 6: S19; 7: S23; 8: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e 9: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

### 5.6.2 Extrato de *Butia odorata*

Todos os 7 isolados multirresistentes (100%) e a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 (ST) foram inibidos pelo extrato de *Butia odorata*, conforme pode ser visualizado na Figura 2, apresentando halos de inibição entre 15,5 mm e 20,5 mm conforme a Tabela 4.

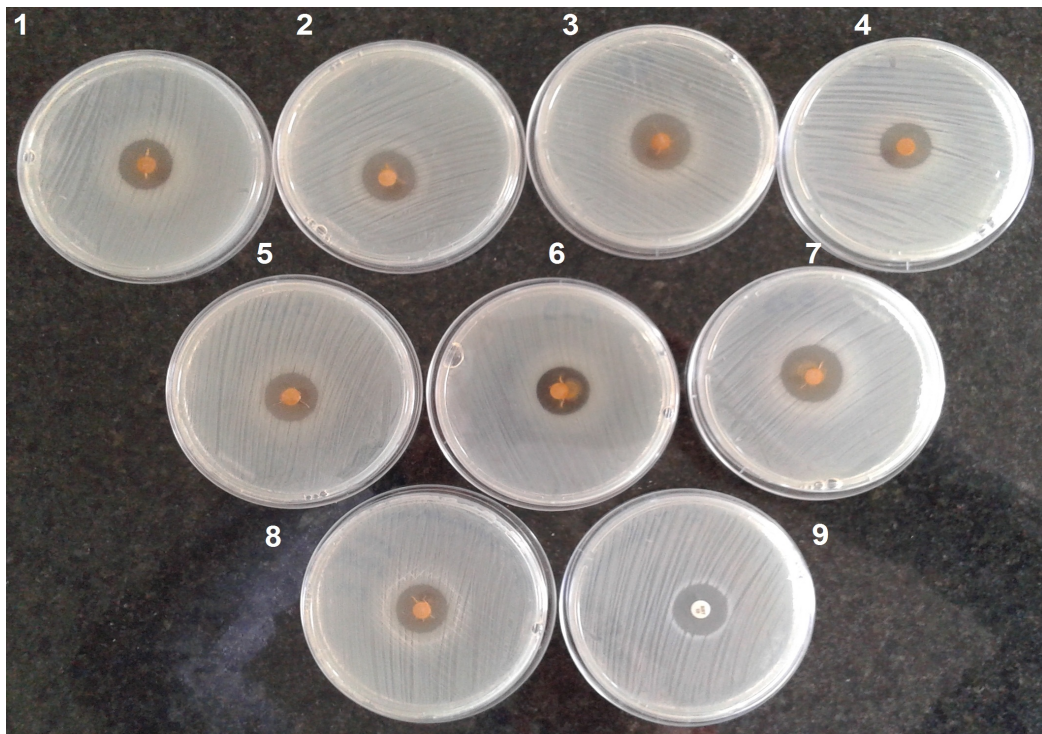


Figura 2 - Atividade antimicrobiana do extrato de *Butia odorata* contra isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento e cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. 1: S1; 2: S2; 3: S6; 4: S9; 5: S12; 6: S19; 7: S23; 8: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e 9: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 com estreptomicina

Tabela 4 - Diâmetro dos halos de inibição de isolados de *Salmonella* spp. pelo extrato de *Butia odorata*

Isolados	Diâmetro (mm)
S1	17,5
S2	16,5
S6	20,5
S9	17,5
S12	18
S19	17
S23	20
ST	15,5
ST (STR*)	19,5

\*STR: estreptomicina



### 5.7 Formação de biofilmes

Os 7 isolados multirresistentes e *S. Typhimurium* ATCC 14028 apresentaram concentrações bacterianas entre 6,65 log UFC.cm<sup>-2</sup> e 7,72 log UFC.cm<sup>-2</sup>, na temperatura de 22 °C, e entre 6,13 log UFC.cm<sup>-2</sup> e 6,81 log UFC.cm<sup>-2</sup> na temperatura de 10 °C em superfícies de aço inoxidável em 48 horas, conforme representado abaixo na Figura 3.

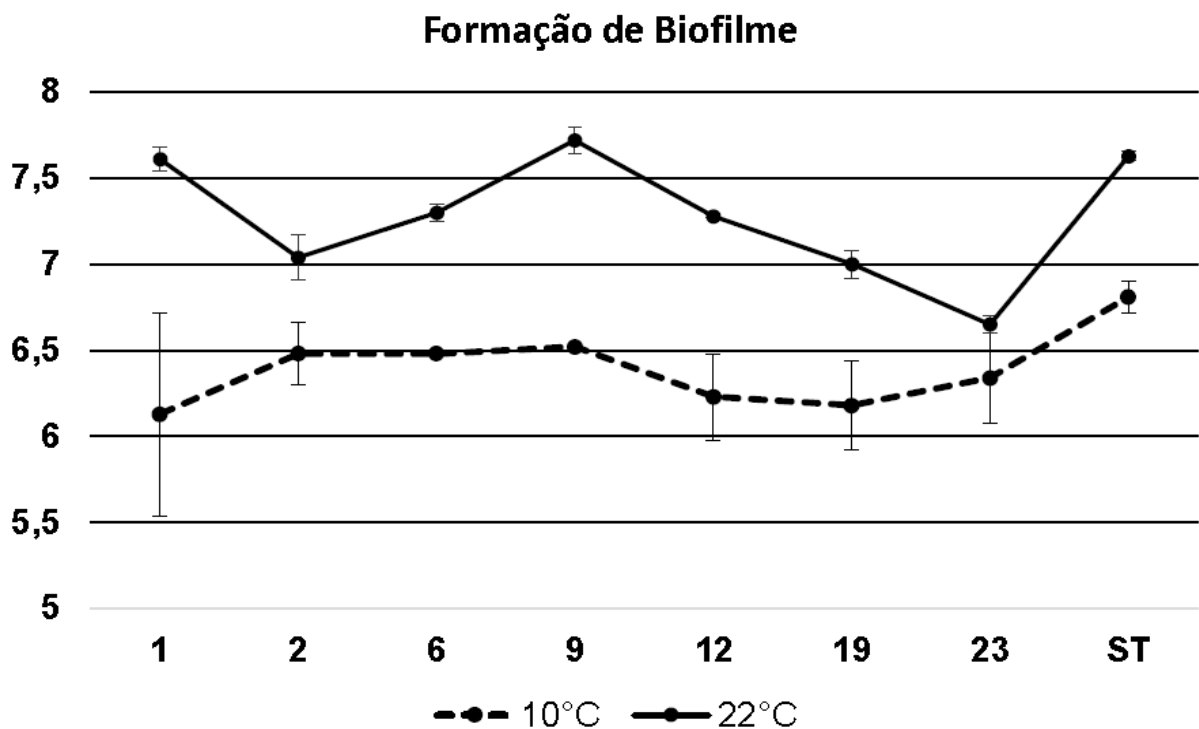


Figura 3 - Média da concentração bacteriana (log UFC.cm<sup>-2</sup>) em superfície de aço inoxidável na temperatura de 22 °C e 10 °C em isolados multirresistentes de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e ambientes de processamento

## 6 Discussão

Verificou-se a presença do gene *hilA* nos 26 isolados analisados (100%), portanto, confirmando o gênero *Salmonella* spp.. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, que confirmam a especificidade do gene *hilA* (CRĂCIUNAS et al., 2012; MARATHE et al., 2012; PATHMANATHAN et al., 2003). A presença desse gene tem relação com a fase de invasão celular e apoptose dos macrófagos (BODDICKER; KNOSP; JONES, 2003). A presença do gene *invA* em 100% dos isolados indica a capacidade de invasão das células do hospedeiro, sendo considerado um importante fator de virulência (GALÁN; GINOCCHIO; COSTEAS, 1992). Esse gene também pode ser utilizado para a identificação do gênero, pois estudos demonstram a detecção desse gene em 100% dos isolados (FAVIER et al., 2013; LI et al., 2012; NDE; LOGUE, 2008; ROWLANDS, 2008; TAFIDA et al., 2013).

Em relação aos demais genes de virulência analisados, o gene *pefA* foi identificado em 5 isolados (19,2%), resultado semelhante ao de SKYBERG, LOGUE e NOLAN (2006) e NDE e LOGUE (2008), que detectaram o gene em 17 e 22,5% dos isolados, respectivamente, enquanto ROWLANDS (2008) encontrou valores superiores, identificando o gene em 35,9% dos isolados. A presença desse gene em um menor número de isolados, indica que este é limitado a determinados sorovares, podendo ser associado à localização do gene *pefA* em plasmídeos (ROWLANDS, 2008). O gene *spvC* foi encontrado em 4 isolados (15,4%), valor inferior ao encontrado por CASTILLA et al. (2006) e DERAKHSHANDEH, FIROUZI e KHOSHBAKHT (2013), que identificaram esse gene em 92,8% e 73,3% dos isolados, respectivamente. O gene *spvC* é encontrado em plasmídeos e é responsável por aumentar a taxa de multiplicação do micro-organismo no interior da célula do hospedeiro (SWAMY et al., 1996). O gene *sefA* foi encontrado apenas em um isolado (3,8%), o que era esperado, uma vez que os genes do operon *sef* são restritos ao grupo D de *Salmonella* (AMINI et al., 2010). Esse gene é responsável pela expressão de fímbrias, que auxiliam na fixação do micro-organismo a superfície da célula do hospedeiro, e sua ausência dificulta a patogenicidade devido à dificuldade de adesão (CRĂCIUNAS et al., 2012).

No tratamento das doenças mais graves causadas por *Salmonella* spp. é necessário o uso de antimicrobianos, porém, muitos isolados apresentam perfil de

resistência e em alguns casos de multirresistência a antimicrobianos. Neste estudo, 26,9% dos isolados apresentaram perfil de multirresistência, resultado semelhante ao de PANDINI et al. (2015), que avaliaram a resistência em isolados de *Salmonella* spp. de aviários e verificaram perfil de multirresistência em 25,6% dos isolados testados. DIAS et al. (2013) e NDE e LOGUE (2008), encontraram perfil de multirresistência em percentual superior, 50% e 41,3% dos isolados, respectivamente.

Observando a resistência dos isolados de *Salmonella* para cada antimicrobiano, notou-se uma maior taxa de resistência para estreptomicina e sulfonamida (23,1%). MEDEIROS et al. (2011) também encontraram maior resistência a esses dois antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaça de frango, com resultados superiores, 78% e 58%, respectivamente. Por outro lado, MENDONÇA (2016) encontrou um menor perfil de resistência para sulfonamida, em somente 15,7% dos isolados. EL et al. (2013) verificaram resistência para estreptomicina em 32% de isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carne de peru. MEDEIROS et al. (2011) também observaram taxas de resistência semelhantes para sulfametoxazol-trimetoprim e trimetoprima em 10% dos isolados, 12% para tetraciclina e 6% para cloranfenicol, porém, encontraram resultados superiores para ácido nalidíxico e ampicilina, onde 40% e 38% dos isolados, respectivamente, apresentaram resistência. Já neste estudo, observou-se resistência de 15,4% para ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol-trimetoprim e trimetoprima e 11,5% para cloranfenicol.

Observou-se que 100% dos isolados são sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, cefalotina, tobramicina, imipinem e ciprofloxacina. Resultado semelhante foi encontrado por PANDINI et al. (2015), onde 100% dos isolados apresentaram sensibilidade a tobramicina, imipinem e ciprofloxacina. Estes autores encontraram que 23% dos isolados apresentaram resistência para cefalotina, enquanto neste estudo todos os isolados foram sensíveis. ROWLANDS (2008) também observou sensibilidade para cefalotina, cefotaxima, imipinem e ciprofloxacina em 100% dos isolados. A suscetibilidade de todos os isolados a ciprofloxacina, como para outros antimicrobianos é importante, uma vez que a ciprofloxacina é um dos antimicrobianos mais utilizados nos últimos 20 anos para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes, e tem se mostrado efetivo (KARIUKI et al., 2015).

Para a confirmação do perfil fenotípico de resistência é importante a realização de testes genotípicos, investigando a presença de genes de resistência, cuja presença desses está relacionada com a resistência fenotípica. Observou-se a presença de seis genes de resistência, *tetA* (80%), *tetB* (20%), *strA-strB* (100%), *sul1*(80%) e *sul2* (20%) em isolados que apresentaram genes de resistência para a respectiva classe de antimicrobiano. Outros autores também têm apresentado resultados elevados para a presença dos genes de resistência *tetA* (72,5% e 86,9%), *sul1* (85,7%) e *strA-strB* (73,8%), e menor presença dos genes *sul2* (57,1%) e *tetB* (34,7%) (CHEN et al., 2004; NDE; LOGUE, 2008). Observou-se a presença simultânea dos genes *strA* e *strB* em dois isolados, semelhante ao resultado observado no estudo realizado por NDE e LOGUE (2008) que avaliaram a suscetibilidade a antimicrobianos em sorovares de *Salmonella* isolados em ambiente de processamento. A presença dos genes *tetA* e *tetB* é frequente em grande número de sorovares, entretanto, a presença dos demais genes *tet* é rara (FRECH; SCHWARZ, 2000; MICHAEL et al., 2006).

A presença de isolados resistentes a antimicrobianos em alimentos representam risco, uma vez que pacientes com quadros clínicos graves de salmonelose podem necessitar de antibioticoterapia e esta não ser eficaz como tratamento (GUERRA et al., 2011).

Além da resistência a antimicrobianos, alguns isolados também podem apresentar resistência a desinfetantes utilizados em ambientes de processamento de alimentos. O cloreto de benzalcônio é amplamente utilizado para a sanitização de superfícies de utensílios e instrumentos na indústria de alimentos (UEDA; KUWABARA, 2007). O uso contínuo de desinfetantes pode causar uma adaptação ao agente e aumentar a resistência a classes antimicrobianas (ORTEGA et al., 2013). A exposição a concentrações subletais do desinfetante ainda induz a resistência ao agente utilizado (ALONSO-HERNANDO et al., 2009). Observou-se CIM de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para 5 isolados, enquanto os demais 21 isolados apresentaram CIM de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Não foram encontrados estudos que determinam qual a CIM deve ser utilizada para considerar isolados de *Salmonella* spp. resistentes ao cloreto de benzalcônio, porém, LONG et al. (2016) verificaram que os isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* eram mais resistentes ao cloreto de benzalcônio (CIM 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do que para outros desinfetantes (CIM 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), estes últimos considerados pelo autor como suscetíveis e ainda afirma que os isolados de

*Salmonella* spp. têm desenvolvido uma forte resistência ao cloreto de benzalcônio. LONG et al. (2016) também encontraram CIM de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para alguns isolados, considerados pelo autor como resistentes. Dessa forma, os 21 isolados que apresentaram CIM de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  podem ser considerados sensíveis e os 5 isolados com CIM de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , podem ser considerados resistentes.

CHUANCHUEN et al. (2008) encontraram CIM de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para a maioria dos isolados de *Salmonella* spp., sendo 41,6% de *S. enterica* oriundos de aves e 45,5% isolados de suínos. CIM de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi encontrada em uma minoria dos isolados: em 12% e 6,8% dos isolados provenientes de aves e suínos, respectivamente. Os resultados obtidos por CHUANCHUEN et al. (2008) não são semelhantes aos deste estudo, uma vez que foi encontrado um percentual maior que o CIM de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e menor que 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , observados neste estudo.

O uso de desinfetantes em indústrias de processamento de alimentos pode causar resistência adquirida aos desinfetantes em micro-organismos (ZOU et al., 2014). LONG et al. (2016) descrevem que é fundamental o estabelecimento de regras para utilização responsável de desinfetantes, bem como monitorar sorotipos e perfil de resistência em isolados de *Salmonella* spp.

O aumento da resistência a diferentes fatores de estresse, como dessecação, antimicrobianos e desinfetantes pode ser associado à persistência de *Salmonella* spp. em ambientes, devido à capacidade de isolados em formar biofilmes (STEENACKERS et al., 2012).

WIRTANEN, HUSMARK e MATTILA-SANDHOLM (1996) e RONNER e WONG (1993), consideram que micro-organismos apresentam a capacidade de formar biofilmes quando a concentração bacteriana na superfície é de 3 log UFC.cm<sup>-2</sup> e 5 log UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente. Neste estudo, observou-se concentrações bacterianas a partir de 6,65 log UFC.cm<sup>-2</sup> à 22° C e de 6,13 log UFC.cm<sup>-2</sup> à 10° C na superfície de aço inoxidável. Assim, pode-se sugerir que os isolados multirresistentes são capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, em diferentes temperaturas.

GKANA et al. (2016) observaram que *S. Typhimurium* apresentava concentrações bacterianas de 6,06 log UFC.cm<sup>-2</sup> em aço inoxidável a 20 °C. No estudo realizado por KARACA, AKCELIK e AKCELIK (2013), na temperatura de 20 °C, as concentrações bacterianas foram superiores a 6 log UFC.cm<sup>-2</sup>, enquanto nas temperaturas de 37 °C e 5° C, as concentrações ficaram acima de 4 log UFC.cm<sup>-2</sup>.

Os autores verificaram, ainda, que no segundo dia de incubação foram produzidos níveis mais elevados de biofilmes, e concluíram que 48 horas de incubação eram fundamentais para a produção dos biofilmes. Por outro lado, YANG et al. (2016) encontraram maior formação de biofilmes a 25 °C, entre 5,76 e 7,56 log UFC.cm<sup>-2</sup>, do que a 4° C, onde as concentrações microbianas foram de 5,67 e 6,76 log UFC.cm<sup>-2</sup>.

A escolha do aço inoxidável como superfície foi devido ao seu frequente uso em indústrias de alimentos. Com relação as temperaturas escolhidas, as temperaturas mais baixas são utilizadas rotineiramente para o armazenamento de diversos alimentos, enquanto as temperaturas em torno de 22 °C, são utilizadas em algumas etapas do ambiente de processamento (temperatura ambiente) (KARACA; AKCELIK; AKCELIK, 2013).

No presente estudo as concentrações bacterianas foram mais elevadas em temperatura ambiente (22° C) em relação a temperatura mais baixa (10° C), isso mostra que a temperatura ambiente é mais favorável para a formação de biofilmes pelos isolados em superfícies abióticas (YANG et al., 2016).

A habilidade de formar biofilmes pode indicar uma adaptação microbiana para persistir em ambientes abióticos, portanto, podendo contaminar alimentos e causar doenças (LAMAS et al., 2016; VESTBY et al., 2009). Assim, é necessário adotar procedimentos de limpeza mais efetivos considerando a remoção total dos biofilmes ou, ainda, impedindo a sua formação. Sabe-se que a eliminação de biofilmes com técnicas rotineiras é bastante difícil (KNIGHT; CRAVEN, 2010).

A contaminação dos alimentos na indústria por micro-organismos patogênicos é um grave problema, podendo causar doenças após a ingestão do alimento, assim, uma técnica utilizada para evitar esse problema é a aplicação de substâncias antimicrobianas de origem natural em alimentos a fim de aumentar a sua vida útil e preservar a sua qualidade (WORAPRAYOTE, et al., 2016).

Neste estudo, foram avaliados dois antimicrobianos naturais quanto à sua capacidade de inibir a multiplicação de *Salmonella* spp. O sobrenadante livre de células do cultivo de *L. curvatus* LC254, contendo a bacteriocina, não apresentou a capacidade de inibir os isolados multirresistentes. Esse resultado pode ser devido não ser comum a atividade de bacteriocinas sobre bactérias Gram-negativas, podendo ser explicado pela diferença na composição das paredes celulares entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995). A

dificuldade na ação da bacteriocina é atribuída a presença da membrana externa em bactérias Gram-negativas (ORTOLANI et al., 2010). Porém, a utilização de agentes capazes de alterar a integridade da parede celular pode reforçar a ação das bacteriocinas (MOLINOS et al., 2009).

Ao contrário do que foi observado para a bacteriocina, o extrato de *Butia odorata* inibiu a multiplicação de todos os isolados multirresistentes. Diversos estudos têm relatado o potencial de inibição de extratos de plantas sobre micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* spp., como observado neste estudo. KHAN et al. (2009) observaram que isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes foram inibidos por extratos de *Acacia nilotica* (acácia egípcia), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Cinnamum zeylanicum* (canela). KIM et al. (2011) verificaram que o extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) inibiu a multiplicação de *S. Typhimurium*, com halo de inibição de 10,5 mm. Neste estudo, o extrato de *Butia odorata* apresentou um halo de inibição 5 mm maior para *S. Typhimurium* ATCC 14028 (15,5 mm). AYACHI et al. (2009) encontraram halos de inibição com média de 19,12 mm para o extrato metanólico de *Thymus vulgaris* (tomilho) em isolados de *S. Typhimurium* e halos de inibição com médias de 7,8 mm, 7,86 mm e 7,6 mm para extratos de frutas de três diferentes plantas do gênero *Phoenix dactylifera*, pertencente à família Aracaceae, mesma família do gênero *Butia*. O extrato de *Butia odorata* avaliado neste estudo apresentou halos de inibição maiores, entre 15,5 mm e 20-5 mm, do que os encontrados por AYACHI et al. (2009) para os extratos das frutas do gênero *Phoenix dactylifera*.

Dessa maneira, os resultados obtidos demonstram que o extrato de *Butia odorata* tem potencial para ser utilizado em alimentos, inibindo ou controlando a multiplicação de micro-organismos patogênicos de importância na saúde pública, e prolongando a vida útil de alimentos pelas propriedades antimicrobianas, bacteriostáticas e antioxidantes (SHAN et al., 2007). Os consumidores estão cada dia mais atentos a segurança dos alimentos e a utilização de conservantes sintéticos, assim o uso de antimicrobianos naturais, têm se tornado uma alternativa interessante pelo potencial de aplicação de extratos de plantas como aditivos de preservação em carnes, aves, leite, frutas e vegetais (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; NORAJIT; RYU, 2012).



## 7 Considerações finais

Os isolados de *Salmonella* spp. avaliados neste estudo apresentam características genotípicas de virulência, sugerindo que apresentam potencial para causar doença. Além disso, apresentam fenótipo e genótipo de resistência para antimicrobianos, portanto, podem dificultar o tratamento nos casos mais graves de salmonelose transmitida por alimentos. Poucos isolados apresentam resistência ao cloreto de benzalcônio, o qual é amplamente utilizado na indústria de alimentos para desinfecção de superfícies abióticas, portanto, esse desinfetante demonstra ser uma boa estratégia para o controle de *Salmonella* spp. na indústria.

Os isolados multirresistentes apresentaram capacidade de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, muito utilizadas em ambientes de processamento de alimentos, podendo facilitar sua persistência nesse ambiente, contribuindo para a contaminação de outros alimentos manipulados na mesma superfície. Além disso, pode provocar o aumento na resistência a antimicrobianos, como os desinfetantes, utilizados rotineiramente nessas indústrias.

A inibição da multiplicação dos isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes pelo extrato de *Butia odorata*, indica o seu potencial de aplicação em alimentos para controlar e/ou inibir a multiplicação de micro-organismos, bem como aumentar a sua vida útil.





## Referências

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p.169–185, 1995.

ABRAHAMS, G. L.; HENSEL, M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, p. 728-737, 2006.

ALALI, W. Q.; THAKUR, S.; BERGHAUS, R. D.; MARTIN, M. P.; GEBREYES, W. A. Prevalence and distribution of *Salmonella* in organic and conventional broiler poultry Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 1363-1371, 2010.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-1050, 2007.

ALLERBERGER, F.; LIESEGANG, A.; GRIF, K., PRAGER, R.; DANZL, J.; HÖCK, F. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. **Euro Surveillance**, v. 7, p. 325, 2002.

ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. **Food Control**, v. 20, p. 1108-1111, 2009.

AL-REZA, S. M.; RAHMAN, A.; LEE, J.; KANG, S. C. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. **Food Chemistry**, v. 119, p. 981-986, 2010.

AMINI, K.; ZAHRAEI, T. S.; GHOLAMREZA, N.; REZA, R.; JAVID, A.; SHAHRNAZ, B. A. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2202-2210, 2010.

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. 833-838, 1998.

ARTHUR, T. D.; CAVERA, V. L.; CHIKINDAS, M. L. On bacteriocin delivery systems and potential applications. **Future Microbiology**, v. 9, p. 235–248, 2014.

AYACHI, A.; ALLOUI, N.; BENNOUNE, O.; YAKHLEF, G.; AMJOUR, S. D.; BOUZID, W.; ZOUGHLACHE, S. D.; BOUDJELLAL, K.; ABDESSEMED, H. Antibacterial Activity of Some Fruits; Berries and Medicinal Herb Extracts Against Poultry Strains of Salmonella. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 6, p. 12-15, 2009.

BAILEY, S.; RICHARDSON, L. J.; COX, N. A.; COSBY, D. E. *Salmonella*. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N. EDS. Pathogens and Toxins in Foods: **Challenges and Interventions**. Cap.7, p.108-118, Washington, DC: ASM Press, 2010.

BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. D; Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, v. 32, p. 134-142, 2013.

BAÜMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; BOWE, F. A.; KUSTERS, J. G.; HOFFMANN, S.; HEFFRON, F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 61–68, 1996.

BERTSCH, D.; URUTY, A.; ANDEREGG, J.; LACROIX, C.; PERRETEN, V.; MEILE, L. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene *dfpG* embedded into a Tn916 element in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 986-991, 2013.

BJORLAND, J.; SUNDE, M.; WAAGE, S. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3999–4004, 2001.

BODDICKER, J. D.; KNOSP, B. M.; JONES, B. D. Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. **Journal of Bacteriology**, v.185, p. 525-533, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária–ANVISA. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos**. Brasília. 2012. p. 171. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/>

Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 27 setembro 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>. Acesso em: 14 de setembro de 2016.

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

BUFFET-BATAILLON, S.; LE JEUNE, A.; LE GALL-DAVID, S.; BONNAURE-MALLET, M.; JOLIVET-GOUGEON, A. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2837–2842, 2012.

BURMOLLE, M.; THOMSEN, T. R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L.; HOMOE, P., et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 324–336, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food sea review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

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

CASTILLA, K. S.; FERREIRA, C. S. A.; MORENO, A. M.; NUNES, I. A.; FERREIRA, A. J. P. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 135-139, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Estimates of foodborne illness in the United States, 2011. Disponível em: [www.cdc.gov/foodborneburden](http://www.cdc.gov/foodborneburden). Acesso em: 28 setembro 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Typhoid and Paratyphoid Fever. Disponível em:

<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/typhoid-paratyphoid-fever>. Acesso em: 31 outubro 2016.

CHAITRAM, J. M.; JEVITT, L. A.; TENOVER, F. C. WHO Antimicrobial Resistance Group. The World Health Organization's External Quality Assurance System Proficiency Testing Program has improved the accuracy of antimicrobial susceptibility testing and reporting among participating laboratories using NCCLS methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2372–2377, 2003.

CHAUDHARY, J. H.; NAYAK, J. B.; BRAHMBHATT, M. N.; MAKWANA, P. P. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. **Veterinary World**, v. 8, p. 121-124, 2015.

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; SCHROEDER, C. M.; LU, R.; YANG, H.; McDERMOTT, P. F.; AYERS, S.; MENG, J. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1-7, 2004.

CHU, C.; CHIU, C. H. Evolutions of the Virulence Plasmid of nontyphoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1931-1936, 2006.

CHUANCHUEN, R.; PATHANASOPHON, P.; KHEMTONG, S.; WANNAPRASAT, W.; PADUNGTOD, P. Susceptibilities to Antimicrobials and Disinfectants in *Salmonella* Isolates Obtained from Poultry and Swine in Thailand. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 70, p. 595-601, 2008.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71 p. 1-20, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2015. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests**; Approved standard – Twenty Fifth Informational Edition. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1403-1411, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 95-105, 2013.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRĂCIUNAS, C.; KEUL, A. L.; FLONTA, M.; CRISTEA, M. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. S15-S18, 2012.

DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. Food Antimicrobials-An introduction. In P. M. DAVIDSON, J. N. SOFOS, A. L. BRANEN (Eds.), **Antimicrobials in food**, p. 1-10, 2005.

DERAKHSHANDEH, A.; FIROUZI, R.; KHOSHBAKHT. Association of Three Plasmid-Encoded *spv* Genes Among Different *Salmonella* Serotypes Isolated from Different Origins. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 106-110, 2013.

DIAS, F. S.; RAMOS, C. L.; ÁVILA, A. R. A.; SANTOS, M. R. R. M.; SCHWAN, R. F. Identification of *Salmonella* isolated from pork sausage and evaluation of thermal and antimicrobial resistance of isolates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 5070-5075, 2013.

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

DORTA, C.; KADOTA, J. C.; NAKAMATS, M. S. I. Qualidade microbiológica de carnes bovinas embaladas a vácuo e das vendidas a granel. **Revista Analytica**, n. 74, p. 58-63, 2015.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 569-573, 2009.

EDWARDS, R. A.; SCHIFFERLI, D. M.; MALOY, S. R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 97, n. 3, p. 1258-1262, 2000.

EFSA/ECDC European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2013) The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA J, 11, 1–359. Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documedoc/3196.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documedoc/3196.pdf).

EL, A. A.; RHAZI, F. F.; ESSAHALE, A.; BOUCHRIF, B.; KARRAOUAN, B.; AMEUR, N.; ABOULKACEM, A. Characterization of antimicrobial susceptibility, virulence genes and identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Salmonella* serovars isolated from turkey meat in Meknes, Morocco. **International Journal of Microbiology and Immunology Research**, v. 17, p. 068-079, 2013.

FAVIER, G. I.; ESTRADA, C. S. M. L.; OTERO, V. L.; ESCUDERO, M. E. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. **Food Control**, v. 29, p. 49-54, 2013.

FAVRIN, S. J.; JASSIM, S. A.; GRIFFITHS, M. W. Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 217-224, 2001.

FERNÁNDEZ L.; HANCOCK R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, p. 661-681, 2012.

FRECH, G.; SCHWRAZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 633-641, 2000.

FRIEDRICH, M. J.; KINSEY, N. E.; VILA, J.; KADNER, R. J. Nucleotide sequence of a 13,9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. **Molecular Microbiology**, v. 8, p. 543-558, 1993.

GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of *InvA* to Members of a New Protein Family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4338-4349, 1992.

GKANA, E. N.; GIAOURIS, E. D.; DOULGERAKI, A. I.; KATHARIOU, S.; NYCHAS, G. J. E. Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. **Food Control**, v. xx, p. 1-9, 2016.

GLENN, L. M.; LINDSEY, R. L.; FOLSTER, J. P.; PECIC, G.; BOERLIN, P.; GILMOUR, M. W.; HARBOTTLE, H.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F.; FEDORKACRAY, P. J.; FRYE, J. G. Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolated from Animals, Retail Meats, and Humans in the United States and Canada. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 175-184, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GRAPE, M.; SUNDSTRÖM, L.; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1022–1024, 2003.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. 4 edição.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9 Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur**, Paris, 2007. Disponível em: <<https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>>. Acesso em: 21 setembro de 2016.

GUERRA, P. R.; FERRAZ, S.; CAMPOS, T.; CARDOSO, M. Antimicrobial Resistance Profile and Assessment of Clonal Groups in *Salmonella* Bredeney Isolated from Pig Submandibular Lymph Nodes and Minced Meat for Sausage Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 1-6, 2011.

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

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The Antimicrobial Efficacy of Plant Essential Oil Combinations and Interactions with Food Ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91–97, 2008.

HALL-STOODLEY, L.; HU, F. Z.; GIESEKE, A.; NISTICO, L.; NGUYEN, D.; HAYES, J.; et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, p. 202–211, 2006.

HANEDA, T.; OKADA, N.; NAKAZAWA, N.; KAWAKAMI, T.; DANBAR, H. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enteric* serovar Choleraesuis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2612–2620, 2001.

HEITHOFF, D. M.; SHIMP, W. R.; LAU, P. W.; BADIE, G.; ENIOUTINA, E. Y.; DAYNES, B. R. A.; BYRNE, A.; HOUSE, J.; MAHAN, M. J. Human *Salmonella* Clinical Isolates Distinct from Those of Animal origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.10, p.1757-1766, 2008.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Field guide to the palms of the Americas. Princeton: Princeton University Press, p. 352, 1995.

HENTSCHKE, M.; CHRISTNER, M.; SOBOTTKA, I.; AEPFELBACHER, M.; ROHDE, H. Combined *ramR* mutation and presence of a Tn1721-associated *tet(A)* variant in a clinical isolate of *Salmonella enterica* serovar Hadar resistant to tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 1319-1322, 2010.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 322–332, 2010.

HONG, S. F.; CHIU, H.; CHU, C.; FENG, C.; OU, T. J. Complete nucleotide sequence of a virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Dublin and its phylogenetic relationship to the virulence plasmids of serovars Choleraesuis, Enteritidis, Typhimurium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, p. 39-43, 2008.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, p. 171–200, 1995.



JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Maryland: Aspen, 6ed, 679p., 2005.

JENSEN, P. O.; GIVSKOV, M.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 292–305, 2010.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARYNASAGAR, 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.

KARACA, B.; AKCELIK, N.; AKCELIK, M. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. **Section Cellular and Molecular Biology**, v. 68, p. 1-10, 2013.

KARASOVA, D.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Deletion of *sodCI* and *spvBC* in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 304-309, 2009.

KARIUKI, S.; GORDON, M. A.; FEASEY, N.; PARRY, C. M. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. **Vaccine**, v.33, p. C21-C29, 2015.

KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 18, p. 283-290, 2001.

KERRN, M. B.; KLEMMENSEN, T.; FRIMODT-MOLLER, N.; ESPERSEN, F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 513–516, 2002.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, A.; ALI, S. M.; SIDDIQUI, M.; KHAN, A. U. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. **Molecules**, v 14, p. 586-597, 2009.

KIKUVI, G. M.; SCHWARZ, S.; OMBUI, J. N.; MITEMA, E.S.; KEHRENBURG, C. Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, p. 62-68, 2007.

- KIM, S. Y.; KANG, D. H.; KIM, J. K.; HA, Y. G.; HWANG, J. Y.; KIM, T.; LEE, S. H. Antimicrobial Activity of Plant *Extracts Against Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. **Journal of Food Science**, v.76, p. M41-M46, 2011.
- KNIGHT G. C.; CRAVEN H. M. A model system for evaluating surface disinfection in dairy factory environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 161–167, 2010.
- LAMAS, A.; FERNANDEZ-NO, I. C.; MIRANDA, J. M.; VÁZQUEZ, B.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. M. Biofilm Formation and Morphotypes of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Differs from Those of Other *Salmonella enterica* Subspecies in Isolates from Poultry Houses. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 1127-1134, 2016.
- LAMBERTUCCI, J. R., NOBRE JUNIOR, V. A., ÁVILA, R. E. Febre tifóide. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Coura, J.R. (Ed). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 2005. p. 1343-1350.
- LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J.. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p.145–150, 1991.
- LI, Q.; CHENG, W.; ZHANG, D.; YU, T.; YIN Y.; JU, H.; DING, S. Rapid and sensitive strategy for *Salmonella* detection using an *invA* gene-based electrochemical DNA sensor. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 844-856, 2012.
- LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 86-91, 2007.
- LINDGREN, M. M.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; HURME, S.; LUKINMAA, S.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V.; SIITONEN, A.; HAKANEN, A. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* isolates from travelers, Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 809-812, 2009.
- LIU, B.; ZHANG, L.; ZHU, X.; SHI, C.; CHEN, J.; LIU, W.; HE, X.; SHI, X. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 511-518, 2011.

LONG, M.; LAI, H.; DENG, W.; ZHOU, K.; LI, B.; LIU, S.; FAN, L.; WANG, H.; ZOU, L. Disinfectant susceptibility of different *Salmonella* serotypes isolated from chicken and egg production chains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 672-681, 2016.

LORENZI, H.; MOREIRA, H. S.; TADEU, J. M. C.; SÉRGIO, L. C. C.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras: exóticas e cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 303, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 10. ed, Brasil: Artmed, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed, Brasil: Artmed, 2016.

MALORNY, B.; PACCASONI, E.; FACH, P.; BUNGE, C.; MARTIN, A.; HELMUTH, R. Diagnostic real time-PCR for detection of *Salmonella* in food. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7046-7052, 2004.

MARATHE, S. A.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, R.; NAGARAJAN, A. G.; CHAKRAVORTTY, D. Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against *hlyA* gene. **Food Control**, v. 23, p. 559-563, 2012.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; GRENIER, L.; ROY, P. H. OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 527-534, 2000.

MEDEIROS, M. A. N.; OLIVEIRA, D. C. N.; RODRIGUES, D. P.; DanielRoberto Coradi de FREITAS, R. C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, p. 555-560, 2011.

MENDONÇA, E. P. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1898-1914, 2006.

MOLINOS, A.; LÓPEZ, L. R.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A. Inhibition of *Salmonella enterica* cells in Deli-Type salad by Enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 1, p. 85–90, 2009.

MONTEIRO, A. C. M.; FORTALEZA, C. M. C. B.; FERREIRA, A. M.; CAVALCANTE, R. S.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E.; CUNHA, M. L. R. S. Comparison of methods for the identification of microorganisms isolated from blood cultures. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, p. 1-11, 2016.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, 2009.

MUTHU, G.; SURESH, A.; SUMATHY, G.; SRIVANI, R. Studies on antimicrobial susceptibility pattern of *Salmonella* isolates from Chennai, India. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.2, p. 435-442, 2011.

NDE, C. W.; LOGUE, C. M. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 215-223, 2008.

NEU, H. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v. 257 n. 5073 p. 1064-1073, 1992.

NORAJIT, Krittika; RYU, Gi-Hyung. Inhibitory Effect of Plant Extracts on *Salmonella* spp. In: *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. **InTech**. China, 2012. p. 333-348.

NYCHAS, G. J. E.; TASSOU, C. C.; SKANDAMIS, P. Antimicrobials from herbs and spices. In S. M. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. New York: Woodhead Publishers, CRC Press, p. 176-200, 2003.

OLIVEIRA, F. A. Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR - ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002. 2005. 95f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre.

ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 175–180, 2010.

ORTEGA, E. M.; FERNANDEZ-FUENTES, M. A.; GRANDE-BURGOS, M. J.; ABRIOUEL, H.; PEREZ-PULIDO, R.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 13-25, 2013.

PAESOLD, G.; GUINEY, D. G.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. **Cell Microbiology**, v.4, p.771-781, 2002.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Animal Pathology**, v. 82, p. 1-6, 2015.

PANG, Y.; BOSCH, T.; ROBERTS, M. C. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 417–422, 1994.

PATHMANATHAN, S. G.; CARDONA-CASTRO, N.; SA´NCHEZ-JIME´, M. M.; CORREA-OCHOA, M. M.; PUTHUCHEARY, S. D.; THONG, K. L. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 773–776, 2003.

RAFFATELLU, M.; WILSON, E. P.; WINTER, S. E.; BÄUMLER, A.J. Clinical pathogenesis of typhoid fever. Review Article. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, p. 260-266, 2008.

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

ROSADO, M. S. Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ROWLANDS, R. E. G. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares. 2008. 96f. Dissertação. Faculdade de Ciência Farmacêutica da Universidade de São Paulo - Ciência dos Alimentos.

SAKARIDIS, I.; SOULTOS, N.; IOSSIFIDOU, E.; KOIDIS, P.; AMBROSIADIS, I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars from chicken carcasses in Northern Greece. **Journal Food Safety**, v. 31, p. 203-210, 2011.

SCHAUBSCHLÄGER, W. W.; BECKER, W. M.; SCHADE, U.; ZABEL, P.; SCHLAACK, M. Release of mediators from human gastric mucosa and blood in adverse reactions to benzoate. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 96, p. 97-101, 1991.

SEHN, C. P. Avaliação da atividade bacteriocinogênica e características probióticas do isolado *Lactobacillus curvatus* LC254 e da utilização da sua substância antimicrobiana em filmes biodegradáveis. 2015. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 112–9, 2007.

SHELOBOLINA, E. S.; SULIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation characterization and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acide-resistant bacterium from low-pH, nitrate and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2950-2965, 2004.

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

SKYBERG, J. A.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. **Avian Diseases**, v. 50, p. 77-81, 2006.

SOARES, L. S.; ALMEIDA, R. C. C.; NUNES, E. L. Conhecimento, atitudes e práticas de manipuladores de alimentos em segurança dos alimentos: uma revisão sistemática. **Higiene Alimentar**. v. 30, p. 71-76, 2016.

SOUZA, R. B.; FERRARI, R. G.; MAGNANI, M.; KOTTWITZ, L. B. M.; ALCO CER, I.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 497-500, 2010.

SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, S. R.; ESPÍNDOLA, M. L.; FERRA, S. M. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiça frescal suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 779-785, 2008.

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, 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.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4089–4094, 2003.

SUEZ, J.; PORWOLLIK, S.; DAGAN, A.; MARZEL, A.; SCHORR, Y. I.; DESAI, P. T.; AGMON, V.; McCLELLAND, M.; RAHAV, G.; GAL-MOR, O. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-21, 2013.

SUNDHEIM, G., LANGSRUD, S., HEIR, E., HOLCK, A. L.; BESSEMS, E.; TERPSTRA, P. M. J. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 235–239, 1998.

SWAMY, S. C.; BARNHART, H. M.; LEE, M. D.; DREESEN, D. W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater and human sources. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3768-3771, 1996.

TAFIDA, S. Y.; KABIR, J.; KWAGA, J. K. P.; BELLO, M.; UMOHC, V. J.; YAKUBU, S. E.; NOK, A. J.; HENDRIKSEN, R. Occurrence of *Salmonella* in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria. **Food Control**, v. 32, p. 119-124, 2013.

TOMPKIN, R. B. Nitrite. In DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. (3 Eds.), **Antimicrobials in food**, p. 169-236, 2005.

TOSS, D. Extração de compostos fenólicos de *Butia capitata* utilizando dióxido de carbono supercrítico. 2010. 90f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

UEDA S.; KUWABARA, Y. Susceptibility of biofilm *Escherichia coli* *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. **Biocontrol Science**, v. 12, p. 149-153, 2007.

VAN HEEL, A. J.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 7, p. 675-680, 2011.

VAN HOEK, A. H.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-27, 2011.

VESTBY, L. K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L. L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p. 20, 2009.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. *O Mundo da Saúde*. São Paulo, v. 33, p. 406-414, 2009.

VILACOPA, E.; ALMUZARA, M.; GULONE, L.; TRAGLIA, G. M.; FIGUEROA, S. A.; SLY, G.; FERNÁNDEZ, A.; CENTRÓN, D.; RAMÍREZ, M. S. Emergence and spread of plasmid-borne *tet(B)::ISCR2* in minocycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 651-654, 2013.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3687-3694, 2003.

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



WOODWARD, M. J.; MCLAREN, I.; WRAY, C. Distribution of virulence plasmids within *Salmonellae*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 503-511, 1989.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118-132, 2016.

WU, G.; YANG, Q.; LONG, M.; GUO, L.; LI, B.; MENG, Y.; ZHANG, A.; WANG, H.; LIU, S.; ZOU, L. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 661-665, 2015.

YANG, Y.; MIKS-KRAJNIK, M.; ZHENG, Q.; LEE, S. B.; LEE, S. C.; YUK, H. G. Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, v. 54, p. 98-105, 2016.

ZOU, L.; MENG, J.; McDERMOTT, P. F.; WANG, F.; YANG, Q.; CAO, G.; HOFFMANN, M.; ZHAO, S. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 2644-2649, 2014.



## **Apêndices**

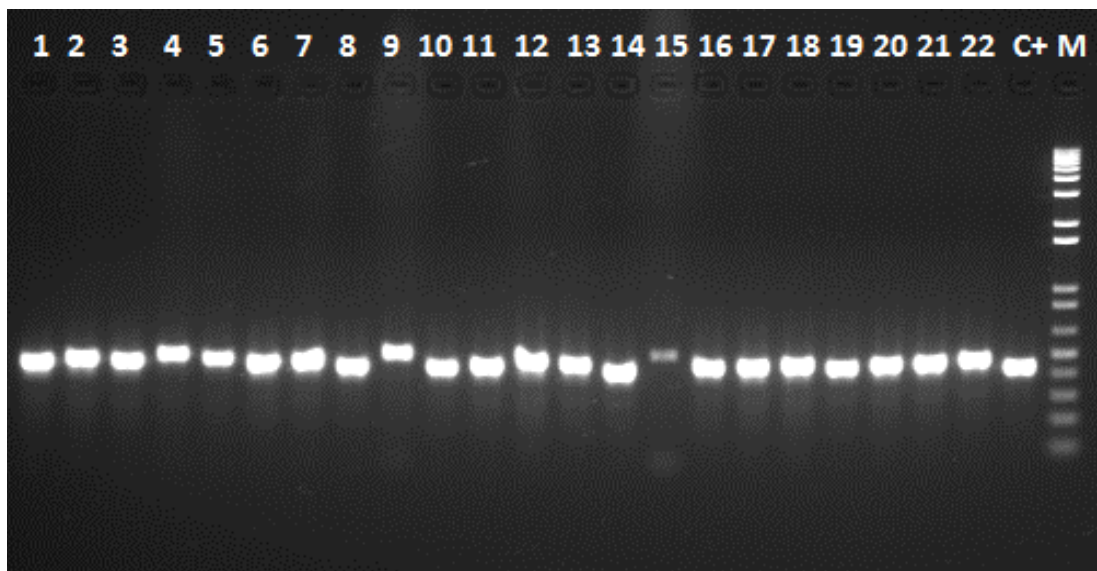
**Apêndice A** - Tabela com as características dos isolados utilizados no estudo

Isolado	Origem	Ano de isolamento	Sorovar	Genes de virulência	Fenótipo de resistência	Genótipo de resistência	CIM CB* (µg.mL <sup>-1</sup> )
S1	Salsichão	2010	S. Derby	<i>invA</i>	STR-TET-SUL	<i>tetA-sul1</i>	32
S2	Linguiça mista colonial	2010	S. Typhimurium	<i>invA-pefA</i>	AMP-GEN-STR-CLO-NAL-SUL-SUT-TRI		32
S3	Morceira branca	2010	S. Infantis	<i>invA</i>			32
S4	Farinha de carne e ossos	2010	S. Senftenberg	<i>invA</i>			32
S5	Farinha de carne e ossos	2010	S. Adelaide	<i>invA</i>			64
S6	Linguiça temperada caseira mista frescal	2010	S. Typhimurium	<i>invA-pefA</i>	AMP-NAL-SUT-TRI		64
S7	Farinha de carne e ossos	2010	S. Muenster	<i>invA</i>			32
S8	Farinha de carne e ossos	2010	S. Muenster	<i>invA</i>			32
S9	Linguiça suína	2011	S. Schwarzengrund	<i>invA-spvC</i>	AMP-STR-TET-CLO-SUL-SUT-TRI	<i>tetB-sul2-strA-strB</i>	32
S10	Linguiça mista	2011	S. Rissen	<i>invA</i>			64
S11	Ingrediente congelado para ração	2011	S. Typhimurium	<i>invA-pefA-spvC</i>			32
S12	Linguiça carne suína	2011	S. Derby	<i>invA-pefA-spvC</i>	STR-TET-SUL	<i>tetA-sul1</i>	32
S13	Linguiça de carne de frango	2011	S. Derby	<i>invA</i>	NAL		32
S14	Linguiça calabresa frescal	2011	S. Give	<i>invA</i>			32
S15	Mão do manipulador durante execução dos cortes	2010	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>diarizonae</i>	<i>invA</i>	STR		32
S16	Carcaça 53-1	2011	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> (O:6,7)	<i>invA</i>			32

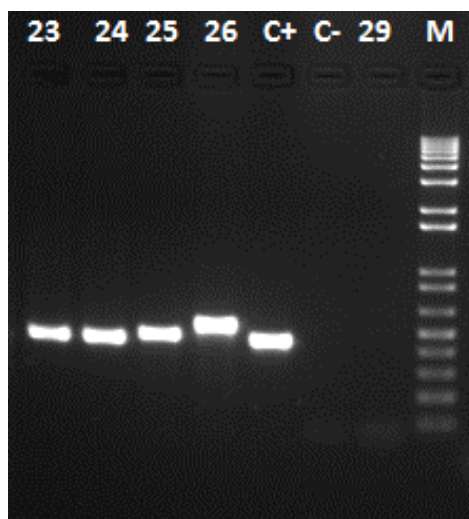
S17	Carçaça 53-1	2011	S. Livingstone	<i>invA</i>			32
S18	Carçaça 58-1	2011	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> (O:6,7)	<i>invA</i>			32
S19	Carçaça 43-1	2010	S. Derby	<i>invA</i>	STR-TET-SUL	<i>tetA-sul1</i>	32
S20	Carçaça 58-1	2011	S. Ohio	<i>invA</i>	STR		32
S21	Linguiça de carne de frango com queijo	2011	<i>Salmonella</i> ser. Rissen	<i>invA</i>			32
S22	Linguiça de carne suína com queijo	2011	<i>Salmonella</i> ser. Rissen	<i>invA</i>			32
S23	Toucinho resfriado de suíno sem pele	2011	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	<i>invA</i>	AMP-GEN-STR-TET-CLO-NAL-SUL-SUT-TRI	<i>strA-strB-tetA-sul1</i>	64
S24	Carne bovina resfriada sem osso (lagarto)	2012	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	<i>invA-pefA-spvC</i>			32
S25	Linguiça mista	2012	<i>Salmonella</i> ser. Give	<i>invA</i>	SUL		64
S26	Linguiça de carne suína com queijo parmesão	2012	<i>Salmonella</i> ser. Derby	<i>invA-sefA</i>			32

\*CB: cloreto de benzalcônio

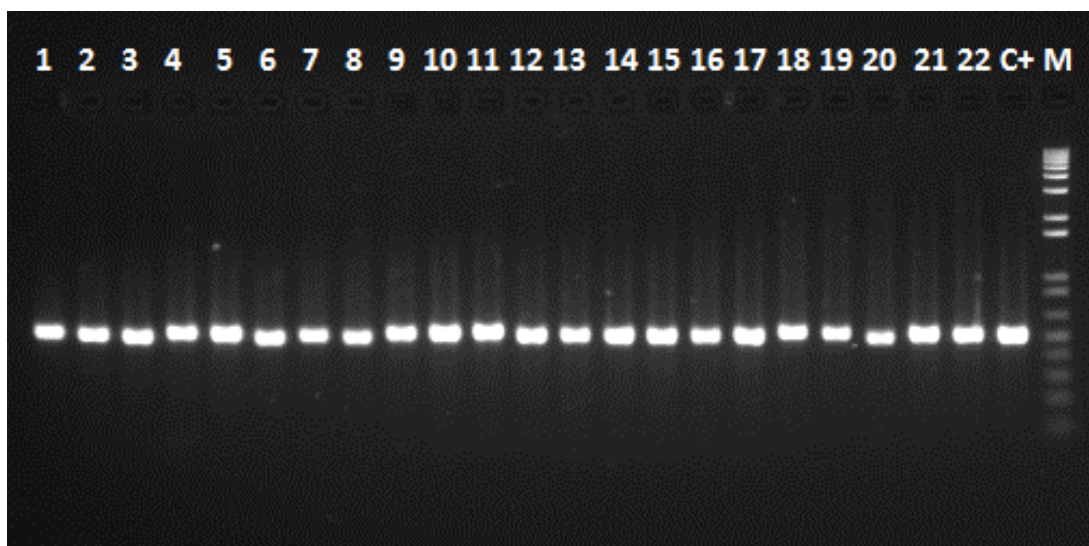
**Apêndice B** - Fotos de géis de agarose dos produtos de PCR dos genes avaliados no estudo



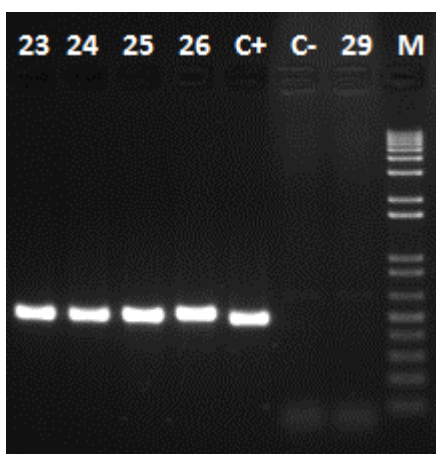
Confirmação do gênero *Salmonella* spp. através da detecção do gene *hilA* (413pb). 1: S1; 2: S2; 3: S3; 4: S4; 5: S5; 6: S6; 7: S7; 8: S8; 9: S9; 10: S10; 11: S11; 12: S12; 13: S13; 14: S14; 15: S15; 16: S16; 17: S17; 18: S18; 19: S19; 20: S20; 21: S21; 22: S22; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



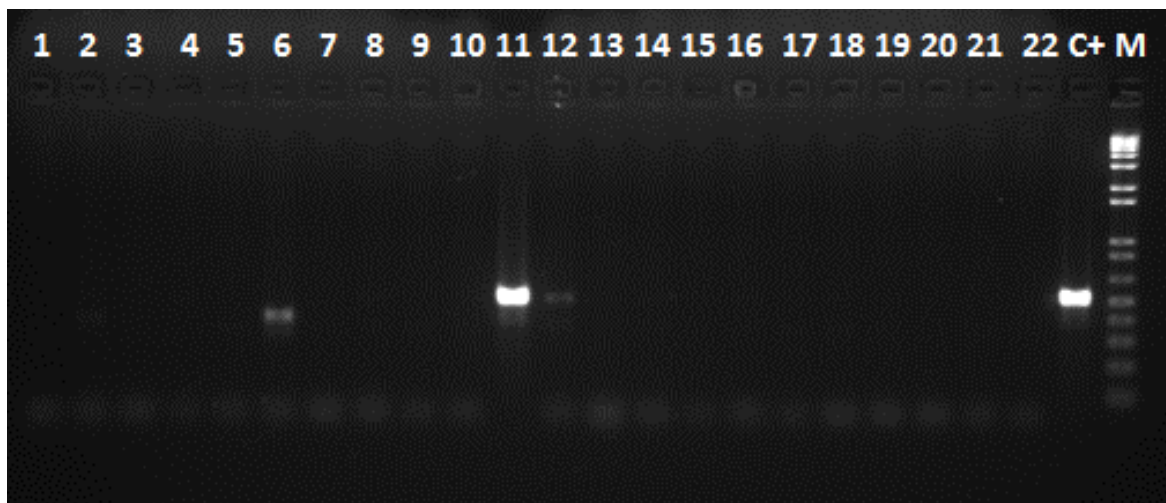
Confirmação do gênero *Salmonella* spp. através da detecção do gene *hilA* (413pb). 23: S23; 24: S24; 25: S25; 26: S26; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; C-: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; 29: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



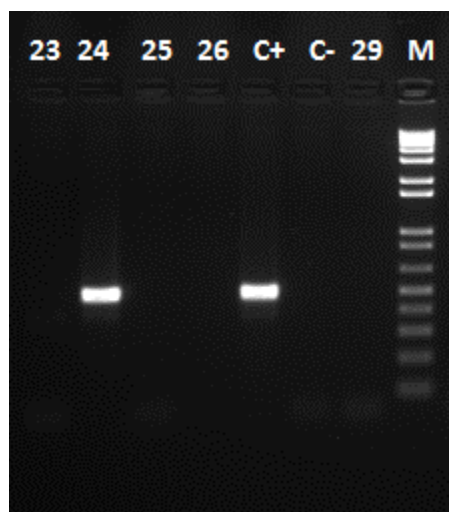
Presença do gene de virulência *invA* (521pb). 1: S1; 2: S2; 3: S3; 4: S4; 5: S5; 6: S6; 7: S7; 8: S8; 9: S9; 10: S10; 11: S11; 12: S12; 13: S13; 14: S14; 15: S15; 16: S16; 17: S17; 18: S18; 19: S19; 20: S20; 21: S21; 22: S22; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



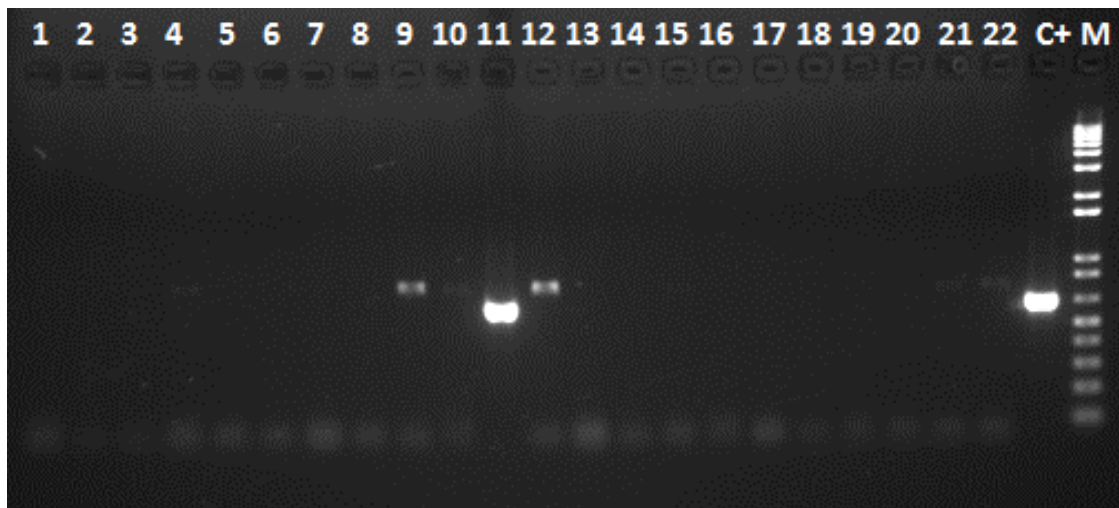
Presença do gene de virulência *invA* (521pb). 23: S23; 24: S24; 25: S25; 26: S26; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; C-: Controle negativo - *Escherichia coli* ATCC 8739; 29: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



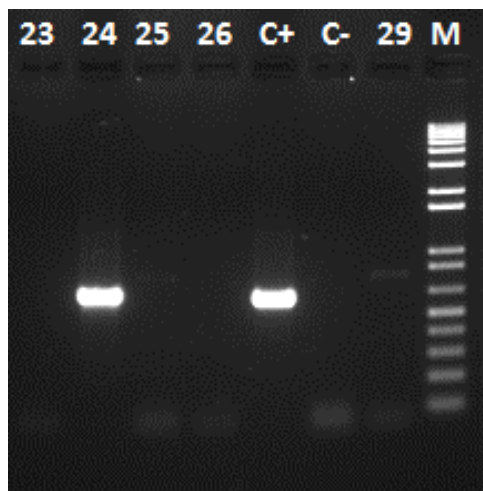
Presença do gene de virulência *pefA* (497pb). 1: S1; 2: S2; 3: S3; 4: S4; 5: S5; 6: S6; 7: S7; 8: S8; 9: S9; 10: S10; 11: S11; 12: S12; 13: S13; 14: S14; 15: S15; 16: S16; 17: S17; 18: S18; 19: S19; 20: S20; 21: S21; 22: S22; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



Presença do gene de virulência *pefA* (497pb). 23: S23; 24: S24; 25: S25; 26: S26; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; C-: Controle negativo *Escherichia coli* ATCC 8739; 29: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).

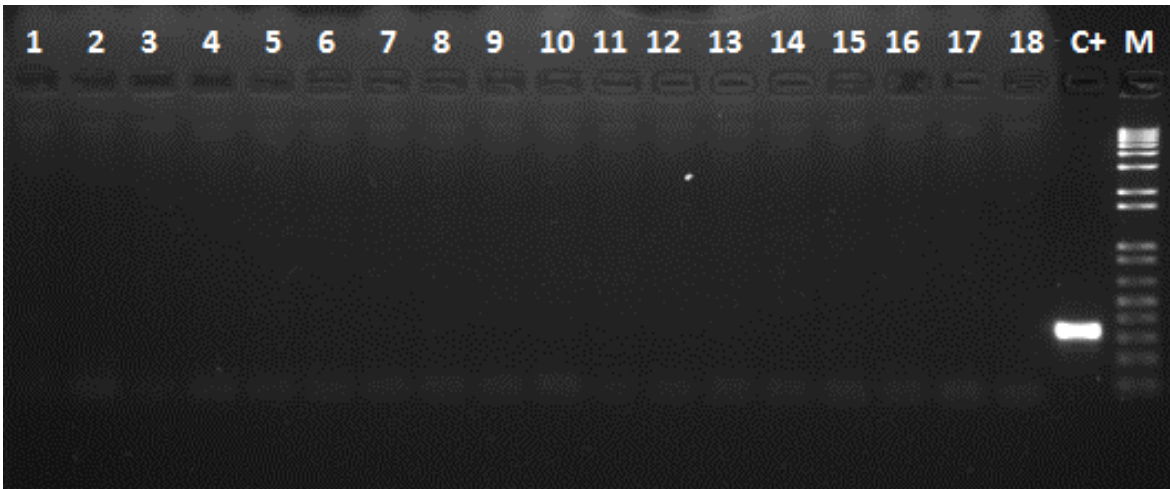


Presença do gene de virulência *spvC* (669pb). 1: S1; 2: S2; 3: S3; 4: S4; 5: S5; 6: S6; 7: S7; 8: S8; 9: S9; 10: S10; 11: S11; 12: S12; 13: S13; 14: S14; 15: S15; 16: S16; 17: S17; 18: S18; 19: S19; 20: S20; 21: S21; 22: S22; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).

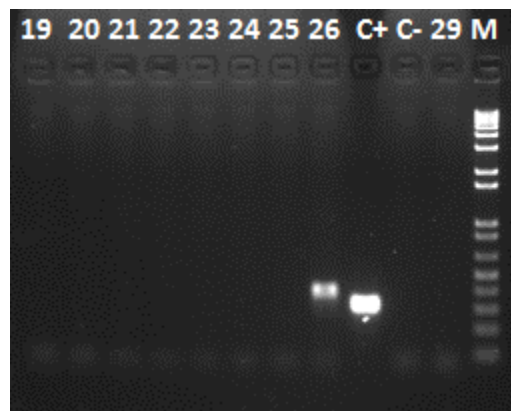


Presença do gene de virulência *spvC* (669pb). 23: S23; 24: S24; 25: S25; 26: S26; C+: Controle positivo - *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; C-: Controle negativo *Escherichia coli* ATCC 8739; 29: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).

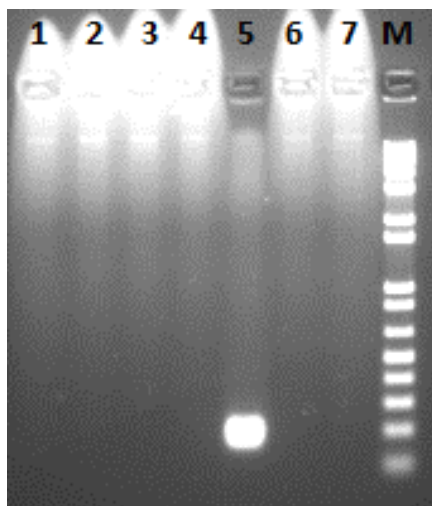




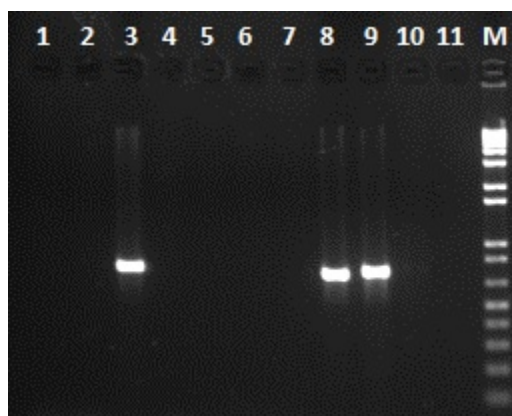
Presença do gene de virulência *sefA* (330pb). 1: S1; 2: S2; 3: S3; 4: S4; 5: S5; 6: S6; 7: S7; 8: S8; 9: S9; 10: S10; 11: S11; 12: S12; 13: S13; 14: S14; 15: S15; 16: S16; 17: S17; 18: S18; C+: Controle positivo - *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



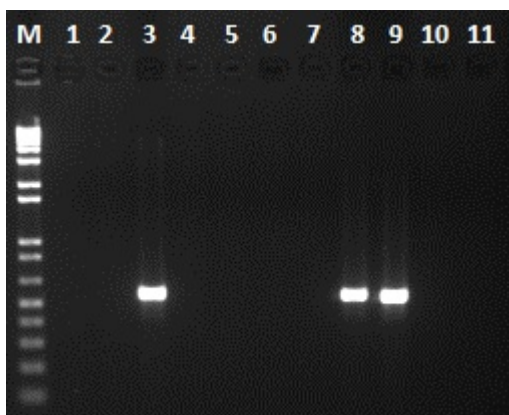
Presença do gene de virulência *sefA* (330pb). 19: S19; 20: S20; 21: S21; 22: S22; 23: S23; 24: S24; 25: S25; 26: S26; C+: Controle positivo - *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; C-: Controle negativo *Escherichia coli* ATCC 8739; 29: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



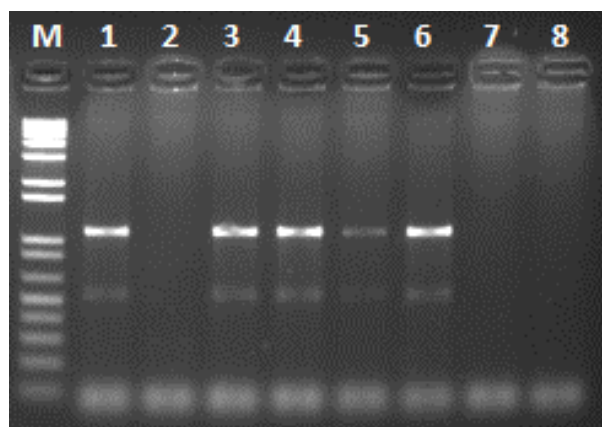
Presença do gene de resistência *blaZ* (172pb). 1: S2; 2: S6; 3: S9; 4: S23; 5: Controle positivo: *Staphylococcus aureus* S10; 6: Controle negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 7: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



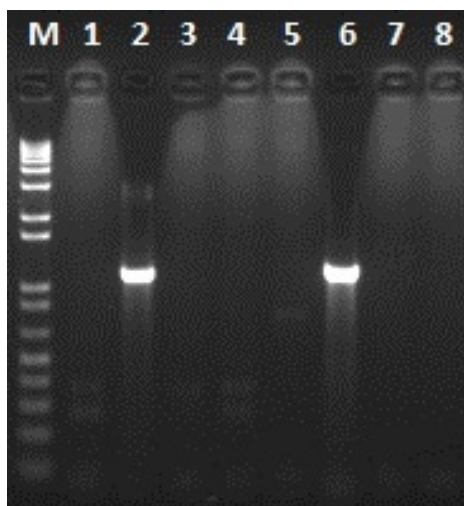
Presença do gene de resistência *strA* (645pb). 1: S1; 2: S2; 3: S9; 4: S12; 5: S15; 6: S19; 7: S20; 8: S23; 9: Controle positivo *Salmonella* Typhimurium 22C; 10: Controle negativo *Escherichia coli* 25922; 11: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



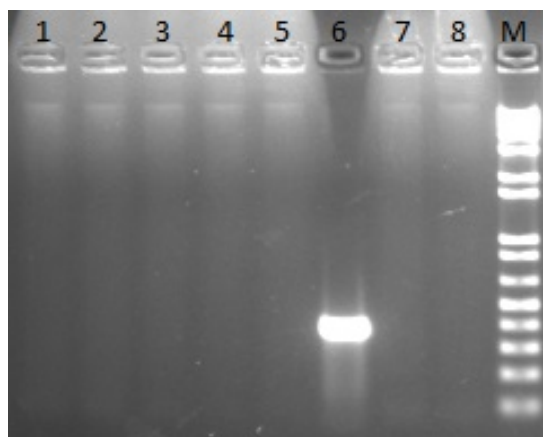
Presença do gene de resistência *strB* (510pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S2; 3: S9; 4: S12; 5: S15; 6: S19; 7: S20; 8: S23; 9: Controle positivo *Salmonella* Typhimurium 140B1; 10: Controle negativo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e 11: Controle da reação (sem DNA).



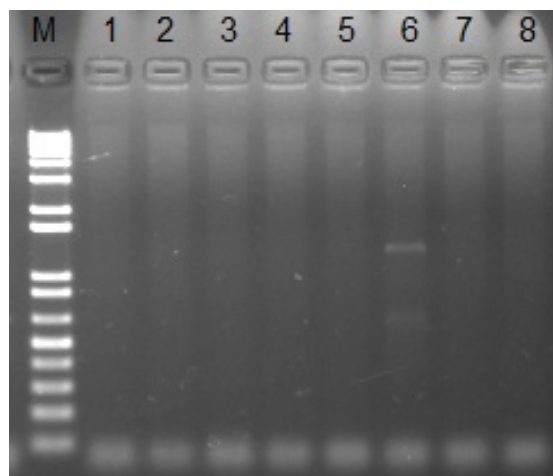
Presença do gene de resistência *tetA* (953pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo *Salmonella* Typhimurium 22C; 7: Controle negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 8: Controle da reação (sem DNA).



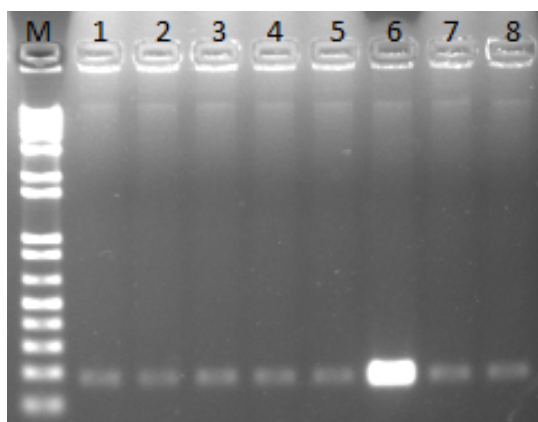
Presença do gene de resistência *tetB* (1169pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo: *Salmonella* Typhimurium 171B2; 7: Controle negativo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 8: Controle da reação (sem DNA).



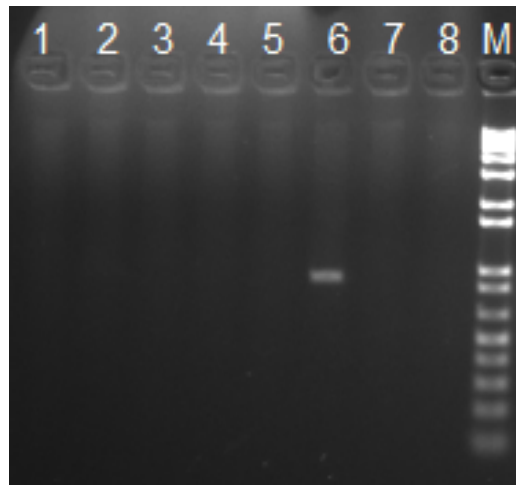
Presença do gene de resistência *tetK* (360pb). 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo: *Staphylococcus aureus* S2; 7: Controle negativo: *Salmonella* enteritidis ATCC 13076; 8: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



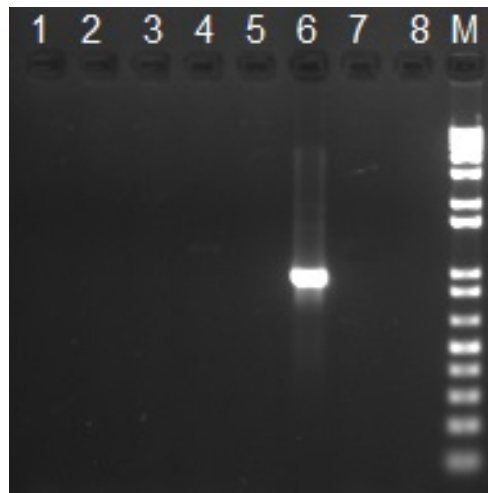
Presença do gene de resistência *tetL* (1028pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo: *Staphylococcus aureus* 107; 7: Controle negativo: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e 8: Controle da reação (sem DNA).



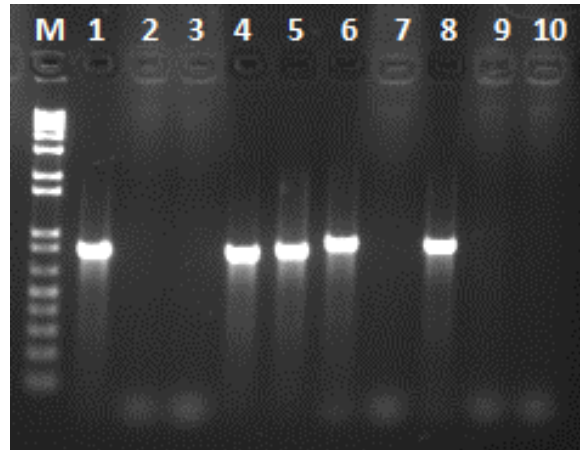
Presença do gene de resistência *tetM* (158pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo: *Staphylococcus aureus* S10; 7: Controle negativo: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e 8: Controle da reação (sem DNA).



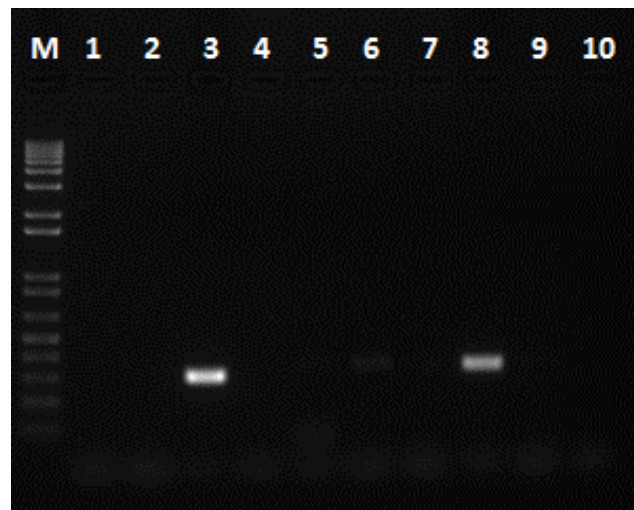
Presença do gene de resistência *tetO* (781pb). 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo: *Campylobacter jejuni* 119; 7: Controle negativo: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; 8: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



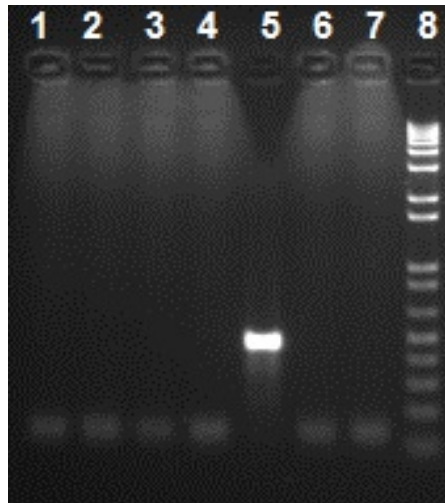
Presença do gene de resistência Tn916-1545 (1028pb). 1: S1; 2: S9; 3: S12; 4: S19; 5: S23; 6: Controle positivo: *Staphylococcus aureus* S10; 7: Controle negativo: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; 8: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



Presença do gene de resistência *sul1* (840pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S2; 3: S9; 4: S12; 5: S19; 6: S23; 7: S25; 8: Controle positivo: *Salmonella* Typhimurium 22C; 9: Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922 e 10: Controle da reação (sem DNA).



Presença do gene de resistência *sul2* (293pb). M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb); 1: S1; 2: S2; 3: S9; 4: S12; 5: S19; 6: S23; 7: S25; 8: Controle positivo: *Salmonella* Typhimurium 171B2; 9: Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922 e 10: Controle da reação (sem DNA).



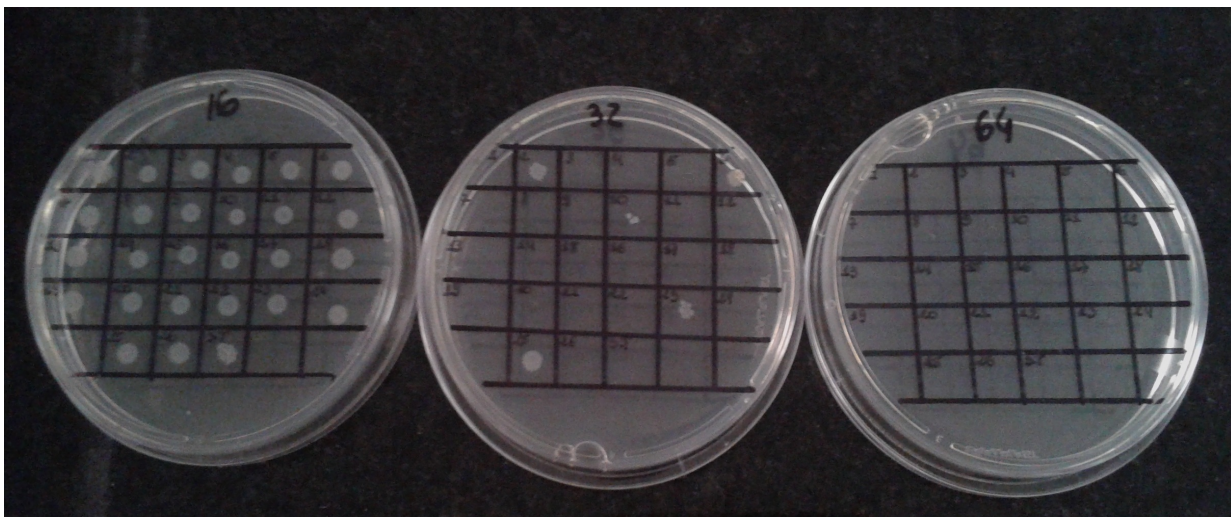
Presença do gene de resistência *dfrG* (422pb). 1: S2; 2: S6; 3: S9; 4: S23; 5: Controle positivo: *Staphylococcus aureus* S10; 6: Controle negativo: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; 7: Controle da reação (sem DNA) e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1 kb).



**Apêndice C** - Fotos da determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio



Determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio. Placas com concentrações variáveis de cloreto de benzalcônio (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 e 512  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



Determinação da concentração inibitória mínima de cloreto de benzalcônio. Placas com concentrações de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloreto de benzalcônio.