

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Ocorrência de *Salmonella* spp. no abate de bovinos no Rio Grande do Sul:
virulência, resistência, formação de biofilme e ação de óleos essenciais**

Ytaiara Lima Pereira

Pelotas, 2023

Ytaiara Lima Pereira

**Ocorrência de *Salmonella* spp. no abate de bovinos no Rio Grande do Sul:
virulência, resistência, formação de biofilme e ação de óleos essenciais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Orientadora: Profa. Dra. Graciela Volz Lopes
Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P111o Pereira, Ytaiara Lima

Ocorrência de *salmonella spp.* no abate de bovinos no Rio Grande do Sul : virulência, resistência, formação de biofilme e ação de óleos essenciais / Ytaiara Lima Pereira ; Graciela Volz Lopes, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2023.

94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Patógeno alimentar. 2. Produtos cárneos. 3. Processamento de carcaças. 4. Adesão bacteriana. 5. Alternativa natural. I. Lopes, Graciela Volz, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 614.11

Ytaiara Lima Pereira

Ocorrência de *Salmonella* spp. no abate de bovinos no Rio Grande do Sul:
virulência, resistência, formação de biofilme e ação de óleos essenciais

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 05/04/2023

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Graciela Volz Lopes (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini
Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Gabriela Orosco Werlang
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico à minha fonte de inspiração, minha mãe.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela oportunidade de viver uma experiência nesse plano, rica de aprendizado;

À minha mãe e amiga Ednamar, por todo sacrifício e incentivo a mim dedicado durante toda minha trajetória, por sempre acreditar que posso muito mais do que imagino. Você é meu maior exemplo de que somente a educação é força pra mudança social.

Aos familiares, que mesmo longe acompanharam mais essa etapa da minha vida acadêmica, sendo força nos momentos difíceis, onde desistir parecia ser o mais fácil.

Ao Dudu, que mesmo tão pequeno me conforta com seus áudios cheios de carinho, pedindo pra voltar do mundo em que estou. Você me faz querer ser exemplo.

À minha bisá Edna, que mesmo em outro plano sinto bem pertinho de mim, por vezes me lembrando em brisa de cheiro que está comigo, e que assim como você, eu aguento mais um pouquinho.

Às amigas de longa data, Denize e Thaís, mais uma etapa e cá estamos juntas mais uma vez, obrigada por todo incentivo.

Às queridas amigas, Camila e Mariana, obrigada por vibrarem comigo na mesma frequência em todos os momentos.

Ao meu amor e amigo Vitor, pela longa caminhada ao meu lado, cheia de aprendizado e companheirismo. Você sem dúvidas é peça essencial na minha vida. “Pro que der e vier, e quando não der e nem vier”.

Ao amigo e Professor Edson, obrigada pelo laço de amizade construído, pelos conselhos e conversas em momentos de apreensão, não me deixando desanimar.

Às amigas do Norte, Andrezza, Flávia e Renires, vocês foram conforto de casa em muitos momentos, obrigada por me acolherem.

Às amigas que me permiti cultivar, Andrielle, Alessandra, Daniele e Gabriele, essa etapa cheia de desafios foi árdua, mas que bom que estivemos juntas, gratas conversas e desabafos me permitiram refletir e aproveitar da melhor forma esse processo, obrigada irmãs.

Ao querido amigo Eric “Sam”, agradeço por toda paciência e disposição

de sempre. Toda ajuda, companhia, dicas e boas conversas me fizeram perceber que sempre dá para ser mais leve.

À minha querida orientadora, professora Graciela, por aceitar o desafio da orientação, sendo este exercido com muita sabedoria. Te agradeço por não me deixar desacreditar que eu seria capaz e, por além disso, me fazer querer mais, foi uma honra ser sua orientada.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, sem vocês essa conquista não seria tão gostosa, todo auxílio e ajuda depositada foi de grande valia, boa parte do meu crescimento pessoal e profissional se deve à vocês, meu muito obrigada.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao PPGCTA, pela oportunidade de desenvolver o trabalho proposto.

À agência de fomento a pesquisa, CNPQ pela concessão da bolsa de estudos, tornando possível a minha permanência e execução do projeto.

À todos, que cruzaram meu caminho nesses dois anos, toda troca vivida nesse período me permitiu concluir essa etapa da melhor forma possível.

Muito obrigada!

A autêntica riqueza da experiência humana perderia parte de sua alegria se não existissem limitações a superar. O cume da colina não teria nem metade de sua maravilha se não houvesse vales obscuros para atravessar.
Halina Boulez

Resumo

Pereira, Ytaiara Lima. **Ocorrência de *Salmonella* spp. no abate de bovinos no Rio Grande do Sul: virulência, resistência, formação de biofilme e ação de óleos essenciais.** 2023. 93f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

No Brasil a produção de carne possui grande importância econômica, tanto para o mercado interno quanto para as exportações. A forma mais efetiva de garantir que os produtos cárneos sejam produzidos de forma segura é através do monitoramento constante de microrganismos, como *Salmonella*. Há alertas mundiais acerca de surtos de origem alimentar e *Salmonella* spp. é um dos principais agentes envolvidos. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças e fezes em abatedouros-frigoríficos e cortes cárneos bovinos do varejo do Sul do Rio Grande do Sul, determinar o perfil fenotípico de suscetibilidade tanto a antimicrobianos como a sanitizantes, perfil de virulência, avaliar o potencial de formação de biofilme dos isolados e testar a ação de óleos essenciais (OE) na remoção do biofilme formado. Foram avaliadas 50 carcaças bovinas provenientes do frigorífico A e 50 carcaças do frigorífico B, ambos localizados na cidade de Pelotas-RS em quatro pontos da linha de abate: couro após a sangria (P1), fezes antes da oclusão do reto (P2), carcaça após a evisceração (P3) e carcaça após a lavagem final (P4). Também foram amostradas fezes de colaboradores e 24 cortes cárneos bovinos obtidos no varejo. Para o isolamento de *Salmonella* spp. utilizou-se o método ISO 6579, com modificações. A pesquisa dos genes de virulência *hilA*, *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA* foi realizada através da técnica de PCR. A suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos e sanitizantes foi avaliada por meio do teste de disco-difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para avaliar o potencial de formação de biofilme de *Salmonella* spp., cupons de aço inoxidável AISI 304 foram usados. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos OE de andiroba, copaíba, pimenta-rosa e tomilho branco, bem como sua ação na remoção dos biofilmes formados. Do total de 100 carcaças avaliadas, seis estavam contaminadas por *Salmonella*, sendo a maior taxa de isolamento observada no ponto após a lavagem final (4 %), seguido do ponto após a evisceração (2 %) e após sangria (1 %). Em nenhuma amostra de fezes de colaboradores e cortes cárneos houve detecção de *Salmonella*. Os isolados de *Salmonella* obtidos foram identificados como pertencentes ao sorovar Agona. Por meio da PCR observou-se que todos os isolados (n=7) apresentaram os genes de virulência *hilA* e *invA*, e apenas três isolados apresentaram os genes *spvC*, *pefA* e *sefA*. Os isolados de *Salmonella* foram susceptíveis à ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, tobramicina, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetroprima e cloranfenicol, intermediários para imipenem (20 – 22 mm) e um isolado intermediário para ciprofloxacina (30 mm). Dentre os sanitizantes testados, apenas clorexidina mostrou-se eficaz, com CIM e CBM de 8 µg.mL⁻¹. Os isolados apresentaram potencial de formação de biofilme em aço inoxidável nas temperaturas de 4 °C (5,45 UFC.cm⁻² – 7 UFC.cm⁻²), 25 °C (5,22 UFC.cm⁻² – 7,11 UFC.cm⁻²) e 37 °C (5,32 UFC.cm⁻² – 6,80 UFC.cm⁻²). Os OE de andiroba, copaíba e pimenta rosa (verde e madura) não apresentaram ação antimicrobiana, porém o OE de tomilho branco apresentou ação, com formação de halo variando entre 18 mm – 26 mm. Além disso, o OE de tomilho branco foi

eficaz em remover biofilmes de *Salmonella* spp. em cupons de aço inoxidável na concentração de 29,06 mg.mL⁻¹. Desta forma, a presença de *Salmonella* spp. carreando genes de virulência em abatedouros-frigoríficos gera um alerta quanto à necessidade de medidas higiênico-sanitárias mais rígidas durante o abate. Apesar dos isolados não apresentarem resistência aos antimicrobianos testados, houveram classificações intermediárias que podem vir a configurar uma resistência no futuro. A baixa eficácia dos sanitizantes testados é preocupante, uma vez que todos os isolados foram potencialmente formadores de biofilme sobre aço inoxidável. Em contra partida, a concentração inibitória mínima para o OE de tomilho branco foi satisfatória, demonstrando seu potencial tanto em inibir *Salmonella* como em remover os biofilmes formados.

Palavras-chave: Patógeno alimentar. Produtos cárneos. Processamento de carcaças. Adesão bacteriana. Alternativa natural.

Abstract

Pereira, Ytaiara Lima. **Occurrence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in cattle slaughter in Rio Grande do Sul and characterization of virulence, resistance and potential for biofilm formation.** 2023. 93f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In Brazil, meat production has great economic importance for the domestic market and exports. The most effective way to ensure that meat products are produced safely is by constantly monitoring microorganisms such as *Salmonella*. There are global warnings about foodborne outbreaks caused by *Salmonella* spp. In this context, this study aimed to evaluate the occurrence of *Salmonella* spp. in carcasses and feces slaughterhouses and beef cuts from retail stores in southern Rio Grande do Sul, to determine the phenotypic profile of susceptibility to both antimicrobials and sanitizers, evaluate virulence profile, to evaluate the potential for biofilm formation of the isolates, and test the action of essential oils (EO) in removing the formed biofilm. 50 beef carcasses from slaughterhouse A and 50 carcasses from slaughterhouse B, both located in Pelotas-RS were evaluated at four points on the slaughter line: skin after bleeding (P1), feces before rectal occlusion (P2), carcass after evisceration (P3), and carcass after final washing (P4). Fecal samples from employees and 24 bovine meat cuts from retail were also sampled. The ISO 6579 method with modifications was used to isolate *Salmonella* spp. The *hilA*, *invA*, *spvC*, *pefA*, and *sefA* virulence genes were detected using PCR. The susceptibility of the isolates to antimicrobials and sanitizers was evaluated using the disk diffusion method on agar, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC). Stainless steel AISI 304 coupons were used to evaluate the potential of *Salmonella* spp. biofilm formation. The antimicrobial activity of andiroba, copaiba, pink pepper, and white thyme essential oils (EOs) and their action in removing pre-formed biofilms was evaluated. Of the 100 evaluated carcasses, six were contaminated with *Salmonella*, with the highest isolation rate observed at the point after the final washing (4 %), followed by the point after evisceration (2 %) and after bleeding (1 %). No *Salmonella* was detected in any retail meat samples and employee feces. The *Salmonella* isolates were identified as belonging to serovar Agona. Through PCR, all isolates (n=7) presented the virulence genes *hilA* and *invA*, and only three presented the genes *spvC*, *pefA*, and *sefA*. The isolates of *Salmonella* were susceptible to ampicillin, amoxicillin, ceftazidime, tobramycin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, and chloramphenicol, intermediate to imipenem (20 – 22 mm), and one isolate intermediate to ciprofloxacin (30 mm). Among the sanitizers tested, only chlorhexidine was effective, with MIC and MBC of 8 µg.mL⁻¹. The isolates showed biofilm-forming potential on stainless steel at temperatures of 4 °C (5,45 CFU.cm⁻² – 7 CFU.cm⁻²), 25 °C (5,22 CFU.cm⁻² – 7,11 CFU.cm⁻²), and 37 °C (5,32 CFU.cm⁻² – 6,80 CFU.cm⁻²). The essential oils of andiroba, copaiba, and pink pepper (green and ripe) did not show antimicrobial action, but the essential oil of white thyme showed action, with a halo formation ranging from 18 mm to 26 mm. In addition, the essential oil of white thyme effectively removed *Salmonella* spp. biofilms on stainless steel coupons at a concentration of 29,06 mg.mL⁻¹. Thus, the presence of *Salmonella* spp. carrying virulence genes in slaughterhouses creates a warning about the need for strict hygienic-sanitary measures during slaughter. Although

these isolates do not shown resistance to the tested antimicrobials, there were intermediate classifications that may come to configure resistance in the future. The low effectiveness of the sanitizers tested is worrying, since all isolates were potentially biofilm forming on stainless steel. In contrast, the minimum inhibitory concentration for thyme EO was satisfactory, demonstrating its potential in inhibiting *Salmonella* and removing formed biofilms.

Keywords: Food pathogen. Meat products. Carcass processing. Bacterial adhesion. Natural alternative.

Lista de Figuras

Figura 1: As cinco etapas do desenvolvimento do biofilme sobre superfície.....	30
Figura 2: Ouriço de andiroba com suas sementes.....	33
Figura 3: Extração do óleo de Copaibeira.....	34
Figura 4: Frutos verdes e maduros da Pimenta-rosa.....	35
Figura 5: Exemplar de arbusto do Tomilho branco.....	36
Figura 6: Disco-difusão em ágar Müller-Hinton do óleo essencial de tomilho branco frente aos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	52
Figura 7: Atividade do óleo essencial de tomilho branco na remoção do biofilme formado em aço inoxidável a 37° C por <i>Salmonella</i> spp.. A: contagens bacterianas do isolado 125 nas diluições 10 ⁻¹ , 10 ⁻² e 10 ⁻³ , sem a presença do óleo essencial de tomilho branco; B: contagens bacterianas do isolado 125 nas diluições 10 ⁻¹ , 10 ⁻² e 10 ⁻³ , após contato por 15 min com o óleo essencial de tomilho branco.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação de resíduo, forma de solubilidade e grau de dificuldade de sua remoção.....	24
Tabela 2. Sanitizantes químicos mais usados para controle dos microrganismos em superfícies para processamento na indústria de alimentos e sua eficiência.....	26
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para a confirmação do gênero <i>Salmonella</i> e dos genes de virulência.....	44
Tabela 4: Agentes antimicrobianos e critérios interpretativos para o teste de suscetibilidade por disco-difusão em ágar.....	45
Tabela 5. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em diferentes pontos da linha de abate de bovinos.....	49
Tabela 6. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em cortes cárneos bovinos do varejo.....	50
Tabela 7. Suscetibilidade à sanitizantes em isolados de <i>Salmonella</i> spp. provenientes de carcaças bovinas.....	51
Tabela 8. Potencial de formação de biofilme de isolados de <i>Salmonella</i> spp. em cupons de aço inoxidável em diferentes temperaturas.....	51
Tabela 9. Halos de inibição dos óleos essenciais de andiroba, copaíba, pimenta vermelha e tomilho branco frente aos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	52

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Carne bovina: importância na alimentação e a veiculação de patógenos.....	17
2.2 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> : Aspectos importantes para a saúde pública	18
2.3 Problemática mundial da resistência antimicrobiana	20
2.4 Indústria de alimentos e o uso de sanitizantes	23
2.4.1.1 Ácido peracético (PAA)	25
2.4.1.2 Hipoclorito de sódio (NaClO).....	27
2.4.1.3 Cloreto de benzalcônio (BACs)	28
2.4.1.4 Clorexidina (CHX).....	28
2.5 Biofilme e seu potencial de contaminação	29
2.6 Óleos essenciais como alternativas aos sanitizantes	31
2.6.1 Andiroba	32
2.6.2 Copaíba.....	33
2.6.3 Pimenta rosa	34
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4. ARTIGO 1 – Resistance to antimicrobials and sanitizers and potential for biofilm formation in <i>Salmonella</i> spp. isolated from beef carcasses in Brazil.	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
Referências	70
APÊNDICE	88
ANEXO	91

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a pecuária vem crescendo devido a expansão da demanda mundial por alimentos, o que garante a América Latina se enquadrar entre os maiores exportadores de carne bovina do mundo (FAO, 2022). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no período de janeiro a setembro de 2022, o Brasil abateu cerca de 22.198.949 milhões de cabeças bovinas, o que totalizou 5.916.905 milhões de toneladas de carcaças produzidas (IBGE, 2022). A exportação dessa proteína *in natura* circulou entre 2.478,2 toneladas de carcaça equivalente (TEC), o que garantiu o Brasil no topo do *ranking*, se enquadrando como o maior exportador de carne bovina do mundo, tendo a China, Hong Kong, Chile e EUA como principais importadores de carne bovina *in natura* (ABIEC, 2022). No Brasil, o estado do Rio grande do Sul foi o nono estado das unidades federativas a contribuir com a exportação (IBGE, 2022).

A comercialização de proteínas de origem animal anda em paralelo com a qualidade e sanidade do produto, o que torna o mercado altamente competitivo, obrigando os exportadores a se enquadrarem nas exigências dos países compradores. Dentre os países que importam carne bovina do Brasil, destaca-se a China, que exige rigorosos padrões de protocolos sanitários dos produtos, que incluem informações acerca dos veterinários encarregados da inspeção; potenciais fontes poluidoras no entorno da planta de abate; risco de contaminação cruzada dentro da fábrica de processamento; limpeza das instalações, armazenamento e transporte; tratamento da água usada na produção dos alimentos entre outras exigências (ABIEC, 2022; CALIARI, 2019).

O processo de abate dos animais apresenta diversos pontos que podem favorecer a contaminação microbiológica do produto, sendo esfolagem, evisceração e toalete, os que configuram maiores riscos à segurança do produto final (NETO;NUNES;SILVA, 2021). Os microrganismos considerados patogênicos e deteriorantes são responsáveis por grandes perdas econômicas, sendo fonte de contaminação cruzada nos pontos da linha de abate e processamento, podendo ser transportadas de um ambiente à outro por meio de manipuladores ou ainda utensílios e equipamentos (SANTOS et al., 2021; SILVA et al., 2020). Em se

tratando de produtos cárneos no varejo, alguns pontos interferem na qualidade do produto, sendo estes a manipulação, estocagem, embalagem, os quais interferem diretamente na qualidade microbiológica (SIMÕES, 2021).

Salmonella spp. é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a qual engloba microrganismos gram-negativos considerados patogênicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), *Salmonella* spp. encontra-se entre os principais agentes etiológicos identificados em surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) que são notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) no Brasil (BRASIL, 2022). Possuindo duas espécies responsáveis por causar doenças em humanos, *S. enterica* e *S. bongori*, que se subdividem em subespécies. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possui grande relevância e impacto para a saúde pública e se configura como importante patógeno com potencial zoonótico capaz de causar doenças entéricas e até mesmo septicemias em humanos (CDC, 2022).

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem gerado um alerta quanto ao surgimento de microrganismos resistentes e até multirresistentes, ou seja, aqueles que apresentam resistência a três ou mais antimicrobianos concomitantemente, o que dificulta ou até mesmo inviabiliza a antibioticoterapia como alternativa de tratamento. Esse fato ocorre não somente na medicina humana, como também na medicina veterinária, onde os antimicrobianos são utilizados para transformar o sistema de produção mais rentável, seja como uso profilático em doenças de rebanho ou ainda como promotor de crescimento, possibilitando assim uma maior produtividade animal (WHO, 2022). Essa resistência aos antimicrobianos já é considerada um dos maiores desafios do sistema de saúde na atualidade, uma vez que coloca em risco a eficácia dos tratamentos e profilaxias de doenças contemporâneas (HUEMER et al., 2020).

As bactérias resistentes podem transitar entre homens e animais por meio da alimentação, água e meio ambiente gerando prejuízos também para o setor econômico de um país, reforçando a importância de políticas públicas que visem frear esse uso errôneo de medicamentos, bem como incentivo para criação de novas classes de medicamentos que supram as atuais necessidades dos microrganismos mutados e, por conseguinte, multirresistentes (HUEMER et al.,

2020; LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017) .

Falhas na higienização de superfícies, utensílios e equipamentos em indústrias de alimentos e o desenvolvimento de resistência à sanitizantes pelos microrganismos, pode ocasionar a formação de biofilmes, os quais se tornam fonte de contaminação de produtos (SWART et al., 2016). Os biofilmes são estruturas complexas formadas por microrganismos que se mantêm aderidos a uma superfície através da produção de uma matriz polimérica extracelular de exopolissacarídeos (EPS) (FENG et al., 2017). Essa matriz dificulta a remoção de bactérias aderidas à superfícies por meio de agentes sanitizantes comerciais (CORCORAN et al., 2014).

O mercado vem buscando alternativas ao uso de sanitizantes comerciais devido a ineficácia dos produtos já utilizados pelo desenvolvimento da resistência microbiana e devido à toxicidade desses produtos, focando em substâncias que não sejam ofensivas à saúde do consumidor. Assim, novos compostos com ação antimicrobiana obtidos a partir de espécies vegetais, como os óleos essenciais, surgem como alternativa para o controle microbiológico e ainda como agentes de remoção de biofilmes (MIR et al., 2018).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças e fezes de bovinos em abatedouros-frigoríficos e cortes cárneos bovinos do varejo do Sul do Rio Grande do Sul, determinar o perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos e sanitizantes, avaliar o perfil de virulência, o potencial de formação de biofilme e a ação de óleos essenciais na remoção do biofilme formado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carne bovina: importância na alimentação e a veiculação de patógenos

Uma das principais proteínas inseridas na dieta alimentar humana é a carne, compreendendo uma excelente fonte de aminoácidos, de alguns minerais, vitaminas e ácidos graxos essenciais, sendo fundamental para o bom funcionamento metabólico (GOBERT et al., 2014). O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior mundialmente, configurando um total de 196,47 milhões de cabeças, participando de 13,66 % do mercado internacional. Desse montante, 39,14 milhões de cabeças foram abatidas, o que gerou 9,71 milhões de TEC, onde 25,51 % foram destinados à exportação, ou seja, 2,48 milhões de toneladas exportadas (ABIEC, 2022). Vale ressaltar que desde o ano de 2020, o Brasil se configura como o maior exportador de carne bovina, possuindo um dos maiores rebanhos mundiais (EMBRAPA, 2021).

Com a crescente exportação de carne e carcaças bovinas, o Brasil vem seguindo adaptações para atender ao mercado internacional, estando este atento a qualidade dos produtos ofertados (VELHO et al., 2009; CALIARI, 2019). Os produtos cárneos estão frequentemente envolvidos em surtos alimentares, uma vez que estão associados à veiculação de patógenos. Seu alto valor nutricional e suas características intrínsecas como pH e alta atividade água favorecem o crescimento dos microrganismos (RHOADES et al., 2009; SILVA et al., 2020).

A contaminação das carcaças bovinas pode ocorrer em diversos pontos do abate e em etapas que envolvem manipulação e processamento, entre eles estão a esola, evisceração, cortes, embalagem, estocagem e resfriamento (BORCH; ARINDER, 2002). Na indústria de alimentos, o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) auxilia na detecção dos principais pontos de contaminação e de que forma essa problemática poderá ser contornada ou evitada, a fim de garantir a segurança do alimento. No fluxograma de abate bovino, os Pontos Críticos de Controle (PCC) envolvem a esola, evisceração e resfriamento (AZEVEDO, 2009; ARAÚJO et al. 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as principais bactérias

envolvidas nas Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) são *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2018). A presença da *Salmonella* spp. em alimentos configura risco ao consumidor, sendo um dos microrganismos patogênicos de maior relevância para a carne bovina, relatada em diversos estudos no Brasil e em outros países (AQUINO et al., 1991; ALMEIDA et al., 2002; BEACH et al., 2002; RANSOM et al., 2002; XAVIER; JOELE, 2004; NEL et al., 2004; BRASIL, 2011; COSSI, 2014; ARAUJO et al., 2015).

No Brasil, há legislações que determinam os padrões microbiológicos dos alimentos e a sua aplicabilidade, sejam estes de origem animal ou vegetal. Assim, a RDC N° 724 de 2022 (BRASIL, 2022) e a IN N° 161 de 2022 (BRASIL, 2022) garantem a adequação dos produtos comercializados, prontos para o consumo ou *in natura*, com a finalidade de garantir tanto a qualidade do produto, como a saúde do consumidor. Vale ressaltar que *Salmonella* spp. em todas as categorias de alimentos deve estar ausente em 25 gramas de produto (BRASIL, 2022).

2.2 *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: Aspectos importantes para a saúde pública

Salmonella é um gênero que pertence a família Enterobacteriaceae e apresenta duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada uma delas é dependente da composição de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), sendo *S. enterica* subsp. *enterica* a que possui maior número de sorovares (1.490) (BRASIL, 2011).

Esse gênero bacteriano possui o formato de bacilos curtos, com largura de 0,4 a 1,5 µm e comprimento de 2 a 5 µm. São móveis através de flagelos peritríquios em sua maioria, produzem gás H₂S (sulfeto de hidrogênio) a partir da fermentação da glicose e em sua maioria não fermentam lactose ou a fazem lentamente. São oxidase negativa, catalase positivo, indol, Voges-Proskauer (VP), Vermelho de Metila (VM), malonato e ureia negativa. Além disso, reduzem

nitrato a nitrito e possuem também a capacidade de descarboxilar aminoácidos como lisina e ornitina, bem como são capazes de usar como única fonte de carbono o citrato (LEVINSON, 2011; BRASIL, 2011). Vale ressaltar que no caso da *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, além de não possuírem mobilidade, também não produzem gás, sendo observado apenas em 5% delas. Outras características são a não formação de esporos, não possuem cápsulas e são anaeróbios facultativos (ICMSF, 1996; YAN et al., 2003; D'AOUST; MAURES, 2007; PUI et al., 2011). Vale ressaltar que podem crescer em temperaturas que variam de 5 a 45°C, onde 37°C é a temperatura considerada ótima para sua multiplicação, o pH pode variar de 4 a 9, tendo a faixa de 7 como ideal (MENDONÇA, 2016).

A classificação taxonômica da *Salmonella* spp. passou por diversas mudanças devido a diversidade de seus sorovares, despertando em um grupo de pesquisadores microbiologistas a iniciativa de instituir a sorotipificação como ferramenta de identificação e classificação, sendo reconhecido com esquema de Kauffmann-White em 1933 (BRASIL, 2011). Este baseia-se nos antígenos de superfícies presentes nesta bactéria, conhecidos como antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Os antígenos O são nomeados por números arábicos (1, 2, 3...), os antígenos H por letras minúsculas do alfabeto seguido de números arábicos, porém, o número de antígenos H é superior a quantidade de letras do alfabeto, portanto a última letra (z) recebe expoentes numéricos (z1, z2, z3...). Quanto ao antígeno Vi, existe apenas um tipo imunológico, presente em *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Hirschfeldii* (BRASIL, 2011; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Salmonella enterica habita o trato intestinal humano ou animal e sua transmissão para o meio ambiente ocorre através da excreção de fezes contaminadas. *Salmonella enterica* apresenta uma ampla variedade de hospedeiros, mamíferos ou não, além de adaptação ao ambiente. A bactéria pode ser encontrado no solo, água, superfícies de equipamentos e utensílios de cozinha, na indústria, fezes de animais e humanos (PEREIRA; SILVA, 2005; SHINOHARA et al., 2008). Essa diversidade de fontes de transmissão e/ou contaminação predispõe uma alta prevalência de infecções em humanos (SHINOHARA et al., 2008; FERREIRA et al., 2013).

A salmonelose é uma enfermidade de origem alimentar que causa preocupação mundial com alta incidência, sendo considerada uma das principais causas de doenças alimentares no mundo (SÁNCHEZ-VARGAS, 2011; BRASIL, 2018). A infecção por *Salmonella* spp. pode ser classificada em quatro formas, sendo elas: gastroenterite, sepse, febre entérica e colonização assintomática (BENICIO, 2019; PUI et al., 2011). Em indivíduos imunocompetentes, a maior parte dos sorovares não tifóides está associada à gastroenterite, ocasionando uma infecção localizada no íleo terminal e cólon. Os sintomas destas infecções podem ser desconfortos abdominais, cólicas, febre, náuseas, vômito e dor de cabeça, sintomas estes inespecíficos, ou seja, podem ser confundidos com qualquer outra doença gastrointestinal, sendo este um dos fatores de subnotificação da doença (PUI et al., 2011; BRASIL, 2018). Em indivíduos imunocomprometidos, as perdas de função da barreira mucosa podem resultar no desenvolvimento de bacteremia (PUI et al., 2011).

Quando se fala em prejuízos gerados pela *Salmonella* spp., os dados são preocupantes. Nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que a média anual é de 1,35 milhão de pessoas enfermas, 26,5 mil hospitalizadas e até 420 mortes. Os principais sorovares envolvidos nesses surtos são *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport* e *S. Javiana* (CDC, 2022). Dados da União Européia indicam que salmonelose foi a segunda infecção gastrointestinal transmitida por alimentos mais comumente relatada em humanos após a campilobacteriose, sendo uma das principais causas de surtos de origem alimentar. Em 2021, o número de casos confirmados de salmonelose humana foi de 60.050 mil, 14,3 % mais elevado em comparação com a taxa em 2020. Os cinco principais sorovares de *Salmonella* envolvidos nessas infecções foram: *S. Enteritidis* (54,6 %), *S. Typhimurium* (11,4 %), *S. Typhimurium* monofásico (1, 4,[5],12:i:-) (8,8 %), *S. Infantis* (2,0 %) e *S. Derby* (0,93 %) (EFSA; ECDC, 2022). Santos et al. (2022), relataram quais os 10 principais sorovares de *Salmonella* isolados de fontes humanas entre 2011 e 2020, tendo destaques para *S. Typhimurium* (29,4 %), *S. Enteritidis* (20,8 %) e *S. Infantis* (5,1 %). Nota-se a importância que este gênero bacteriano tem para a saúde pública de um país.

2.3 Problemática mundial da resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos são medicamentos que podem promover tanto a eliminação como a inibição do crescimento de microrganismos e, portanto, são classificados como bactericidas ou bacteriostáticos respectivamente. Atuam em nível de parede celular, membrana plasmática, síntese de proteínas e ácidos nucleicos (LOPES et al., 2016; YANG et al., 2016). Tanto na medicina humana como na medicina veterinária, são comumente empregados em procedimentos terapêuticos contra infecções bacterianas primárias e, preventivamente, contra as possíveis infecções secundárias (LOPES et al., 2016; WHO, 2020).

A resistência clínica aos antimicrobianos caracteriza-se pelo potencial de sobrevivência dos microrganismos quando estes entram em contato com o medicamento, tornando-o assim sem eficácia (WHO, 2020). Tratando-se do critério microbiológico, a resistência se manifesta como a capacidade do microrganismo se multiplicar *in vitro* em concentrações maiores do que o ponto de corte estabelecido para cada cepa que esteja filogeneticamente relacionadas, como exemplo temos o *breakpoints* (MAGIORAKOS et al., 2012).

A resistência bacteriana pode ocorrer por vários mecanismos sejam eles intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca ocorre de forma natural, podendo ser caracterizada como parte de um processo de evolução. Já a resistência adquirida ocorre quando há pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, ocorrendo mutações genéticas, resultando em genes de resistência que podem vir a ser transferidos entre as espécies bacterianas (ANVISA, 2007; SANTANA et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos na resistência adquirida podem compreender a: alteração da proteína alvo, inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana e mecanismo de efluxo. A alteração da proteína alvo está associada à alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria, o que acaba diminuindo a afinidade da droga pelo sítio (ANDRADE; DARINI, 2017). A inativação enzimática está relacionada a capacidade que as bactérias possuem em produzir enzimas como por exemplo, as β -lactamases, que neutralizam as drogas e seus efeitos antibióticos (ANDRADE; DARINI, 2017). A alteração da permeabilidade da membrana, corresponde à alteração dos canais de porinas, que modificam a penetração e a ação dos diferentes antibióticos

(MUNITA; ARIAS; 2016). Já o mecanismo de efluxo ou bomba de efluxo, faz com que ocorra a expulsão ativamente dos antibióticos para fora da célula, impedindo assim a ação do antimicrobiano (MUNITA; ARIAS, 2016).

A resistência aos antimicrobianos tem surgindo devido ao uso intenso, principalmente na produção animal, sendo usado indiscriminadamente para terapêutica, profilaxia e promoção do crescimento em diversos países. Esse uso desregrado induz a seleção de linhagens bacterianas resistentes aos diferentes princípios ativos, dificultando assim o tratamento de infecções, tanto em humanos como nos animais, podendo tornar simples procedimentos em sérias complicações (ACAR et al., 2017; WHO, 2020).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017, enquadrou *Salmonella* spp. como grupo de alta prioridade global, quando se diz respeito a bactérias resistentes a antimicrobianos, trazendo à tona a preocupação com essa bactéria patogênica, uma vez que limita os antimicrobianos eficazes e emerge a necessidade de novos medicamentos com a finalidade de suprir essa necessidade, o que perdura até os dias atuais (WHO, 2017; TACONELLI et al., 2018). Capuano (2012) observou que, em 10,41 % (5/48) dos isolados provenientes do couro bovino e em 4,54 % (1/22) isolados de carcaças após esfolagem apresentaram resistência a ampicilina e tetraciclina concomitantemente. Alcântara et al. (2012), encontrou 27,7 % de contaminação por *Salmonella* spp. ao avaliar 90 amostras cárneas, onde todas as cepas eram resistentes, diferindo apenas os antimicrobianos; ampicilina (100 %), amicacina (95 %), clindamicina (90 %), canamicina (80 %), sulfazotrim (75 %), cloranfenicol (60 %), ciprofloxacina (40 %), cefotaxime (25 %), trimetoprim (10 %), e neomicina (10 %). Fortes et al. (2020), encontrou resistência aos seguintes antimicrobianos: trimetoprim, amoxicilina, tetraciclina, estreptomina e ceftriaxona em duas cepas provenientes do conteúdo cecal de bovinos abatidos.

Nota-se que a demanda por novos medicamentos é crescente, reforçada pela pressão causada por essa resistência dos microrganismos aos medicamentos empregados nas infecções. A estimativa mundial de mortes devido a bactérias resistentes é de aproximadamente 700 mil, com crescimento previsto de 1 milhão de mortes até o ano de 2050 (WHO, 2019).

2.4 Indústria de alimentos e o uso de sanitizantes

Na indústria de alimentos as Boas Práticas de Fabricação (BPF) compreendem um conjunto de normas que engloba os produtos, serviços, processos e instalações com a finalidade de alcançar a segurança de um alimento. Dessa forma, esse conjunto de regras garantem a qualidade sanitária, integridade do alimento, salubridade e conformidade dos produtos para fins alimentícios com os regulamentos técnicos vigentes (ARCANJO; OLIVEIRA, 2019).

As BPF quando aplicadas na indústria conseguem garantir: a segurança dos alimentos, a padronização de processos fabris, as adequações das condições sanitárias, a redução de desperdício, a confiabilidade perante fornecedores, clientes e outras partes interessadas (BRASIL, 2002; RIISPOA, 2020).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), a higienização rege duas etapas distintas: limpeza e sanitização, ambas realizadas em conjunto. A limpeza consiste na remoção física de resíduos, sejam eles orgânicos, inorgânicos ou de outro material indesejável das superfícies das instalações, dos equipamentos e dos utensílios; já a sanitização é a aplicação de agentes químicos aprovados por órgão regulador da saúde ou de métodos físicos nas superfícies das instalações, dos equipamentos e dos utensílios. As etapas são dependentes entre si, de forma a assegurar níveis de higiene microbiologicamente aceitáveis (BRASIL, 2020).

De acordo com Menegaro et al. (2015), os agentes químicos comumente empregados na indústria alimentícia, quando se trata de higienização de equipamentos e utensílios são: Hipoclorito de Sódio (70 %), Ácido Peracético (20 %), Quaternário de Amônio (10 %) e em pouca quantidade se utiliza biguanida e álcool. Já para sanitização de instalações, as porcentagens modificam pouco, sendo Ácido Peracético (60 %), Hipoclorito de Sódio (20 %) e Biguanida (20 %). Vale ressaltar que devem ser aplicados de acordo com cada necessidade, sendo necessário a utilização correta para que se evite a possibilidade de resistência

dos agentes patogênicos que podem se encontrar na indústria, levando em consideração o tempo de ação, concentração final do produto, ação mecânica aplicada e temperatura (SILVA; DUPONT; MACHADO, 2022; INÁCIO, 2022; SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010). Na tabela 1 é possível observar o tipo de resíduo e qual tipo de agente precisa ser empregado para uma boa higienização.

Na indústria, as características das superfícies do ambiente em que o alimento estará inserido, seja esta de utensílios, equipamentos ou instalação, é um fator relevante para a escolha não somente do sanitizante a ser utilizado, como também do tipo de ação que será empregada (ANDRADE, 2008). As superfícies devem ser inodoras, atóxicas, livres de ranhuras e/ou fissuras, de fácil limpeza, incapazes de interagir com alimento, não corrosiva e não absorvente (SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010). Essas características, associadas ao uso correto dos agentes químicos sanitizantes podem contribuir para a eficácia dessa etapa de higienização e por conseguinte evitando o surgimento de resistência desses agentes (GERMANO; GERMANO, 2019).

Tabela 1. Relação de resíduo, forma de solubilidade e grau de dificuldade de sua remoção

Resíduo	Solubilidade	Dificuldade de remoção
Carboidrato	Geralmente solúveis em água	Fácil
Gordura	Insolúveis em água, solúveis em alcalinos, solúveis por tensoativos	Difícil
Proteína	Solúveis em alcalinos e ácidos	Difícil
Sais minerais monovalentes (Na ⁺ , K ⁺)	Solúveis em água	Fácil
Sais minerais divalentes (Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺)	Solúveis em ácidos	Difícil

Fonte: Andrade, 2008.

2.4.1 Agentes empregados na desinfecção e sanitização da indústria de alimentos

Os sanitizantes de modo geral são substâncias capazes de reduzir o número de microrganismos até um nível aceitável previsto nas legislações. Desse modo, a utilização desses agentes são capazes de remover resíduos indesejáveis sejam eles orgânicos ou inorgânicos que estejam presente em equipamento ou em outras superfícies da instalação (piso, teto e paredes)

(FORSYTHE, 2013).

A eficácia dos agentes químicos depende de uma série de fatores, que incluem o ambiente e a interação deste agente com o meio, o que vai definir se haverá substâncias que podem diminuir a ação esperada ou até mesmo inativar. Andrade (2008), traz a ação esperada de sanitizantes químicos frente a determinados grupos de microrganismos que podem estar presentes na indústria alimentícia, o que pode ser observado na Tabela 2.

2.4.1.1 Ácido peracético (PAA)

Esta solução vem sendo estudada e empregada na indústria de alimentos há décadas, seu primeiro estudo quanto suas propriedades esterilizantes e desinfetantes ocorreram após o seu primeiro preparo, sendo este datado de 1900. É uma solução constituída de mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. Esse agente químico vem sendo amplamente utilizado como desinfetante, sanitizante, alvejante, agente esterilizante, oxidante e catalisador de polimerização (SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010; LUUKKONEN; PEHKONEN, 2016).

O PAA, por possuir uma propriedade ácida, altera a estrutura e permeabilidade da membrana celular, o que leva ao extravasamento dos metabólitos internos da célula. Essa propriedade também permite penetrar na célula e afetar negativamente as atividades intracelulares, como a replicação do DNA e a síntese de proteínas, o que acaba gerando morte celular (INÁCIO, 2022). Mostra-se eficaz contra uma gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus (BALDRY; FRASER, 1988; JOLIVET-GOUGEON, et al., 2006; ANDRADE, 2008; SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010). Amostras de *Salmonella* spp. provenientes de abate suíno, submetidas a teste de eficácia contra PAA 0,5 % demonstraram eficácia de 97,3 % após 15 minutos de contato (COLLA et al., 2014).

Tabela 2. Sanitizantes químicos mais usados para controle dos microrganismos em superfícies para processamento na indústria de alimentos e sua eficácia.

Agente químico	Concentração ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	pH	Bactérias		Fungos filamentosos / leveduras	Esporos bacterianos	Vírus
			Gram +	Gram -			
Hipoclorito de sódio	100	10	+++	+++	+-	+-	+-
Dióxido de cloro	5	7	+++	+++	+-	+-	+-
Cloraminas orgânicas	100	6-7	+++	+++	+-	+-	+-
Iodóforos							
• Manipuladores	15	5,5	+++	+++	+-	---	---
• Equipamentos/utensílios	15	3					
Amônia quaternária	200	7-10	+++	---	+++	---	---
Ácido peracético	60	3	+++	+++	+++	+++	+++
Peróxido de hidrogênio	50000	4	+++	+-	+-	+++	+-
Álcool	700000 (70%)	7					
Clorexidina	100	4	+++	+++			

Legenda: +++ = Eficaz +- = Moderadamente eficaz --- = Baixa eficácia - - - = Ineficaz

Fonte : Andrade, 2008.

Na indústria de alimentos, o uso do PAA a 60 mg.L^{-1} é o que se faz eficaz (ANDRADE, 2008). Este sanitizante possui algumas características positivas, que fazem dele um dos mais utilizados na indústria, são elas: alta toxicidade aos microrganismos e baixa toxicidade as formas de vida superiores; eficácia à temperatura ambiente; longa vida útil; baixa corrosividade, exceto ao aço inoxidável; capacidade desodorizante; ampla disponibilidade e custo razoável. Apesar de seguro, por ser uma substância com capacidade irritante à pele e a mucosa, é interessante a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) ao manuseá-lo (GERMANO; GERMANO, 2003; ANDRADE, 2008; SILVA; DUTRA; CADIMA, 2010; GERMANO; GERMANO, 2019).

2.4.1.2 Hipoclorito de sódio (NaClO)

O hipoclorito de sódio é um sanitizante químico pertencente ao grupo dos compostos clorados inorgânicos, sendo um dos agentes mais utilizados na indústria de alimentos, podendo ser encontrado nas concentrações que variam de 2 % a 10 % em sua forma líquida. Conhecido popularmente como água sanitária, possui uma eficácia que permite um ótimo custo benefício, conferido pelas seguintes características: amplo espectro antimicrobiano, rápida ação bactericida, solubilidade em água, facilidade de uso, pouca toxicidade, não inflamável, incolor (ANDRADE, 2008; LÓPEZ-VELASCOS et al., 2012; CAVALCANTE, 2020).

A ação desse sanitizante se dá por diversos mecanismos, uma vez que estes atuam como solventes gordurosos, onde reduzem a tensão superficial da solução remanescente, causando uma reação de saponificação. Pode também neutralizar aminoácidos, formando água e sal, essa reação ocorre devido a saída dos íons de hidroxila, o que gera uma redução de pH (COSTA, 2020). O ácido hipocloroso (HOCl), substância presente na solução hipoclorito de sódio, e íons de hipoclorito (OCl), que interferem no metabolismo celular. Isso permite ele agir tanto na membrana externa como interna da célula alvo, o que aumenta a taxa de inativação desse sanitizante. A sua ação de oxidação está associada à oxidação de grupos sulfidril de algumas enzimas essenciais, que por sua vez gera efeitos deletérios na síntese de DNA (ANDRADE, 2008; LÓPEZ-VELASCOS et al., 2012; COSSU, 2017; CHAVES et al., 2019).

Outros fatores que determinam a eficácia desse agente é o pH e a presença de matéria orgânica. O pH neutro acaba interferindo na disponibilidade do cloro livre dessa substância, estando este na forma de íon hipoclorito e ácido hipocloroso, formas mais eficazes na desinfecção e oxidação de matéria orgânica. Já a matéria orgânica, por reagir com hipoclorito acaba reduzindo a eficácia na desinfecção e sanitização (CHAVES et al., 2019).

2.4.1.3 Cloreto de benzalcônio (BACs)

O cloreto de benzalcônio possui ampla aplicação devido seu potencial antimicrobiano de amplo espectro, seja contra bactérias, fungos ou vírus. Seu primeiro relato de uso é de 1935, por Gerhard Domagk, sendo este comercializado como desinfetante e antisséptico. Desde então vem sendo comercializado para diversos fins, com concentrações e formulações diferentes dependendo da aplicação (PEREIRA;TAGKOPOULOS, 2019).

O mecanismo de ação dos BACs se assemelha aos Quaternários de Amônia, uma vez que são pertencentes a esse grupo, permeiam a membrana plasmática devido a presença das cadeias de alquila e provocam a quebra na distribuição de carga desta membrana devido ao nitrogênio que carregam, assim, promovem o esgotamento celular (WESSELS; INGMER, 2013; PEREIRA;TAGKOPOULOS,2019).

Seu uso é amplamente difundido para sanitização de pisos, paredes e equipamentos, podendo ser incluídos em aplicações domésticas e industriais (ANDRADE, 2008; NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010). É uma substância de fácil preparo e aplicação, além de contribuir com a neutralização de odores. Porém, algumas desvantagens podem ser citadas, como a baixa eficácia contra bactérias Gram-negativas, ineficientes aos esporos e o alto custo (ANDRADE, 2008; NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010; PEREIRA;TAGKOPOULOS, 2019).

2.4.1.4 Clorexidina (CHX)

É um agente antimicrobiano de amplo espectro, sendo utilizado para fins clínicos desde 1950. Este agente é um composto químico sintético que pertence ao grupo das biguanidas, podendo ser utilizado na indústria de alimentos na concentração de 100 mg.L⁻¹ no processo de sanitização, visto que não gera danos a pele e mucosas devido sua baixa toxicidade (ANDRADE, 2008; BROOKES et al.,

2020).

Nas células alvo podem gerar modificações citológicas e fisiológicas na membrana plasmática envolvendo principalmente a permeabilidade da mesma. Assim, em baixas concentrações (0,02 % – 0,06 %) têm-se efeito bacteriostático devido ao deslocamento de Ca^{2+} e Mg^{2+} e perda de K^{+} da parede celular, e em altas concentrações (>0,1 %) um efeito bactericida, devido ao extravasamento de todos os principais componentes intracelulares (ANDRADE, 2008; CIEPLIK, 2019; BROOKES et al., 2020).

Nas bactérias Gram-negativas, a ação da CHX pode ser limitada pela membrana externa dessas bactérias, onde esta atua como uma barreira de permeabilidade, assim, não permite que esse agente chegue até a membrana citoplasmática (CIEPLIK, 2019). Quando se trata de ação antiviral, a CHX causa alteração na permeabilidade da membrana, tendo melhor ação em vírus envelopados do que em não envelopados (BROOKES et al., 2020).

2.5 Biofilme e seu potencial de contaminação

A indústria de alimentos é um ambiente propício para o desenvolvimento de biofilmes bacterianos, uma vez que há disponibilidade de nutrientes para esses microrganismos (ANDRADE, 2008). Neste sentido, entender a mecânica desta formação e os danos que ocasionam quando aderidos se faz necessário.

Entende-se por biofilme um aglomerado de bactérias aderidas a uma superfície, sendo esta envolta por partículas de matéria orgânica, que garantem a permanência e desenvolvimento desse aglomerado. A aderência se dá por meio de filamentos, de natureza polissacarídica ou protéica, denominados glicocálix ou o que vem sendo denominado de exopolissacarídeo (EPS) (ANDRADE, 2008; WELLS et al., 2011). Funciona como uma estratégia de sobrevivência para bactérias, uma vez que, dependendo da sua fase de desenvolvimento (Figura 1), a remoção por meio de sanitizantes sintéticos comerciais se torna ineficaz (BAZARGANI; ROHLOFF, 2016).

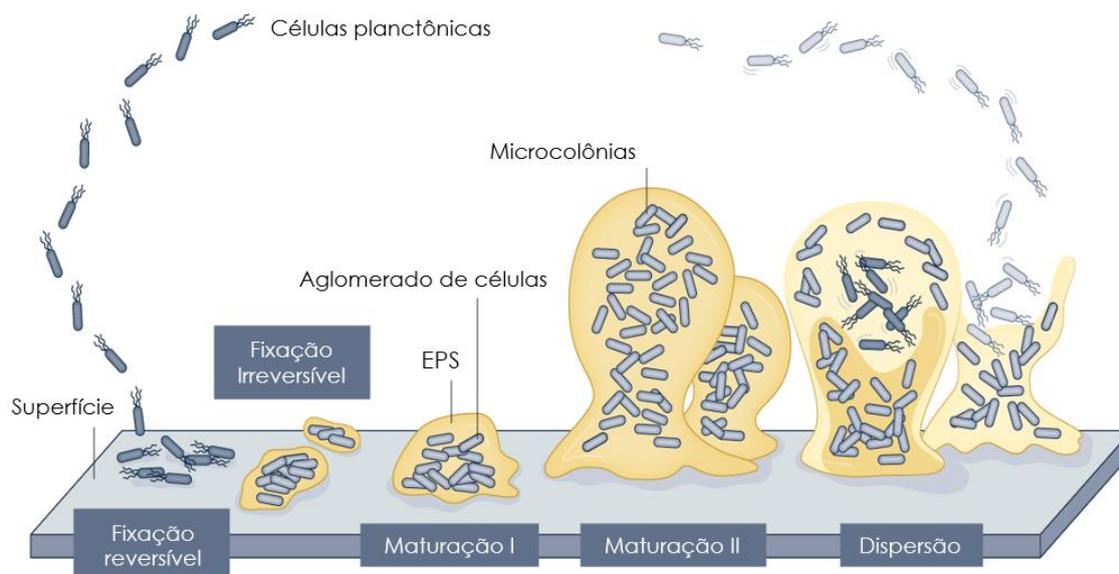


Figura 1: As cinco etapas do desenvolvimento do biofilme sobre superfície.

A formação do biofilme é um processo cíclico que se dá de maneira progressiva e específica em cinco estágios. 1 (Fixação reversível)- Células planctônicas individuais entram em contato com a superfície e se fixam por meio do pólo celular ou flagelo seguindo da fixação longitudinal. Aqui temos atuação da força de Van der Waals. 2 (Fixação irreversível) – Há redução nas taxas de reversão dos flagelos e produção de componentes da matriz do biofilme. 3 (Estágio de maturação I) – Surgem os aglomerados celulares, embutidos na matriz celular com células em diferentes estágios. 4 (Estágio de maturação II) – Células completamente amadurecidas, formando microcolônias também permeadas pela matriz exopolissacarídica. 5 (Dispersão) – Ocorre a desagregação de parte do biofilme, coincidindo com a diminuição e degradação dos componentes da matriz, podendo ser uma etapa de maior susceptibilidade às drogas. Fonte: Adaptado de Sauer et al., 2022, p. 611.

A indústria de alimentos configura-se como um ambiente ideal para fixação microbiana e formação de biofilme, onde a falha na higienização das superfícies que entram em contato com alimentos, equipamentos e ambiente de processamento como um todo, podem contribuir para a aderência deste agregado celular, uma vez que resíduos de alimentos estarão presentes (ANDRADE, 2008). Tendo em vista que a EPS garante uma estrutura inabalável frente aos sanitizantes, esses microrganismos tornam-se persistentes (ANDRADE, 2008; WELLS et al., 2011). Sendo assim, os biofilmes são relatados como principal causa de contaminação do produto final, fonte de transmissão de doenças, reduzindo a vida útil e qualidade dos alimentos e ainda, considerado como reservatório de patógenos infecciosos (SATPATHY et al., 2016; ABEBE, 2020). Logo, reforça-se a importância das boas práticas de fabricação (BPF) como norteadoras da higienização de forma correta dos estabelecimentos,

equipamentos e utensílios do processo fabril, de modo a evitar o desenvolvimento dessa possível fonte de contaminação.

2.6 Óleos essenciais como alternativas aos sanitizantes

Os óleos essenciais (OE) exercem função de proteção às plantas, mantendo os predadores e/ou microrganismos distantes, como também podem atrair polinizadores (LUPE, 2007; COSTA et al., 2008). Possuem características e propriedades que lhes conferem cor, aroma e ação antisséptica, o que aguça os olhos dos pesquisadores (ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020). A composição dos OE's vai depender da espécie da qual foi extraído e tipo de extração utilizado, época do ano e área geográfica (BURT, 2004). A indústria farmacêutica e cosmética utiliza OE há algumas décadas, sendo as primeiras pesquisas atribuídas ao pesquisador alemão Theodor Peckolt, onde seus estudos sobre a fauna e flora brasileira esbarraram na produção, rendimento e composição de OE (BIZZO; REZENDE, 2009; REIS et al., 2020).

O aumento da procura por alimentos *Clean label* na atualidade, destaca alimentos cada vez mais naturais, sem aditivos sintéticos e com preocupação sobre os impactos ambientais e à saúde (CALDEIRA, 2017). Os OE surgem como alternativas dentro do mercado alimentício visto suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (SANTOS et al., 2020). A extração desse óleo pode ser oriunda de folhas, frutos, rizomas, cascas, sementes e flores e podem ser empregados diversos métodos como hidroddestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, enfloração, prensagem a frio dentre outros métodos (ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020). Vale ressaltar que a técnica empregada para extração pode interferir na composição e rendimento do mesmo (NAVARRETE et al., 2011; ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020).

Já há alguns anos, alertas da Organização Mundial da Saúde tratam da busca por novos compostos, agentes e fármacos com ação antimicrobiana, visto o aumento da seleção de organismos resistentes aos já existentes (WHO, 2017). Tendo em vista essa preocupação mundial é que se tem realizado estudos cada vez mais encorpados acerca da utilização de OE como agente antimicrobiano natural. O mecanismo de ação, de modo geral, envolve mutações morfológicas e funcionais da estrutura celular (BURT, 2004). Nas bactérias, esse OE degrada a parede celular, comprometendo as

funções celulares como a regulação metabólica e manutenção do estado energético (BURT, 2004; RASOOLI; ABYANEH, 2004; NAZZARO et al., 2013; WHO, 2017; MIR et al., 2018). Estudos como os de Santos et al. (2020) e Reis et al. (2020) que comprovam a ação de óleos essenciais contra os principais patógenos alimentares só reforçam essa nova alternativa para enfrentar essa problemática de saúde pública.

2.6.1 Andiroba

Andiroba (*Carapa guianensis*), também conhecida popularmente por andiroba-saruba, carapa, carapá, andirova, nandiroba e landiroba, é uma árvore robusta encontrada na região de bacia amazônica como várzeas e regiões alagadiças (LORENZI, 1992; VAUCHER et al, 2015). Espécie pertencente a família das *Meliaceae* que pode atingir mais de 30 metros de altura e com seu tronco mede em torno de 50 – 120 cm de diâmetro, é apreciada pela importância empregada à indústria madeireira e por suas propriedades medicinais (LORENZI, 1992). O óleo possui em sua composição uma variedade de ácidos graxos como: oléico, palmítico, linoléico, esteárico e palmitoléico, sendo estes seus principais componentes (MELO et al., 2018).

Estima-se que a produção de sementes gira em torno de 180 kg a 200 kg de sementes por árvore ao ano, e que estas concentram cerca de 60-70 % do óleo (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002). Em Manaus, cidade situada na região norte do Brasil, o óleo possui grande importância para a economia regional, uma vez que seu uso foi introduzido pela medicina indígena e se difundiu, popularizando-se devido sua ação antiinflamatória, antialérgica, acaricida, larvicida e antimicrobiana (LORENZI, 1992; SILVA et al., 2004; BARROS et al., 2012; CAMPOS et al., 2013; MECCIA et al., 2013; WANZELER et al., 2017). Santos et al., (2012), avaliaram a ação bactericida contra isolados de *Paenibacillus larvae*, não sendo observado nenhuma célula viável após 24 horas de contato do isolado com o OE, comprovando assim sua eficácia contra bactérias (Figura 2).



Figura 2: Ouriço de andiroba com suas sementes.
Fonte: Próprio autor, 2022.

2.6.2 Copaíba

Copaibeiras são árvores que pertencem a família das *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera* com várias espécies sendo encontradas na Amazônia, onde a mais recorrente no norte do país é a *Copaifera officinalis* L (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Popularmente é denominada como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva, copai, copaibarana, copaibo, copal, marimari e bálsamo dos jesuítas (CASCON, 2004; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). A árvore pode chegar até 60 metros, a depender da espécie, variando em diâmetro também (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; CORRÊA et al., 2021) (Figura 3). A composição deste óleo-resina varia conforme a espécie, mas em sua maioria os sesquiterpenos e diterpenos são encontrados predominantemente (CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA-JUNIOR et al., 2007), onde β -cariofileno e o ácido copálico os elementos encontrados na maioria das copaíferas (LEANDRO et al., 2012).

O óleo-resina extraído da árvore é utilizado por populares há décadas, sendo um dos produtos florestais não madeireiros mais explorados (VEIGA JUNIOR; PINTO; 2002). Estudos recentes demonstram seu potencial como anti-inflamatório, antiblenorrágico, antirreumático, cicatrizante, antissépticas, larvicida antimicrobiana; antifúngica, ansiolítico, larvicida, parasiticida e neuroprotetor. O mercado farmacêutico e cosmético já explora as propriedades da copaíba há tempos, sendo encontrado

produtos como shampoo, perfumaria, sabonetes, cremes, géis entre outros (VEIGA JUNIOR; PINTO; 2002; CORRÊA E AL., 2021; LAMEIRA et al., 2022). Pieri (2007) também testou *in vitro* a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, sobre a bactéria *Streptococcus pyogenes*, obtendo resultados satisfatórios quanto a inibição do crescimento da bactéria.



Figura 3: Extração do óleo de Copaibeira.

Fonte: <https://www.stcp.com.br/sem-categoria-pt/projeto-manejo-de-copaiba-da-mrn/>

2.6.3 Pimenta rosa

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma espécie conhecida no Brasil popularmente como pimenta rosa, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira vermelha, aroeira de Minas, podendo receber outras denominações fora do país como: Brazilian peppertree e Florida Holly (Estados Unidos); Christmas-berry (Havaí); False pepper or Faux poivrier (Riviera Francesa); Chichita (Argentina); Copal (Cuba) e Pimienta de Brasil (Porto Rico) (SANTOS et al., 2020). Pertencente à família das Anacardiaceae, é nativa da América do Sul e devido a sua rápida propagação e desenvolvimento é

considerada como uma espécie invasora (CLEMENTE, 2006; MACEDO, 2018). A composição química do OE de pimenta-rosa baseia-se em monoterpenos e sesquiterpenos, onde β -mirceno e β -cubebeno são os principais compostos (DANNENBERG, 2017).

Diferentes partes da planta, como frutos, caule, casca do caule e folhas vem sendo utilizadas na medicina popular de diversas formas, seja em chás, em forma de óleos ou pó (CLEMENTE, 2006). Isso se dá devido suas propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiulcerogênica, anticancerígena, cicatrizante, entre outras (GILBERT; FAVORETO, 2011; ENNIGROU et al., 2018). As substâncias bioativas presentes em espécies dessa família tem despertado interesse em estudos onde estes são utilizados em substituição de agentes sintéticos, muito pela busca de aditivos mais naturais (SANTOS et al., 2020). Os seus frutos possuem sabor suave e levemente picante, e devido a essas características sensoriais, são amplamente utilizados na culinária internacional, podendo ser consumidos inteiros ou moídos (GOMES et al., 2004) (Figura 4).

Já se tem estudos demonstrando a ação desse OE contra bactérias, como o de Dannenberg (2017), que avaliou a CIM e CBM de sete bactérias patogênicas de interesse alimentar, sendo três Gram positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*) e quatro Gram negativas (*P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *E.coli* e *S. Thyphimurium*). Dessas, todas as Gram-positivas e apenas duas Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *S. dysenteriae*) demonstraram atividade antimicrobiana.

Figura 4: Frutos verdes e maduros da Pimenta rosa.



Fonte: Dannenberg, 2014, p. 23.

2.6.4 Tomilho branco

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta que pertence à família Lamiaceae, esta por sua vez engloba cerca de 150 gêneros, com aproximadamente 2.800 espécies distribuídas em todo o mundo (PORTE; GODOY, 2007). Esse arbusto é originário da região mediterrânea e vem sendo cultivada no Sul e Sudeste do Brasil, possui um ciclo de vida que varia de 10 a 15 anos, possuindo floração nos meses de junho e julho (ROCHA, 2013; MANDAL, DEB-MANDAL, 2016) (Figura 5). A composição do OE de tomilho-branco pode variar, mas em sua maioria os compostos são: carvacrol, timol, γ -terpineno e p-cimeno (Yaagoubi et al, 2021).

Sua utilização permeia o mercado condimentar, medicinal e aromático, uma vez que possui atividade antioxidante, antimicrobiana, antifúngica expectorante, entre outros. A sua aplicação na indústria alimentícia como aditivo natural vem sendo amplamente estudada devido sua composição rica em Timol, componente que confere ação antibacteriana, antihelmíntica e antifúngica (FREIRE et al., 2014; HYUN et al., 2015; MERLIM; CRUZ, 2021; DEMARTELAERE et al., 2021).



Figura 5: Exemplo de arbusto do Tomilho branco.

Fonte: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/85469-Thymus-vulgaris>

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em diferentes pontos do abate de bovinos e em cortes cárneos bovinos do varejo do Sul do Rio Grande do Sul, determinar o perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos e sanitizantes, avaliar o potencial de formação de biofilme e a ação antibiofilme de óleos essenciais.

3.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1 – Avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas e em fezes em pontos distintos da linha de abate de bovinos de dois abatedouros-frigoríficos de Pelotas, RS sob inspeção estadual;

Objetivo 2 - Avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em cortes cárneos bovinos do varejo provenientes de supermercados de Pelotas, RS;

Objetivo 3 – Determinar os genes de virulência *hlyA*, *invA*, *pefA*, *spvC* e *sefA* nos isolados de *Salmonella* spp.;

Objetivo 4 – Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos por meio do teste de disco-difusão em ágar;

Objetivo 5 – Determinar o perfil de susceptibilidade a sanitizantes por disco-difusão em ágar, CIM e CBM;

Objetivo 6 – Determinar o potencial de formação de biofilme em cupons de aço inoxidável;

Objetivo 7 – Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais (OE), bem como sua ação sobre biofilmes pré-formados de *Salmonella* spp. em superfícies de aço inoxidável.

4. ARTIGO 1 – Resistance to antimicrobials and sanitizers and potential for biofilm formation in *Salmonella* spp. isolated from beef carcasses in Brazil.

Resistência a antimicrobianos e sanitizantes e potencial para formação de biofilme em isolados de *Salmonella* spp. de carcaças bovinas no Brasil.

Artigo a ser submetido para o periódico International Journal of Food Microbiology, Qualis CAPES A1.

Resistance to antimicrobials and sanitizers and potential for biofilm formation in *Salmonella* spp. isolated from beef carcasses in Brazil

Ytaiara Lima Pereira¹; Andrielle Dias da Cunha¹; Eric Ossugui Hiroioshy¹; Ângela Maria Fiorentini¹, Wladimir Padilha da Silva¹; Graciela Volz Lopes^{1*}.

¹Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

***Corresponding author:** Campus Capão do Leão s/nº, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão, RS, Brazil, 96160-000. Phone number: +55 53 98129-5199.

E-mail: gracielavlopes@yahoo.com.br

Abstract

In Brazil, meat production is of great economic importance for the domestic market and exports. The most effective way to ensure that meat products are produced safely is by constantly monitoring microorganisms, such as *Salmonella*. In this context, the objective was to evaluate the occurrence of *Salmonella* spp. in slaughterhouses and beef cuts at retail stores in southern Rio Grande do Sul, determine the phenotypic profile of susceptibility to both antimicrobials and sanitizers, evaluate the potential for biofilm formation of the isolates, and test the action of essential oils (EO) in the removal of formed biofilm. Of the 100 evaluated carcasses, six were contaminated with *Salmonella*, with the highest isolation rate observed after the final washing point (4 %), followed by the point after evisceration (2 %) and after bleeding (1 %). No samples of retail meat cuts or employee feces showed *Salmonella* detection. All isolates (n=7) were identified as belonging to serovar Agona and presented the virulence genes *hilA* and *invA*. Only three presented the genes *spvC*, *pefA*, and *sefA*. The isolates were evaluated for resistance to antimicrobials and sanitizers, biofilm formation potential, and antimicrobial action of EO. Thus, *S. Agona* isolates were susceptible to ampicillin, amoxicillin, ceftazidime, tobramycin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, and chloramphenicol, intermediate to imipenem, and one isolate was intermediate to ciprofloxacin. Among the sanitizers tested, only chlorhexidine was effective, with a MIC of 8 µg.mL⁻¹. The isolates showed potential for biofilm formation on stainless steel coupons at temperatures of 4 °C, 25 °C, and 37 °C. The EO of andiroba, copaiba, and pink pepper (green and ripe) did not show antimicrobial action, but the EO of white thyme showed activity, with halo formation ranging from 18 mm - 26 mm. In addition, the EO of white thyme was effective in removing biofilms of *S. Agona* on stainless steel coupons at a concentration of 29,06 mg.mL⁻¹. Thus, the study highlights the importance of monitoring and controlling *Salmonella* spp. contamination in meat production to ensure food safety. The use of alternative methods, such as essential oils, mainly white thyme, could effectively control the biofilm formation of *Salmonella Agona*.

Keywords: slaughter; meat; adhesion; stainless steel; essential oil.

1 Introdução

Uma das principais bactérias relacionadas a surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) é *Salmonella* spp. Este microrganismo

pertence à família *Enterobacteriaceae*, e possui duas espécies responsáveis por causar doenças em humanos, *S. enterica* e *S. bongori*, que se subdividem em subespécies. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possui grande relevância e impacto para a saúde pública e se configura como importante patógeno com potencial zoonótico, capaz de causar doenças entéricas e até mesmo septicemias em humanos (BRASIL, 2022; CDC, 2022). Sua patogenicidade está associada aos genes presentes nas ilhas de patogenicidade, o que denota a virulência da *Salmonella* spp. (Campioni et al., 2012).

A carne bovina é uma das proteínas mais consumidas mundialmente com grande representatividade econômica para os países produtores. No Brasil, o consumo *per capita* de carne bovina, no ano de 2021, foi de 34,3 kg/ano (ABIEC, 2022). O rebanho bovino brasileiro está enquadrado como o segundo maior rebanho do mundo, configurando um total de 196,47 milhões de cabeças. Do total de carne produzida em 2021, 25,51 % foram destinadas à exportação, ou seja, 2,48 milhões de toneladas exportadas, o que coloca o Brasil no ranking de maior exportador. A China é um dos maiores consumidores da carne bovina brasileira (IBGE, 2022, ABIEC, 2022). Ressalta-se que atrelado a exportação encontram-se aspectos relacionados à sanidade e segurança do produto (CALIARI, 2019).

Os microrganismos encontram na carne um ambiente ideal para sua multiplicação, devido à sua composição rica em nutrientes, atividade de água e pH favoráveis (RHOADES et al., 2009; SILVA et al., 2020). Na indústria de alimentos, o programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) auxilia na detecção dos principais pontos de contaminação e de que forma os perigos podem ser minimizados ou eliminados, a fim de garantir a segurança do alimento (QUINTINO; RODOLPHO, 2018). No fluxograma de abate bovino, os Pontos Críticos de Controle (PCC) envolvem a esola, evisceração e resfriamento (BORCH; ARINDER, 2002; AZEVEDO, 2009; ARAÚJO et al., 2015).

Falhas na higienização de superfícies e equipamentos na indústria podem propiciar a contaminação dos alimentos e desencadear surtos de DTHA, uma vez que, atrelada aos mecanismos de adaptação e resistência de um microrganismo, podem ocasionar a formação de biofilmes microbianos e se tornar fonte promissora de contaminações do produto final (PARIZZI et al., 2004). Os biofilmes são estruturas complexas formadas por microrganismos que se mantêm aderidos a uma superfície através de uma matriz polimérica extracelular de exopolissacarídeos (EPS), sendo

esta produzida por eles (FENG et al., 2017). A matriz dificulta a remoção dessas bactérias aderidas à superfícies por meio de agentes sanitizantes comerciais e, por consequência, contaminando a carne (CORCORAN et al., 2014).

A busca por alternativas ao uso de sanitizantes comerciais devido a ineficácia dos produtos já utilizados pelo desenvolvimento da resistência microbiana e, devido à toxicidade desses produtos, focando em substâncias e em concentrações menos ofensivas à saúde do consumidor, tem sido objeto de estudo (WHO, 2017; ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020). Assim, novos compostos com ação antimicrobiana obtidos a partir de espécies vegetais, como os óleos essenciais, surgem como alternativa para o controle microbiológico e ainda como agentes de remoção de biofilmes (MIR et al., 2018).

A resistência aos antimicrobianos é elencada como um dos maiores desafios do sistema de saúde na atualidade, uma vez que coloca em risco a eficácia dos tratamentos e profilaxias de doenças contemporâneas (HUEMER et al., 2020). O uso errôneo de fármacos ocorre não somente na medicina humana, como também na medicina veterinária, onde são utilizados para transformar o sistema de produção mais rentável, seja como uso profilático em doenças de rebanho ou ainda como promotor de crescimento, possibilitando assim uma maior produtividade animal (WHO, 2022). As bactérias expostas de forma incorreta aos antimicrobianos, seja pela aplicação ou ainda tempo de uso, se tornam resistentes e podem transitar entre homens e animais por meio da alimentação, água e meio ambiente (WHO, 2022). Microrganismos resistentes surgem constantemente e são propagados pela cadeia produtiva de alimentos, gerando um alerta mundial. A WHO considera *Salmonella* spp. como grupo de alta prioridade global, quando se diz respeito a bactérias resistentes a antimicrobianos (WHO, 2017; TACONELLI et al., 2018).

Nesse contexto, o estudo tem por objetivos avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças e fezes de bovinos de abatedouros-frigoríficos e cortes cárneos bovinos do varejo, determinar o perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos e sanitizantes, avaliar o potencial de formação de biofilme e ação antibiofilme de óleos essenciais.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta

Durante o período de novembro de 2021 a agosto de 2022, 100 carcaças bovinas provenientes de dois frigoríficos (A e B) localizados na cidade de Pelotas-RS foram amostradas em quatro (4) pontos diferentes da linha de abate, sendo eles: couro após a sangria (P1), fezes antes da oclusão do reto (P2), carcaça após a evisceração (P3) e carcaça após a lavagem final (P4). Utilizou-se a técnica de swab de superfície, com auxílio de esponjas esterilizadas previamente umedecidas com solução salina peptonada (0,85 % NaCl e 0,1 % peptona), sendo friccionadas contra a carcaça na área do peito, compreendendo uma área de aproximadamente 400 cm² (BRASIL, 2019). As fezes foram coletadas com swab esterilizado e transportadas em meio Cary Blair (ABSORVE-CRAL). Fezes de colaboradores também foram avaliadas quanto a presença de *Salmonella* spp.. Os colaboradores foram previamente orientados acerca dos procedimentos de coleta do material (Anexo A), bem como apresentados ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Assim, disponibilizou-se coletores universais e swab estéril, de modo que a coleta fosse realizada em ambiente domiciliar, seguindo orientações de coleta do Lacen (BAHIA, 2022). Durante o período de outubro de 2022 foram coletadas 24 amostras de carnes fracionadas bovinas, *in natura* expostas nas gôndolas refrigeradas, de três supermercados, escolhidos aleatoriamente, localizados na cidade de Pelotas, RS. Os cortes escolhidos foram peito com osso e coxão de fora, por disponibilidade nos estabelecimentos, contendo uma média de 0,356 gramas cada, as amostras foram obtidas diretamente dos balcões refrigerados. Todas as amostras foram transportadas acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPel, sob o número 04536218.6.3002.5317.

2.2 Isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Para o isolamento de *Salmonella* spp. utilizou-se o método ISO 6579, com modificações. Cada amostra, constituída por quatro esponjas, recebeu 180 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) 1% e foi homogeneizada em Stomacher a 230 rpm por 1 min e incubadas a 37 °C por um período de 24h. Após incubação, alíquotas de 0,1 mL foram depositadas em tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassilidis

(RV) e alíquotas de 1,0 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Tetrionato (TT), os quais foram previamente adicionados de 0,2 mL de solução de iodo e 0,1 mL de solução de verde brilhante. Os tubos de RV foram incubados em banho-maria a 42 °C por 24h e os tubos de TT incubados em estufa a 37 °C pelo mesmo período. Alíquotas dos caldos RV e TT foram semeadas em placas. Colônias características no meio Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Hektoen Entérico (HE), com morfologia típica do gênero *Salmonella* spp., foram selecionadas (no mínimo 3 colônias características), e semeadas em placas de Petri contendo ágar Triptona de Soja (TSA), incubadas a 37 °C por 24h, e submetidas a posterior identificação bioquímica através do cultivo nos meios (BRASIL, 2011): Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Teste do metabolismo de carboidratos); UREIA (Teste de hidrólise da ureia); e Ágar Lisina Ferro (LIA) (Teste de descarboxilação da lisina e produção de H₂S). As amostras que apresentaram comportamento bioquímico característico nesses testes foram avaliadas em relação ao antígeno O (somático) e H (flagelar) por sorologia, utilizando os soros polivalentes para os antígenos somático e flagelar de *Salmonella* spp. (PROBAC Ltda.). Em todas as análises, a cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi utilizada como controle positivo.

2.3 Extração de DNA e Perfil de Virulência

A extração de DNA se deu por fenol clorofórmio, como descrito por Sambrook (2001), com pequenas adaptações. A pesquisa dos genes *hilA*, *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA* foi realizada através da técnica de PCR. A sequência dos primers e referências utilizados neste estudo estão demonstrados na Tabela 3. A pesquisa de cada gene foi realizada separadamente. As cepas de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, foram utilizadas como controles positivos nas reações de PCR.

Tabela 3. *Primers* utilizados para a confirmação do gênero *Salmonella* e dos genes de virulência.

Gene	Primer (5' – 3')	Amplicon	Referência
<i>hilA</i>	F: GCGAGATTGTGAGTAAAAACACC R: CTGCCCCGAGATATAATAATCG	413	Crâciunas et al. (2012)
<i>invA</i>	F: TTGTTACGGCTATTTTGACCA R: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521	Swamy et al. (1996)
<i>spvC</i>	F: CGGAAATACCATCTACAA ATA R: CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	Swamy et al. (1996)
<i>pefA</i>	F: TTCCATTATTGCACTGGGTG R: AAGCCACTGCGAAAGATGCC	497	Haneda et al. (2001)
<i>sefA</i>	F: GCAGCGGTTACTATTGCAGC R: TGTGACAGGGACATTTAGCG	330	Woodward and Kirwan (1996)

As reações de PCR compreenderam um volume final de 25 µL, sendo: 10 ng de DNA da amostra; 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (CELLCO®); 8,5 µL de água ultrapura e 20 pmol de cada primer. As condições de amplificação para os genes *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA* consistiram em uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos (94 °C por 30 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 7 min (MJ Research). Para o gene *hilA* as condições de amplificação do DNA foram: desnaturação a 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos (94 °C por 1 min, 63 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C por 10 min (MJ Research).

A separação e visualização dos produtos amplificados ocorreu por eletroforese em gel de agarose (Ludwing Biotec) a 1,5 % por aproximadamente 70 minutos, com utilização do marcador de peso molecular de 1 Kb (iNVIROGEN®). Utilizou-se gel red para que os geis fossem visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (Loccus Biotecnologia®).

2.4 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e sanitizantes

2.4.1 Teste de suscetibilidades aos antimicrobianos

A suscetibilidade dos isolados identificados como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* aos antimicrobianos foi avaliada por meio do teste de disco-difusão em ágar, de acordo com CLSI (2022) para bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo classificados como: suscetíveis, intermediários ou resistentes. Foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina 0,85 %, ajustando a turbidez até 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Alíquotas foram semeadas, com auxílio de

swab estéril, na superfície do ágar Muller-Hinton. Aguardou-se cerca de três minutos para que esse inóculo fosse absorvido e então os discos de antimicrobianos foram adicionados. As placas foram incubadas a 37 °C por 18h. O resultado da zona de inibição foi expresso em milímetros (mm). Foram testados nove agentes antimicrobianos de diferentes classes, conforme demonstrado na Tabela 4. A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle do teste.

Tabela 4 – Agentes antimicrobianos e critérios interpretativos para o teste de suscetibilidade por disco-difusão em ágar.

Classe	Antimicrobiano	CLSI*			
		Disco	Suscetível	Intermediário	Resistente
Penicilinas	Ampicilina	10 µg	≥ 17	14-16	≤ 13
	Amoxicilina**				
Cefalosporinas	Ceftazidima	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17
Carbapenens	Imipenem	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5 µg	≥ 31	21-30	≤ 20
Aminoglicosídeos	Tobramicina	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	≥ 15	12-14	≤ 11
Outras Classes	Sulfametoxazol/	23.75/	≥ 16	11-15	≤ 10
	Trimetoprima	1.25 µg			
	Cloranfenicol	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12

* CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute, Document M100, 32nd edition, 2022.

** Parâmetros interpretativos para o teste de suscetibilidade por disco-difusão em ágar de acordo com EUCAST.

2.4.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de sanitizantes

A CIM foi realizada com a finalidade de quantificar a resistência de quatro sanitizantes amplamente utilizados na indústria de alimentos, sendo eles: ácido peracético, cloreto de benzalcônio, clorexidina e hipoclorito de sódio, de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo (BELTRAME, 2009). Para isso, a ATCC 14028 de *Salmonella* Typhimurium e isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* foram reativados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 24h, sendo esgotados em placas contendo ágar TSA e novamente incubados a 37 °C por 24h. Após esse período, preparou-se a suspensão celular em solução salina 0,85 %, ajustando a turbidez até 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹).

As placas de microtitulação foram preenchidas com a suspensão bacteriana (20 µL) e caldo Mueller-Hinton proveniente da diluição dos sanitizantes (180 µL) utilizando concentrações variando de 0,5 µg.mL⁻¹ a 4.096 µg.mL⁻¹, sendo estas incubadas a 37 °C por 24h. A CIM considerada foi a menor concentração de sanitizante que inibiu completamente o crescimento bacteriano visivelmente. A CBM

foi realizada após a determinação da CIM, indicando qual a concentração mínima de composto capaz de eliminar o microrganismo. Assim, 10 µL do produto do pocinho da microplaca onde não ocorreu crescimento bacteriano, foram cultivados em ágar Mueller-Hinton e incubados por 37 °C por 24h, atestando se a concentração teve ação bactericida (Filho et al., 2019). Como ponto de corte considerou-se as seguintes concentrações: 10 µg.mL⁻¹ de cloreto de benzalcônio (MULLAPUDI et al., 2008), 200 µg.mL⁻¹ de clorexidina (UEDA; KUWABARA, 2007) e 200 µg.mL⁻¹ para ácido peracético e hipoclorito de sódio (FDA, 2018).

2.5 Avaliação da formação de biofilme em aço inoxidável

Para avaliar o potencial de formação de biofilme dos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, cupons de aço inoxidável AISI 304 (rugosidade de 0,366 mm, quadrado, 10 mm:10 mm:1 mm) foram usados. Antes do uso, os cupons foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água destilada, imersos em etanol 70 % (v/v) por 1h à temperatura ambiente, enxaguados novamente com água destilada, colocados individualmente em tubos de vidro contendo 9 mL de TSB e esterilizados a 121 °C por 15 min (Parizzi et al, 2004). A cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi utilizada como controle positivo.

A formação de biofilme de isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* foi realizada de acordo com o método descrito por Andrade et al. (1998), com adaptações. Para a realização do teste, 1 mL do inóculo ajustado à 0,5 na escala de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC.mL⁻¹) foi adicionado aos tubos contendo cupons esterilizados e 9 mL de caldo TSB (Merck®), e incubados nas temperaturas de 4 °C, 25 °C e 37 °C por 24h. Posteriormente, os cupons com biofilmes formados foram adicionados a tubos contendo 5 mL de Água Peptonada (AP) (acumedia®) 0,1 % e deixados em repouso por 1 min para remover as células planctônicas. Em seguida, os cupons foram colocados em tubos contendo 10 mL de AP e submetidos ao vórtex por 2 min para remover células sésseis. Diluições decimais seriadas foram preparadas e semeadas em placas de ágar TSA (HIMEDIA®), as quais foram incubadas à 37 °C por 24h. As colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC.cm⁻². Os testes foram realizados em triplicata e o experimento em três repetições.

2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de andiroba (*Carapa guianensis*), copaíba (*Copaifera* spp.), pimenta-rosa (*Schinus*

***terebinthifolius* Raddi) e tomilho branco (*Thymus vulgaris* L).**

A atividade antimicrobiana dos OE foi avaliada qualitativamente, pela técnica de disco-difusão em ágar e, quantitativamente, pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Para a técnica de disco-difusão em ágar, os inóculos bacterianos foram preparados ajustando a turbidez até 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e, posteriormente, semeados em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton (MH, Kasvi, Brasil). Discos esterilizados de papel filtro em branco foram colocados na superfície do meio e impregnados com 10 µL dos OE puros. Como controles positivo e negativo foram usados discos de ampicilina (10 µg) e água destilada esterilizada (10 µL), respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. A formação de zonas de inibição ao redor dos discos indicou atividade antimicrobiana e foi medida em milímetros (mm). Foram realizadas duas repetições do teste em duplicata.

A CIM de cada OE foi testada pelo método de microdiluição em placa (CLSI, 2018). Em cada poço da placa, foram adicionados 50 µL de caldo Muller Hinton (MH, Kasvi, Brasil) acrescido de 1 % do emulsificante Tween 80 (Sigma®, EUA). Foram realizadas diluições decimais de base dois dos OE variando de 25 % a 0,012 %. Imediatamente, adicionou-se 50 µL do inóculo, ajustado a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura e, como controle positivo, meio de cultura com inóculo bacteriano (sem adição de OE). Também foi feito o controle de esterilidade de cada OE. Os testes foram realizados em triplicata com três repetições para cada isolado. Após o período de incubação, 10 µL do reagente revelador Resazurina (Êxodo®, Brasil), foram adicionados em cada poço da placa, a qual foi posteriormente incubada a 37 °C por 2h. A alteração da cor azul para rosa indicou atividade celular.

Para a determinação da CBM, 10 µL de cada poço que não apresentou multiplicação bacteriana aparente foram semeados em placas de ágar TSA e incubados a 37 °C por 24h. A ação bactericida foi determinada através da ausência ou presença de multiplicação bacteriana. O teste foi realizado em triplicata e com três repetições para cada isolado.

2.7 Avaliação da remoção do biofilme de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* em aço inoxidável por OE

A avaliação da ação do OE sobre o biofilme formado de *Salmonella* em aço inoxidável, foi realizada com três isolados provenientes de carcaças bovinas que apresentaram os cinco genes de virulência estudados. A ação antibiofilme do OE foi avaliada em biofilmes formados a 37 °C, nas concentrações de CIM determinadas na avaliação da CIM do OE com melhor resultado na ação antimicrobiana. Foi preparado solução do OE em água destilada contendo 1 % do surfactante Tween 80 (Sigma®). Após a formação de biofilme por *Salmonella* spp. em 24h, os cupons de aço inoxidável foram transferidos para tubos contendo 5 mL de água peptonada 0,1 % (AP), e ficaram imersos em repouso por 1 min, para remoção de células planctônicas. Logo após, foram transferidos para tubos contendo 2 mL da solução do OE nas concentrações a serem testadas (CIM), e ficaram imersos durante 15 min. Após, foram colocados em tubos contendo 3 mL de tiosulfato de sódio 0,1 M por 1 min, para neutralizar a ação da solução de OE (VERAS et al., 2014). Posteriormente, foram transferidos para tubos contendo 10 mL de AP 0,1 %, e submetidos a agitação em vórtex por 2 min, para remoção de células sésseis. Finalmente, foram realizadas diluições decimais seriadas em microtubos contendo 0,9 mL de AP 0,1 %, e cada diluição foi semeada em placas de petri contendo ágar TSA, e incubadas a 37 °C durante 24h. Após este período, as células viáveis foram contadas e os resultados foram expressos em Log UFC.cm⁻². Os testes foram realizados em triplicata.

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e Tukey test ($p < 0.05$) no programa estatístico Past.

3 Resultados

3.1 Ocorrência de *Salmonella* spp. em fezes, carcaças bovinas e cortes cárneos do varejo

Das 100 carcaças amostradas, seis do frigorífico A estavam contaminadas com *Salmonella* spp., resultando em uma ocorrência de 6,0 %. A maior taxa de isolamento de *Salmonella* spp. ocorreu no P4, que corresponde à carcaça após a lavagem final, com quatro (4,0 %) carcaças contaminadas. No couro após a sangria e na carcaça após a evisceração, a taxa de isolamento de *Salmonella* spp. foi de 1,0 % e 2,0 %, respectivamente. *Salmonella* spp. não foi encontrada em amostras de fezes bovinas coletadas antes da oclusão do reto, no momento do abate (Tabela 5). Com relação à fezes de colaboradores que atuam diretamente na linha de abate, *Salmonella* spp. também não foi detectada. Todos os isolados de *Salmonella* foram identificados como pertencentes ao sorovar Agona.

Tabela 5. Isolamento de *Salmonella* spp. em diferentes pontos da linha de abate de bovinos.

Frigorífico	Coleta	Couro após sangria (P1)	Fezes antes da oclusão do reto (P2)	Carcaça após evisceração (P3)	Carcaça após lavagem final (P4)
A	1º	0	0	0	0
A	2º	C14*	0	C14*	C12* e C19*
A	3º	0	0	0	C24* e C25*
A	4º	0	0	C35*	0
A	5º	0	0	0	0
B	6º	0	0	0	0
B	7º	0	0	0	0
B	8º	0	0	0	0
B	9º	0	0	0	0
B	10º	0	0	0	0
Total de isolados		1 (1,0%)	0	2 (2,0%)	4 (4,0%)

* Identificação da carcaça

Foram coletadas 24 amostras de cortes cárneos do varejo da cidade de Pelotas-RS, provenientes de três supermercados distintos (A, B e C). Em cada supermercado foram coletadas quatro amostras de cada tipo de corte, sendo eles coxão de fora e peito bovino com osso. Dos 24 cortes amostrados, nenhum estava contaminado com *Salmonella* spp. (Tabela 6).

Tabela 6. Isolamento de *Salmonella* spp. em cortes cárneos bovinos do varejo.

Supermercado	Número de amostras coletadas		Número de amostras positivas para <i>Salmonella</i>	
	Coxão de fora	Peito bovino com osso	Coxão de fora	Peito bovino com osso
A	4	4	0	0
B	4	4	0	0
C	4	4	0	0
Total	12	12	0	0

3.2 Perfil de virulência

Os fragmentos esperados para os genes *hylA* e *invA*, utilizados para a confirmação do gênero *Salmonella*, foram amplificados em todos os sete isolados testados. Em três isolados (124, 125 e 126) foi possível observar a presença dos genes de virulência *spvC*, *pefA* e *sefA*, frequentemente relatados em *Salmonella* spp.

3.3 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e sanitizantes

Os isolados de *S. Agona* que apresentaram os genes de virulência *spvC*, *pefA* e *sefA* (124, 125 e 126) foram caracterizados quanto a suscetibilidade a antimicrobianos e sanitizantes, e avaliados quanto a habilidade de formar biofilme. Todos os isolados de testados foram suscetíveis à ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, tobramicina, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetroprima e cloranfenicol. Todos os isolados apresentaram halos de inibição classificados como intermediários ao imipenem (entre 20 e 22 mm), na disco-difusão em ágar. Apenas um isolado apresentou halo de inibição classificado como intermediário à ciprofloxacina (30 mm). Resistência antimicrobiana não foi observada frente à nenhuma droga testada.

Em relação aos sanitizantes avaliados no presente estudo, apenas clorexidine mostrou eficácia contra todos os isolados de *Salmonella* spp. testados, com valores de MIC e CBM de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, os isolados demonstraram reduzida suscetibilidade ao ácido peracético, cloreto de benzalcônio e ao hipoclorito de sódio. Os valores de MIC foram de 4.096 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ácido peracético, 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloreto de benzalcônio e variaram de 1.024 a 2.048 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o hipoclorito de sódio. A CBM do ácido peracético, cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio também corresponderam a 4.096 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1.024-2.048 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Suscetibilidade à sanitizantes em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Agona provenientes de carcaças bovinas.

Isolado	Carcaça	Ponto	Suscetibilidade aos sanitizantes ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)							
			Ácido peracético		Cloreto de benzalcônio		Clorexidina		Hipoclorito de sódio	
			CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
124	C12	P4	4.096	4.096	32	32	8	8	1.024	1.024
125	C14	P1	4.096	4.096	32	32	8	8	1.024	1.024
126	C14	P3	4.096	4.096	32	32	8	8	2.048	2.048

P4 - Carcaça após lavagem final ; P1 - Couro após sangria; P3 - Carcaça após evisceração.

3.4 Avaliação da formação de biofilme

Os isolados de *S. Agona* (124, 125 e 126) foram submetidos ao teste de formação de biofilme em aço inoxidável em três diferentes temperaturas: 4° C, 25° C e 37° C. Na Tabela 8 é possível observar as médias de contagens bacterianas. Os três isolados de *S. Agona* foram considerados potencialmente formadores de biofilmes em todas as temperaturas avaliadas.

Tabela 8 – Potencial de formação de biofilme de isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Agona em cupons de aço inoxidável em diferentes temperaturas.

Isolado	Carcaça	Ponto*	Médias de contagens bacterianas em cupons de aço inoxidável (UFC.cm ²)		
			4° C	25° C	37° C
			124	C12	P4
125	C14	P1	5,22 ± 0 ^{aA}	6,43 ± 0,3 ^{bA}	7,11 ± 0,16 ^{cA}
126	C14	P3	5,32 ± 0,32 ^{aA}	6,59 ± 0,50 ^{bA}	6,80 ± 0,52 ^{cA}

*P4 - Carcaça após lavagem final ; P1 - Couro após sangria; P3 - Carcaça após evisceração.

Médias ± desvio padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste Tukey ($p \leq 0.05$).

Médias ± desvio padrão com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo Teste Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de andiroba, copaíba, pimenta-rosa e tomilho branco.

Para determinar a atividade antimicrobiana dos OE de andiroba, copaíba, pimenta-rosa e tomilho branco foi realizado teste de disco-difusão em ágar. Dentre os OE testados, a formação de um halo de inibição foi observada apenas para o OE de tomilho branco frente aos isolados testados (Figura 6). A CIM e a CBM do OE de tomilho branco foi de 29,06 mg.mL⁻¹ (3,125 %).



Figura 6: Disco-difusão em ágar Müller-Hinton do óleo essencial de tomilho branco e pimenta rosa (verde e madura) frente aos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Agona
Fonte: Próprio autor, 2022.

Tabela 9 – Zonas de inibição dos óleos essenciais de andiroba, copaíba, pimenta rosa e tomilho branco frente aos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Agona

Isolado	Carcaça	Ponto*	Zonas de inibição dos óleos essenciais (mm)			
			Andiroba	Copaíba	Pimenta rosa	Tomilho branco
124	C12	P4	0	0	0	26 ± 1,15
125	C14	P1	0	0	0	25 ± 0,57
126	C14	P3	0	0	0	18 ± 2

*P4 - Carcaça após lavagem final ; P1 - Couro após sangria; P3 - Carcaça após evisceração.

3.6 Avaliação do OE de tomilho branco na remoção do biofilme de *Salmonella* spp. em aço inoxidável

A ação do OE de tomilho branco foi avaliada em biofilmes de *S. Agona* formados em cupons de aço inoxidável a 37 °C, utilizando-se a CIM do OE (29,06 mg.mL⁻¹). A remoção de biofilme por meio do OE de tomilho branco foi 100 % eficaz em todos os isolados testados, uma vez que não houve a presença de unidades formadoras de colônia na presença do OE após o contato por 15 min (Figura 7).

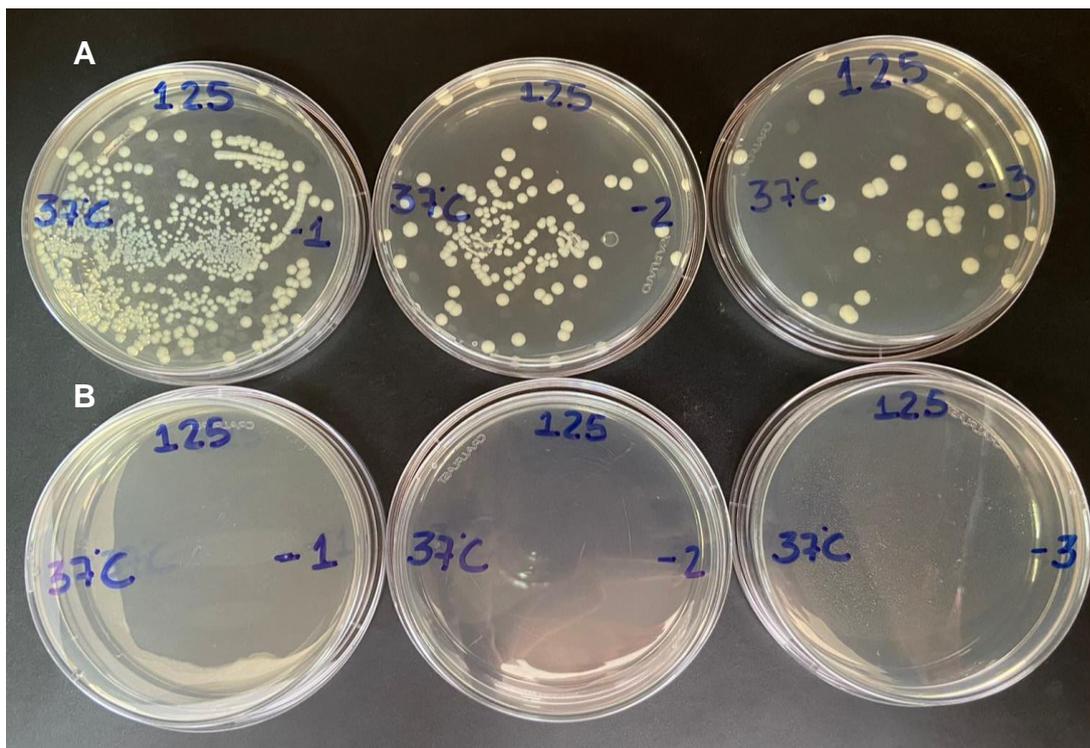


Figura 7: Atividade do óleo essencial de tomilho branco na remoção do biofilme formado em aço inoxidável a 37 °C por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Agona. A: contagens bacterianas do isolado 125 nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , sem a presença do óleo essencial de tomilho branco; B: contagens bacterianas do isolado 125 nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , após contato por 15 min com o óleo essencial de tomilho branco. Fonte: Próprio autor, 2022.

4 Discussão

Das 100 carcaças avaliadas em quatro pontos distintos do abate de bovinos, seis estavam contaminadas, sendo observada contaminação em três pontos da linha de abate. Resultado semelhante foi observado por Bier et al. (2018) que detectaram *Salmonella* spp. em 6,7 % (6/90) das carcaças bovinas em frigoríficos do Mato Grosso do Sul habilitados para exportação. Em contrapartida, Loiko et al. (2016) isolaram *Salmonella* spp. em apenas 0,93 % (1/108) das carcaças bovinas em frigoríficos do Rio Grande do Sul.

A contaminação das carcaças no abatedouro pode ocorrer em diferentes pontos da linha de abate, através das fezes dos animais, do couro e do trato gastrointestinal, bem como através de manipulação, superfícies e equipamentos contaminados (SILVA; BUENO, 2018). Diversos estudos apontam o couro após a sangria como sendo a principal fonte de contaminação de carcaças no processo do abate de bovinos. Em estudo realizado por Silva (2011), quatro de 120 carcaças bovinas avaliadas, provenientes de abatedouro-frigorífico exportador do Sul do Brasil, estavam contaminadas com *Salmonella* spp., sendo todas isoladas do couro. Em

pesquisa realizada por Matos et al., (2013), em nove de 100 carcaças bovinas houve o isolamento de *Salmonella* spp., sendo oito provenientes do ponto após a esfolagem e uma do ponto de após a evisceração, demonstrando uma possível contaminação cruzada envolvendo o couro do animal. De acordo com Rodrigues (2019), a carga microbiana do couro do animal pode estar relacionada com a contaminação nos pontos iniciais da linha de abate. Esta contaminação do couro pode prejudicar e comprometer a segurança das carcaças, uma vez que se torna fonte promissora de contaminação cruzada.

Para Bonesi e Santana (2008), a etapa de evisceração indica alto risco de contaminação na sala de abate, haja vista que a microbiota intestinal do animal possui chances de entrar em contato com a carcaça, uma vez que perfuração de vísceras é um dos maiores problemas tecnológicos.

A contaminação de carcaças em etapas como lavagem final indicam falhas neste processo. Martnez-Chávez et al. (2015), demonstraram que em 18 % das carcaças observadas ocorreu presença de *Salmonella* spp. após a lavagem final. Estes dados destacam a importância de controle durante todas as etapas do abate, uma vez que fica evidente que as carcaças estão sendo expostas a múltiplas fontes de contaminação.

Cossi (2014) em seu estudo observou a presença de *Salmonella* spp. em seis carcaças (2,87 %), onde a maior prevalência se deu, de forma decrescente, após o enxague final (50 %), após a evisceração (33,33 %) e após a esfolagem (16,66 %), achados que corroboram com os resultados do presente estudo, tendo em vista que os pontos em que carcaças estavam contaminadas foram lavagem final (4 %), após evisceração (2 %), e couro após sangria (1 %). Com isso, fica claro que, contaminações nesta etapa representam risco direto ao consumidor, visto que já serão destinadas ao mercado. Sendo assim, para obtenção de carcaças inócuas e que possam ser destinadas ao consumo, deve haver melhor treinamento dos manipuladores, elencando os pontos críticos de contaminação cruzada.

Segundo Damasceno Neto et al. (2021), ao analisar as principais condenações de carcaças e vísceras oriundas de abatedouros-frigoríficos do Norte da Amazônia Oriental, a contaminação de carcaças é a segunda maior (29,5 %) causa de condenação, ficando atrás apenas das contusões (35,1 %), demonstrando assim que há necessidade de treinamento dos manipuladores a respeito das problemáticas geradas a partir da contaminação, no que tange prejuízos econômicos não somente

para indústria mas como também para saúde pública como um todo (SANTOS et al., 2021).

Nos últimos anos, as redes varejistas têm representado grande importância na comercialização de carnes, sendo este um mercado interno em que mais se tem contato direto com o consumidor final (URSO, 2007). Tendo em vista que a carne bovina pode favorecer a proliferação microbiológica (RHOADES et al., 2009; SILVA et al., 2020), seguir as legislações vigentes fundamental para que se garanta produtos de qualidade no varejo (BRASIL, 2022). No presente estudo, todas as amostras encontraram-se dentro do estabelecido que é ausência de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2022). Muito embora este seja o ideal, nem sempre é possível encontrar este parâmetro nas gôndolas refrigeradas, como relatam Velho et al. (2015) em seu estudo acerca da avaliação de carnes *in natura* comercializadas em Mossoró- RN, no qual 63 % das carnes dos estabelecimentos de supermercados estavam contaminados com *Salmonella* spp. Esse alto percentual é preocupante, uma vez que não há garantias de que este alimento terá preparo e cozimento correto, afim de não prejudicar o consumidor, podendo ocasionar prejuízos econômicos e à saúde do consumidor.

A presença de genes de virulência em isolados bacterianos é o que confere à eles a patogenicidade, uma vez que são responsáveis pelos processos de adesão, invasão ou produção de toxinas. No presente estudo, todos os sete isolados de *Salmonella enterica* subs. *enterica* sorovar Agona confirmaram a presença dos genes *hilA* e *invA*. O gene *hilA* é responsável pela invasão de macrófagos e apoptose, enquanto o gene *invA* é responsável por codificar uma proteína na membrana de *Salmonella* spp. e assim conferir a invasão de células entéricas (MATIAS et al., 2010; TURKI et al., 2012). Os genes *invA* e *hilA* são considerados os de eleição para confirmação de *Salmonella* spp. pelo método de PCR.

Em três isolados (124,125,126) foi possível observar a presença dos genes de virulência *spvC*, *pefA* e *sefA*, frequentemente relatados em *Salmonella* spp. O gene *spvC*, é um gene plasmidial, ou seja, se caracteriza por ser um elemento genético móvel, podendo ser transmitido via horizontal ou vertical (SILVA et al., 2017; FARIA, 2013; ANDESFA et al., 2019), localizam-se em região altamente conservada, são agrupados de acordo com sua funcionalidade sendo este gene organizado no *operon* *spvRABCD* (ALMEIDA et al., 2015; FAÚLA, 2021). O gene *spvC* vem sendo relacionado com o aumento da gravidade de casos de *S. Enteritidis*, bem como na contribuição da difusão de infecção sistêmica (SILVA et al., 2017). Assim como o

spvC, o *pefA* é transmitido por plasmídeos, e este por sua vez, está diretamente relacionado à adesão bacteriana junto à células epiteliais hospedeiras, dada pela expressão de fímbrias em isolados de *Salmonella* spp. (LIU et al., 2011; MUSA et al., 2013).

Siddiky et al. (2021), ao verificar a presença de oito genes de virulência (*invA*, *agfA*, *lpfA*, *hilA*, *sivH*, *sefA*, *sopE* e *spvC*) em isolados de *Salmonella enterica* de frangos em mercados úmidos (onde ocorre venda de carnes, peixes e produtos perecíveis) em Dhaka, Bangladesh, encontraram os genes *invA* e *hilA* em 100 % dos isolados, corroborando com os achados deste estudo. Fardsanei et al. (2021) avaliaram os genes de virulência de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis de pacientes com gastroenterite em várias cidades iranianas, e relataram que os genes *invA*, *hilA* e *sefA* estavam presentes em 100 % dos isolados, enquanto os genes *pefA* e *spvC* estavam presentes em 85,2 % e 70,4 % dos isolados, respectivamente. Haubert et al. (2022) analisaram 160 amostras de ovos crus de supermercados e de feiras livres no sul do Brasil e observaram *Salmonella* em apenas 3,2 % (2/160) das amostras. Os genes *hilA*, *invA*, *sefA* e *spvC* foram detectados em 100 % dos isolados, enquanto o gene *pefA* esteve presente em 50 %. É notório que isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos carregando genes de virulência, podem ser transmitidos aos seres humanos e causar uma DTHA mais severa (DANTAS et al., 2020).

A resistência aos antimicrobianos é considerada uma das maiores problemáticas mundiais de saúde pública. No presente estudo, os isolados não apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, mas alguns apresentaram halos de inibição considerados intermediários na disco-difusão em ágar para ciprofloxacina e imipenem. Segundo o CLSI, o objetivo dos testes fenotípicos de suscetibilidade a antimicrobianos é classificar os microrganismos em “suscetíveis”, “intermediários” ou “resistentes”, fornecendo um prognóstico em relação à eficácia do tratamento com o agente antimicrobiano. A categoria intermediária consiste em isolados bacterianos que necessitam de concentrações inibitórias mínimas mais elevadas e as taxas de resposta ao tratamento podem ser menores que em isolados suscetíveis (CLSI, 2018).

A ciprofloxacina, azitromicina e ceftriaxona são antimicrobianos preconizados em tratamentos de infecções graves de *Salmonella* (MSD, 2022; CARON, 2021). Uma vez que um isolado com perfil intermediário seja exposto constantemente à um determinado antimicrobiano, a probabilidade que este torne-se resistente ao fármaco

é alta, dificultando assim o tratamento da infecção (GEBREYES et al., 2017). Caron (2021) avaliou isolados antigos (2004, 2005 e 2006) e isolados novos (2019 e 2020) de *Salmonella* spp. de carne de frango quanto a resistência aos seguintes antimicrobianos: gentamicina; estreptomicina; ertapenem; imipenem; meropenem; ceftazidima; cefoxitina; ciprofloxacina; norfloxacina; sulfazotrim; ampicilina; cloranfenicol e tetraciclina. O autor observou que todos os isolados antigos (n=63) apresentaram suscetibilidade ao imipenem e apenas 7,94 % se enquadraram como intermediários para ciprofloxacina. No entanto, entre os isolados novos (n=24) houve uma mudança nessa configuração, 4,17 % foram classificados como intermediários para imipenem e 50 % para ciprofloxacina.

Os sanitizantes são utilizados no processo de higienização dos estabelecimentos e indústrias alimentícias. No presente estudo a concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM) de isolados de *S. Agona* foram 8, 32, 1.024 e 4.096 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para clorexidina, cloreto de benzalcônio, hipoclorito de sódio e ácido peracético respectivamente para os isolados 124 e 125, para o isolado 126 o MIC e a CBM foram 8, 32, 2.048 e 4.096 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os sanitizantes clorexidina, cloreto de benzalcônio, hipoclorito de sódio e ácido peracético nesta sequência. Considerando os pontos de cortes utilizados neste estudo, apenas o sanitizante clorexidina mostrou-se eficaz frente aos isolados de *S. Agona*. Com isso, fica claro que a utilização de forma incorreta, seja por tempo de exposição inadequado, produto em superfície imprópria ou ainda concentrações erradas, podem acarretar nessa susceptibilidade reduzida. Outros estudos também apontam essa redução de suscetibilidade aos sanitizantes, como nos achados de Haubert et al. (2022), onde o MIC e CBM para cloreto de benzalcônio correspondeu a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo o menor valor encontrado em seus isolados. Colla et al. (2012), analisaram isolados de 2005 e 2009 quanto a suscetibilidade de sanitizantes e observaram que todos os isolados foram suscetíveis ao ácido peracético, enquanto que houve uma ação reduzida frente aos composto de quartenário de amônia e clorexidine em relação ao ano de 2009, demonstrando que exposição errônea vem ocorrendo e ressaltam a necessidade de rodízios no uso dos compostos a fim de evitar essa resistência.

O potencial dos isolados de *S. Agona* em formar biofilme sobre superfície de aço inoxidável variou quando o mesmo isolado foi comparado quanto as diferentes temperaturas testadas ($p \leq 0,05$). Isolados diferentes comparados em relação a mesma temperatura não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Piton (2012) avaliou a

formação de biofilme de *Salmonella* spp. a temperatura de 20 °C em dois meios diferentes TSB e APT. O autor observou que em TSB incubado por 24 h as médias de contagens bacterianas variaram de 4,90 a 5,95 UFC.cm⁻², enquanto que em APT as médias de contagens bacterianas variaram de 3,0 a 3,8 UFC.cm⁻², demonstrando que em meios mais nutritivos a multiplicação bacteriana é favorecida. Para Jayaweera et al. (2021), a capacidade de formação de biofilme de diferentes isolados de *Salmonella* spp. diferiu quanto ao material, tendo maior formação em superfície plástica, variando de 5,09 a 5,29 UFC.cm⁻². Vale ressaltar que a formação de biofilme é considerada a partir de 5 log UFC.cm² (RONNER; WONG, 1993).

A atividade antimicrobiana dos OE de andiroba, copaíba, pimenta-rosa e tomilho branco foi avaliada através do teste de disco-difusão em ágar. Dentre os OE testados, a formação de halo de inibição foi observada apenas para o OE de tomilho branco frente aos isolados de *S. Agona* testados. O óleo de tomilho branco apresentou halos de inibição que variaram de 18 a 26 mm, demonstrando assim sua ação antimicrobiana frente aos três isolados de *S. Agona*. testados, com MIC e CBM de 29,06 mg.mL⁻¹. Cruz et al. (2019) relataram a ação antimicrobiana do OE de *Thymus vulgaris* contra *Staphylococcus saprophyticus* em uma concentração de 0,0008 µL.mL⁻¹ e contra as cepas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Proteus vulgaris* e as bactérias de isolados das mão de equipe cirúrgica como: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Bacillus* sp. com CIM ≥ 0,10 µL.mL⁻¹. Essa diferença nas concentrações de inibição podem ter relação com diversos fatores, como sítio de ação específica para cada bactéria, diferença entre Gram positiva e negativa e ainda origem desses isolados. Tardugno et al. (2022) avaliaram a ação antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* sendo o OE com diferentes composições devido a sua vegetação de cobertura, porém todas com boa ação contra o patógeno. Laviniki (2013), ao avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de OE como: canela da china, óregano, pimenta negra e tomilho branco frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves, encontrou um percentual de 91,3 % eficácia do OE de tomilho branco frente a esses isolados, corroborando assim, com os dados do presente trabalho, onde este OE teve 100 % de eficácia contra os isolados de *Salmonella* testados.

Láscaris et al. (2022), realizou teste de disco-difusão para alguns OE incluindo o óleo de copaíba, encontrando halos de 10 mm para cepas ATCC de *S. Typhimurium* (14028) e 9,83 mm para *S. Enteritidis* (13076) e CIM de 5 mg.mL⁻¹ para ambos, o que

já demonstrou sua baixa eficácia, destoando dos achados no presente trabalho. Com isso, evidencia-se que a ação do óleo pode divergir, uma vez que esta depende de época e forma de extração, conservação do OE e componentes (SANTOS et al., 2016). Para pimenta rosa, os achados corroboram com o estudo em questão (DANNENBERG, 2017), uma vez que este já havia sido demonstrado que não tem ação contra *Salmonella* spp., bem como os achados de óleo de andiroba puro frente a bactérias *S. aureus* e *E. coli* (MONTEIRO, 2017). Reforça-se mais uma vez que ação antimicrobiana de óleos essenciais inclui multifatores, sejam eles intrínsecos (espécie e composição) ou extrínsecos (localização, extração, conservação, armazenamento e cultivo), e ainda, quando se trata de bactérias Gram negativas a ação do OE pode ser dificultada devido a membrana externa (SANTOS et al., 2016; SPISNI et al., 2020).

Tendo em vista o potencial antimicrobiano do OE de *Thymus vulgaris*, a remoção do biofilme de *Salmonella* spp. em cupons de aço inoxidável foi avaliada. No presente estudo, o uso de OE de tomilho branco foi capaz de eliminar o biofilme formado em cupons de aço inoxidável dos três isolados de *S. Agona* testados, utilizando-se a CIM do OE (29,06 mg.mL⁻¹) por 15 min., demonstrando assim a alta eficácia desse OE em atuar como antibiofilme, uma vez que estudos afirmam que para ocorrer esta ação é necessário aumentar em 100 ou até 1.000 vezes a concentração da CIM encontrada (MÁCIA; ROJO-MOLNERO; OLIVER, 2014). Por se tratar de um composto vegetal natural, se sobressai vantajosamente quando comparado com sanitizantes sintéticos, muito devido sua baixa toxicidade. Estudos têm demonstrado que os OE são eficazes na remoção de biofilmes formados em diferentes superfícies, tempos de contato e concentrações.

Conclusão

Conclui-se que *Salmonella Agona* está presente em carcaças bovinas de abatedouros-frigoríficos do Sul do Rio Grande do Sul, sendo os principais pontos de contaminação na linha de abate os seguintes: carcaça após sangria, carcaça após evisceração e carcaça após lavagem final. Amostras de cortes cárneos de varejo, bem como as de fezes de colaboradores não apresentaram *Salmonella* spp. Todos os isolados testados foram sensíveis aos antimicrobianos e todos foram pontencialmente formadores de biofilme bacteriano sobre aço inoxidável. O sanitizante clorexidina apresentou a melhor resposta frente aos isolados testados. Os óleos essenciais de

copaiba, andiroba e pimenta-rosa não demonstraram ação antibacteriana contra os isolados, em contrapartida, o OE de tomilho branco apresentou ação a partir da concentração de 29,06 mg.mL⁻¹, e ainda foi eficaz ação de remoção de biofilme formado em aço inoxidável.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências

- ABIEC. 2022. Beef Report. Perfil da Pecuária no Brasil 2022. São Paulo: Apexbrasil, 2022.
- ALMEIDA, F.; MEDEIROS, M.I.C.; RODRIGUES, D.P.; FALCÃO, J.P. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, p.1395–1407, 2015.
- ALMEIDA, J. C., ALMEIDA, P. P., GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. *Nutr. Time*, v. 17, n. 01, p. 8623-8633, 2020.
- ANDESFHA, E.; INDRAWATI, A.; MAYASARI, N.L.P.I.; RAHAYUNINGTAYAS, I. JUSA, I. Detection of *Salmonella* pathogenicity island and *Salmonella* plasmid virulence genes in *Salmonella* Enteritidis originated from layer and broiler farms in Java Island. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. v.6, n.3, p.384-393, 2019.
- 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, n. 7, p. 833-838, 1998.
- ARAUJO, F. R.; BIER, D., VERBISCK, N.V.; RAMOS, C. A. D. N.; RODRIGUES, D. D. P.; VALSONI, L. M.; KICH, J. D.; DUARTE, S. C. (2015). Detecção de *Salmonella* spp. a partir de carcaças de bovinos obtidas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos em Mato Grosso do Sul: resultados preliminares. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). 2015.
- AZEVEDO, A. P. Prevalência e características de *Salmonella* spp. em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de risco. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo - SP, 2009.
- BAHIA – Laboratório central de Saúde Pública. MANUAL DE ORIENTAÇÃO PARA COLETA, ACONDICIONAMENTO, TRANSPORTE E RECEPÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA EXAMES LABORATORIAIS, v.1, p. 65, 2022.

- BELTRAME, C. A. Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos. Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2009.
- BIER, D., KICH, J. D., DUARTE, S. C., SILVA, M. R., VALSONI, L. M., RAMOS, C. A., ARAÚJO, F. R. Survey of *Salmonella* spp. in beef meat for export at slaughterhouses in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, p. 2037-2043.
- BONESI, G. L.; SANTANA, E.H.W. de. Fatores Tecnológicos e Pontos Críticos de Controle de Contaminação em Carcaças Bovinas no Matadouro. UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v. 10, n. 2, p. 39-46, Out. 2008
- BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-treat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, v. 62, n. 3, p. 381-390, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 724, de 1º de julho de 2022. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial – República Federativa do Brasil.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial – República Federativa do Brasil.
- BRASIL. Manual de Coleta de Amostras de Produtos de Origem Animal. 3. Ed. p. 60-78. Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: junho de 2022
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial em *Salmonella* spp. 60p. Brasília, 2011.
- CALIARI, S. C. S. A exportação de carne bovina no Brasil: Um estudo sobre a cadeia produtiva, transporte e desafios. *CIMATech*, v.1, n.6, p. 281-292, 2019.
- CARON, E. F. F. Comparação temporal do perfil de resistência in vitro aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. de carne de frango entre 2004–2020. 2021. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2021.
- CAMPIONI, F., BERGAMINI, A. M. M., FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella Enteritidis* isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol*, v. 32, p. 254–264, 2012.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). *Salmonella* and Food. 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/salmonella-food.html>>. Acesso em: junho de 2022.

Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne: CLSI/NCCLS document M100, 2018.

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute, Document M100, 32th edition, 2022.

COLLA, F. L., RODRIGUES, L. B., DICKEL, E. L., BORSOI, A., NASCIMENTO, V. P. D., SANTOS, L. R. D. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 289-292, 2012.

CORCORAN, M., MORRIS, D., DE LAPPE, N., O'CONNOR, J., LALOR, P., DOCKERY, P., CORMICAN, M. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, 2014.

COSSI, M. V. C. Rastreamento e caracterização de *Salmonella* spp. em indústrias de processamento de carne bovina e açougues localizados em Minas Gerais, Brasil. 2014. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2014.

CRUZ, T. A., TORRES, F. R., PETRUCCELLI, M. F., DE ABREU, M. H., SILVA, S. S., MARINS, M. M., FACHIN, A. L. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils facing isolated bacteria from surgical staffs. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, v. 5, 2019.

DA PRODUÇÃO PECUÁRIA, Estatística. indicadores IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022.

DAMASCENO NETO, M. S., NUNES, E. D. S. C. DE L., SILVA, W. C. Análise retrospectiva das causas de condenações de carcaças e vísceras de bovinos abatidos em abatedouros frigoríficos na Região Norte da Amazônia Oriental. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, v. 16, n. 3, p. 28-46, 2021.

DANNENBERG, G. da S. Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* RADDI): atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para bioconservação de alimentos. 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2017.

DANTAS, S. T., CAMARGO, C. H., TIBA-CASAS, M. R., VIVIAN, R. C., PINTO, J. P., PANTOJA, J. C., RALL, V. L. Environmental persistence and virulence of *Salmonella* spp. Isolated from a poultry slaughterhouse. *Food Research International*, v. 129, p. 108835, 2019.

FARDSANEI, F., DALLAL, M. M. S., SALEHI, T. Z., DOURAGHI, M., MEMARIANI, M., MEMARIANI, H. Antimicrobial resistance patterns, virulence gene profiles, and genetic diversity of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from patients with gastroenteritis in various Iranian cities. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 24, n. 7, p. 914, 2021.

- FARIA, A.M. Genes de virulência em *Salmonella enterica*: descrição, componentes estruturais e métodos de detecção. Seminário [Doutorado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- FAÚLA, L. L. Biodiversidade fenotípica e genotípica de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), em Minas Gerais/Brasil. 2021. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- FENG, J.; MA, L.; NIE, J.; KONKEL, M. E.; LU, X. Environmental stress-induced bacterial lysis and extracellular DNA release contribute to *Campylobacter jejuni* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 2068-17, 42 pag., 2017
- FILHO, L.G. A. DOS S.; CASTRO, K. N. DE C.; PEREIRA, A. M. L.; DINIZ, F. M. Detecção da atividade antibacteriana in vitro de compostos naturais à base de plantas: metodologia científica. Embrapa Meio-Norte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2019.
- Food and Drug Administration (FDA). CFR-code of federal regulations Title 21. *US Food and Drug Administration: Washington, DC, USA, 2018.*
- GEBREYES, W.A.; WITTUM, T.; HABING, G. et al. Spread of Antibiotic Resistance in Food Animal Production Systems. In: DODD, C.; ALDSWORTH, T.; STEIN, R.A. et al. (Ed.). *Foodborne Diseases (Third edition)* Cambridge: Academic Press, 2017. p.105-130.
- HAUBERT, L., MAIA, D. S. V., RAUBER WÜRFEL, S. D. F., VANIEL, C., DA SILVA, W. P. Virulence genes and sanitizers resistance in *Salmonella* isolates from eggs in southern Brazil. *Journal of Food Science and Technology*, v. 59, n. 3, p. 1097-1103, 2022.
- HUEMER, M., SHAMBAT, S. M., BRUGGER, S. D., ZINKERNAGEL, A. S. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspective. *EMBO reports*, v. 21, n. 12, p. e51034, 2020.
- JAYAWEERA, T. S. P., RUWANDEEPIKA, H. A. D., DEEKSHIT, V. K., KODITHUWAKKU, S. P., CYRIL, H. W., KARUNASAGAR, I., VIDANARACHCHI, J. K. Biofilm Forming Ability of Broiler Chicken Meat Associated *Salmonella* spp. on Food Contact Surfaces. *Tropical Agricultural Research*, v. 32, n. 1, p. 17-26, 2021.
- LÁSCARIS, M. P. S., AROXA, C. N. F., PIO, A. R., GONÇALVES, J. L. C., NUNES, T. P. Sinergismo microbiano entre óleos essenciais e conservantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos. *Research, Society and Development*, 11(3), e32011326535-e32011326535.
- LAVINIKI, V. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de canela da china (cinnamomun cassia), orégano (origanum vulgare), pimenta negra (piper nigrum) e tomilho (thymus vulgaris) branco frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2013.

- LIU, B., ZHANG, L., ZHU, X., SHI, C., CHEN, J., LIU, W., SHI, X. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *International journal of food microbiology*, v. 144, n. 3, p. 511-518, 2011.
- LOIKO, M. R., DE PAULA, C. M., LANGONE, A. C., RODRIGUES, R. Q., CIBULSKI, S., RODRIGUES, R. D. O., TONDO, E. C. Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. *Meat Science*, 116, 193-200. 2016.
- MÁCIA, M. D., ROJO-MOLINERO, E., OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility test in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 10, p. 981-990, 2014.
- Martínez-Chávez L., Cabrera-Díaz E., Pérez-Montaña J. A., Garay-Martínez L. E., Varela-Hernández J. J., Castillo A., Lucía L., Ávila-Novoa M. G., Cardona-López M. A., Gutiérrez-González P., Martínez-González N. E. Quantitative distribution of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. *Int J Food Microbiol*. 2015.
- MATIAS, B. G., PINTO, P. S. A., COSSI, M. V. C., SILVA JR, A., VANETTI, M. C. D., NERO, L. A. Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poultry science*, v. 89, n. 7, p. 1524-1529, 2010.
- MATOS, A. V. R., NUNES, L. B. S., VIANNA, C., SPINA, T. L. B., ZUIM, C. V., POSSEBON, F. S., PINTO, J. P. D. A. N. *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas para exportação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, p. 981-988, 2013.
- MIR, S. A.; DAR, B. N.; WANI, A. A.; SHAH, M. A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packing films. *Trends in Food and Science Technology*, v.80, p.141-154, 2018.
- MONTEIRO, M. V. de M. Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais citronela (*cymbopogon winterianus*) e andiroba (*carapa guianensis aubl*) em cepas clínicas de *staphylococcus aureus* e *escherichia coli*. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2017.
- MSD. MSD Saúde. Infecções por *Salmonella* não tifóide. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infeciosas/bacilos-gram-negativos/infec%C3%A7%C3%B5es-por-salmonella-n%C3%A3o-tifoide>>. Acessado em: 01 de março de 2022.
- MULLAPUDI, S., SILETZKY R. M., KATHARIOU, S. Heavy-metal and benzalkonium chloride resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from the environment of Turkey-processing plants. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:1464–1468.
- MUSA, H. H., ZHANG, W. J., LV, J., DUAN, X. L., YANG, Y., ZHU, C. H., ZHU, G. Q. The molecular adjuvant mC3d enhances the immunogenicity of FimA from type I

- fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v. 47, n. 1, p. 57-62, 2014.
- PARIZZI, S. Q. F., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., SILVA, C. A. S., MONTEIRO, E. A. M. 2004. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. Brazil. Arch. Biol. Technol, 47, 77-83.
- PITON, M. A. D. J. Formação de biofilmes e produção de moléculas sinalizadoras de quorum sensing por cepas de *salmonella* spp. Isoladas de processamento de frango. 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- QUINTINO, S. Da S.; RODOLPHO, D. Um estudo sobre a importância do APPCC- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na indústria de alimentos. Revista Interface Tecnológica, v. 15, n. 2, p. 196-207, 2018.
- RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. Food Microbiology, v. 26, n. 4, 357-376, 2009.
- RODRIGUES, J. C. F. Avaliação da qualidade higiênico - sanitária em abatedouro frigorífico de bovinos . 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal Goiano, Rio Verde - GO, 2019.
- SANTOS, A. O., FREIRE, J. A. S., CARVALHO, T. D., BARBOSA, T. C., PRATES, R. P., SILVA, J. C. R. L., FARIAS, P. K. S. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils citrus with potentiality for inclusion as additives in foods. Caderno de Ciências Agrárias, 8 (3), 15-21.
- SANTOS, D. A., AMARAL, G. V., SARTORI, F., SIMAS, J. V. (2021). A importância das condições higiênico-sanitárias em abatedouros: Uma revisão de literatura. Research, Society and Development, v. 10, n.1, p. e22610111455-e22610111455.
- SIDDIKY, N. A., SARKER, M. S., KHAN, M. S. R., BEGUM, R., KABIR, M. E., KARIM, M. R., SAMAD, M. A. Virulence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken at wet markets in Dhaka, Bangladesh. Microorganisms, v. 9, n. 5, p. 952, 2021.
- SILVA, A. S.; SOUZA, B. W. S.; BISPO, A. S. da R.; FERREIRA, M. A.; Evangelista-Barreto, N.S. Inativação de patógenos em carne bovina fresca revestida com monocamada comestível de quitosana. MAGISTRA v. 31, p.460-464, 2020.
- SILVA, C. C. dos S.; BUENO, C. P. Pontos de contaminação de carcaças bovinas dentro do fluxograma de abate. Nutritime Revista Eletrônica, on-line, Viçosa, v.15, n.02, p.8147-8152, 2018.
- SILVA, C.; PUENTE, J.L.; CALVA, E. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. Pathogens and Disease, v.75, p.1-5, 2017.

- SILVA, F. F. P. D. Investiga o de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro-frigorífico. 2011. Disserta o (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- SILVA, M. V., RAIMUNDO, I. T., FALCOCHIO, M. C., SOUZA, B. M. S. Dinâmica da carga microbiana de uma unidade de beneficiamento de carne e produtos cárneos. *Ars Veterinaria*, v. 36, n. 2, p. 72-77, 2020.
- SPISNI E., PETROCELLI, G., IMBESI, V., SPIGARELLI, R., AZZINNARI, D., SARTI, M. D., CAMPIERI, M., VALERII, M. C. (2020). Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Microbial-Modulating Activities of Essential Oils: Implications in Colonic Pathophysiology. *Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms21114152.
- TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y.; OUELLETTE, M.; OUTTERSON, K.; PATEL, J.; CAVALERI, M.; COX, E. M.; HOUCHEMS, C. R.; GRAYSON, M. L.; HANSEN, P.; SINGH, N.; THEURETZBACHER, U.; MAGRINI, N. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *PubMed*, v.18, p. 318–327, 2018
- TARDUGNO, R., SERIO, A., PURGATORIO, C., SAVINI, V., PAPARELLA, A., BENVENUTI, S. *Thymus vulgaris* L. essential oils from Emilia Romagna Apennines (Italy): phytochemical composition and antimicrobial activity on food-borne pathogens. *Natural Product Research*, v. 36, n. 3, p. 837-842, 2022.
- TURKI, Y., OUZARI, H., MEHRI, I., AISSA, R. B., HASSEN, A. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. *Food Research International*, v. 45, n. 2, p. 940-946, 2012.
- Ueda S, Kuwabara Y. Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. *Biocontrol Sci* 2007; 12:149-153
- URSO, F.S P. A cadeia de carne bovina no Brasil: uma análise de poder de Mercado e teoria da informa o. 2007. Tese (Doutorado em Economia de Empresas) - Funda o Getúlio Vargas, São Paulo, 2007.
- VELHO, A. L. M. DE S., ABRANTES, M. R., DE MEDEIROS, J. M. S., DE SOUSA AGUIAR, K. C., DE SOUZA,  . S., DE PAIVA SOARES, K. M., DA SILVA, J. B. A. Avalia o qualitativa da carne bovina in natura comercializado em Mossoró-RN. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 9, n.3, p. 212-217. 2015.
- VERAS, H.N., RODRIGUES, F.F., BOTELHO, M.A., MENEZES, I.R., COUTINHO, H.D., DA COSTA, J.G. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. *ScientificWorldJournal*, p. 471580, 2014.
- WHO. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health

Organization, 2017.

WHO. 2022. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo realizado é possível afirmar que *Salmonella Agona* está presente em plantas frigoríficas do Sul do Rio Grande do Sul. Apesar de os isolados não terem apresentado resistência aos antimicrobianos testados, o perfil intermediário para ciprofloxacina e imipenem gera um alerta para acompanhar a evolução dessa resistência ou ainda como alarme para medidas cautelares, a fim de frear o desenvolvimento da resistência. Para os sanitizantes mais utilizados pela indústria de alimentos, como ácido peracético e hipoclorito de sódio, concentrações elevadas foram necessárias tanto para inibir quanto para erradicar *S. Agona*, o que pode estar associado ao uso errôneo destes agentes sanitizantes trazendo à tona falhas no processo de higienização. Os isolados de *S. Agona* mostraram-se potencialmente formadores de biofilmes em superfície de aço inoxidável, o que confere perigo para os ambientes fabris e de manipulação, uma vez que este é um material presente na indústria de alimentos. O OE de tomilho branco demonstrou ação antimicrobiana frente aos isolados de *S. Agona* testados e foi capaz de remover o biofilme pré-formado em cupons de aço inoxidável, sendo uma boa alternativa aos sanitizantes químicos tradicionalmente utilizados.

Referências

- ABEBE, G. M. Oral Biofilm and Its Impact on Oral Health, Psychological and Social Interaction. **Int J Oral Dent Health**, v. 7, p. 127, 2021.
- ABIEC. 2022. **Beef Report**. Perfil da Pecuária no Brasil 2022. São Paulo: Apexbrasil, 2022.
- ACAR, S.; BULUT, E.; DURUL, B.; UNER, I.; KUR, M.; AVSAROGLU, M. D.; KIRMACI, H. A.; TEL, Y. O.; ZEYREK, F. Y.; SOYER, Y. Phenotyping and genetic characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography. **International Journal of Food Microbiology**, v.241, p. 98-107, 2017.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Módulo 3 Resistência Microbiana – mecanismo e impacto clínico. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
- ALCÂNTARA, M. A.; GATTO, I. R. H.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antibióticos de microrganismos isolados de cortes de carne bovina. **REVISTA VETERINÁRIA EM FOCO**, v. 10, n. 1, 2012.
- ALMEIDA, A.S.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. *Salmonella* em cortes de carne bovina inteiro e moído. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.77-81, 2002.
- ALMEIDA, J. C., ALMEIDA, P. P., GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutr. Time**, v. 17, n. 01, p. 8623-8633, 2020.
- ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: which bla bla bla is this? **Journal of INFECTION CONTROL**, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2017.
- ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de filmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.
- AQUINO, J.S. de. **Estudo microbiológico da carne moída comercializada na cidade de Manaus-Amazonas, análise de contaminação por bactéria do gênero *Salmonella***. 1991. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos e Nutrição) -

Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia, Manaus, 1991.

ARAUJO, F. R.; BIER, D., VERBISCK, N.V.; RAMOS, C. A. D. N.; RODRIGUES, D. D. P.; VALSONI, L. M.; KICH, J. D.; DUARTE, S. C. (2015). Detecção de *Salmonella* spp. a partir de carcaças de bovinos obtidas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos em Mato Grosso do Sul: resultados preliminares. **Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**. 2015.

ARCANJO, V. F. P. S.; OLIVEIRA, G. F. M. Qualidade microbiológica de hambúrgueres industrializados comercializados em Volta Redonda/ RJ. **Rev. Episteme Transversalis**, Volta Redonda- RJ, v.10, n.3, p.17- 28, 2019.

AZEVEDO, A. P. **Prevalência e características de *Salmonella* spp. em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de risco**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BALDRY, M.G.C.; FRASER, J.A.L. (1988). Disinfection with Peroxides. In Payner, K.R. (Ed.), **Industrial Biocides** (pp. 91–116). New York, NY: Wiley.

BARROS, F.N.; FARIAS, M.P.O.; TAVARES, J.P.C.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.D.G. In vitro efficacy of oil from the seed of *Carapa guianensis* (andiroba) in the control of *Felicola subrostratus*. **Rev. Bras. Farm.** v.22, p. 1130–1133. 2012.

BAZARGANI, M. M., ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food control**, v. 61, p. 156-164, 2016.

BEACH, J.C.; MURANO, E.A.; ACUFF, G.R. Serotyping and Antibiotic Resistance Profiling of *Salmonella* in Feedlot and Nonfeedlot Beef Cattle. **Journal of Food Protection**, v.65, n.11, p.1694-99, 2002.

BENICIO, C. G. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis**.2019. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

BIZZO, H. R., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-treat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 381- 390, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 724, de 1º de julho de 2022**. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial –República Federativa do Brasil.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial –República Federativa do Brasil.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto-lei nº 10.468, de 18 de agosto de 2020**. Altera o decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA).

BRASIL. Ministério da Saúde. 2018. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: junho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial em *Salmonella* spp.** 60 p. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 275 de 21 de outubro de 2002**. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados

aos estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos e a lista de verificação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 jun. 2022.

BROOKES, Z. L., BESCOS, R., BELFIELD, L. A., ALI, K., ROBERTS, A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. **Journal of Dentistry**, v. 103, p. 103497, 2020.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, 223 -253, 2004.

CALDEIRA, I. R. D. **Projeto Clean Label em Produtos à Base de Carne e Preparados de Carne Picada**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal, 2017.

CALIARI, S. C. S. A exportação de carne bovina no Brasil: Um estudo sobre a cadeia produtiva, transporte e desafios. **CIMATech**, v.1, n.6, p. 281-292, 2019.

CAMPOS, T.; CUNHA, M. O.; DE SOUSA, A. C. B.; TEIXEIRA, R. B.; RAPOSO, A.; SEBBENN, A. M.; WADT, L. H. O. Mating system parameters in a high density population of andirobas in the Amazon forest, **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.48, n.5, p.504-509, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000500006>.

CAPUANO, V. S. C. **Estudo comparativo de métodos fenotípicos e biomoleculares para determinação de resistência a antibióticos em cepas de Salmonella spp isoladas de couro e carcaça de bovinos e produtos cárneos**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CASCON, V. Copaíba - *Copaifera spp*. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of

oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, v. 55, n. 07, p. 773-778, 2000.

CAVALCANTE, C. B. **Hipoclorito de Sódio (NaClO) para inativação de *Salmonella* spp. no contexto do processamento de peixes: concentração x tempo de exposição.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Agronomia e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2020.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). ***Salmonella* and Food.** 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/salmonella-food.html>>. Acesso em: junho de 2022.

Center for Diseases Control and Prevention. **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2013.** Georgia: US Department of Health and Human Services; 2014.

CHAVES, R. D., ASPRIDOU, Z., SANT'ANA, A. S., KOUTSOUMANIS, K. P. Effect of chlorine stress on the subsequent growth behavior of individual *Salmonella* cells. **Food Research International**, 123, 311–316, 2019. doi:10.1016/j.foodres.2019.05.006

CIEPLIK, F., JAKUBOVICS, N. S., BUCHALLA, W., MAISCH, T., HELLWIG, E., AL-AHMAD, A. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria is there cause for concern? **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 587, 2019.

CLEMENTE, A. D. **Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).** 2006. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

COLLA, F. L.; MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A. D.; PILOTTO, F., RODRIGUES; L. B., NASCIMENTO, V. P. Dos.; SANTOS, L. R. D. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes frente aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 320-324, 2014

COLLA, F. L., RODRIGUES, L. B., DICKEL, E. L., BORSOI, A., NASCIMENTO, V. P. D., SANTOS, L. R. D. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido

peracético frente a amostras de *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32, 289-292, 2012.

CORCORAN, M., MORRIS, D., DE LAPPE, N., O'CONNOR, J., LALOR, P., DOCKERY, P., CORMICAN, M. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, 2014.

CORRÊA, J. M. X., SOARES, P. C. L. R., MICHEL, A. F. R. M., ALLAMAN, I. B., LAMEIRA, O. A., DE LAVOR, M. S. L., SILVA, E. B. Tratamento de ferida cirúrgica cutânea em ratos com óleo-resina de copaíba (copaíba reticulata). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 28, n. 4, 2021.

COSSI, M. V. C. **Rastreamento e caracterização de Salmonella spp. em indústrias de processamento de carne bovina e açougues localizados em Minas Gerais, Brasil**. 2014. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2014.

COSSU, A.; LE, P.; YOUNG, G.M.; NITIN, N. Assessment of sanitation of efficacy against *Escherichia coli* 0157:H7 by rapid measurement of intracellular oxidative stress, membrane damage or glucose active uptake. **Food Control**, vol. 71, p. 293-300. 2017.

COSTA, A. L. O. **Ação do hipoclorito de sódio sobre metacercárias de Fasciola hepática**. 2020. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

COSTA, J. G., RODRIGUES, F. F., ANGÉLICO, E. C., PEREIRA, C. K., SOUZA, E. O. D., CALDAS, G. F., SANTOS, P. F. D. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.583-586, 2008.

DA PRODUÇÃO PECUÁRIA, Estatística. indicadores IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2022.

DANNEMBERG, G. DA S. **Potencial bioconservante de óleo essencial de pimenta brasileira (*schinus terebinthifolius raddi*) in vitro e em queijo**

experimentalmente contaminado com *Listeria monocytogenes*. 2014.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

DANNEMBERG, G. DA S. **Óleo essencial de pimenta rosa (*schinus terebinthifolius raddi*): Atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para bioconservação de alimentos.** 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

D'AOUST JY, MAURES J. *Salmonella species*. In: **Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers**, 3ª Ed. Edited by DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. Washington: ASM Press, 2007.

BARROS, F.N.; FARIAS, M.P.O.; TAVARES, J.P.C.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.D.G. In vitro efficacy of oil from the seed of *Carapa guianensis* (andiroba) in the control of *Felicola subrostratus*. **Rev. Bras. Farm.** 2012, 22, 1130–1133.

DEMARTELAERE, A. C. F., COUTINHO, P. W. R., PRESTON, H. A. F., MEDEIROS, J. G. F., DE SOUZA, J. B. Potencial do óleo essencial de *Thymus vulgaris* na qualidade sanitária em sementes de *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 66772-66785, 2021.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022; 20 (12): 7666, 273 pp.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudos.** 2021.

Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>>. Acessado em: 28 Ago. 2021.

ENNIGROU, A., CASABIANCA, H., VULLIET, E., HANCHI, B., HOSNI, K. Assessing the fatty acid, essential oil composition, their radical scavenging and antibacterial activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and twigs. **Journal of food**

science and technology, v. 55, n. 4, p. 1582-1590, 2018.

FAO. 2022. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022. Rome.

<https://doi.org/10.4060/cc2211en>

FENG, J.; MA, L.; NIE, J.; KONKEL, M. E.; LU, X. Environmental stress-induced bacterial lysis and extracellular DNA release contribute to *Campylobacter jejuni* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 2068-17, 42 pag.,2017.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. de T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta amazônica**, v. 32, p. 647-647, 2002.

FERREIRA, L. L.; MENDES, F. R.; SANTOS, B. M. D.; ANDRADE, M. A.; CAFÉ, M. B. Salmonelose em sanidade avícola e saúde pública. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 10, n. 5, p.2716-2751, 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Artmed Editora, 2013.

FORTES, T. P.; MACHADO, G. B.; DEWES, C.; DE MOURA, S. V.; MARMITT, I. V. P.; DELGADO, G. B.; VASCONCELOS, F. A.; DA SILVA, É. F. Isolamento e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* obtidos durante o abate de ruminantes. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.8, p. 62422-62429, 2020.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos - *Salmonella*. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M: Microbiologia dos Alimentos. 1 ed. São Paulo: **Atheneu**, 1996. p. 55-60.

FREIRE, I. C. M., PÉREZ, A. L. A. L., CARDOSO, A. M. R., MARIZ, B. A. L. A., ALMEIDA, L. F. D., CAVALCANTI, Y. W., PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 372-377, 2014.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por**

alimentos, treinamento de recursos humanos. 2 ed. São Paulo: Varela, 2003.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 6 ed. São Paulo: Varela, 2019.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v.6, n.1, p. 43 – 56, 2011.

GOBERT, M.; SAYD, T.; GATELLIER, P.; SANTÉ-LHOUELLIER, V. Application to proteomics to understand and modify meat quality. **Meat Science**, v. 98, n.3, p.539–43. 2014.

GOMES, M. D. G.; GÓIS, S. N.; SILVA, C. M.; GOMES, L. G. Extrativismo e comercialização da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na região do Baixo São Francisco. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL**, v. 43, p. 1-14, 2004.

HUEMER, M., SHAMBAT, S. M., BRUGGER, S. D., ZINKERNAGEL, A. S. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspective. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51034, 2020.

HYUN, J. E.; BAE, Y. M.; YOON, J. H.; LEE, S. Y. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage. **Food Control**, v. 51, p. 307–313, 2015.

ICMSF, 1996 International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens. **London: Blackie Academic and Professional**, 1996. 514 p.

INÁCIO, I. F. **Nanopartículas à base de excipientes naturais aplicadas como sanitizantes.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

JOLIVET-GOUGEON, A., SAUVAGER, F., BONNAURE-MALLET, M., COLWELL, R. R., CORMIER, M. Virulence of viable but nonculturable *S. Typhimurium* LT2 after peracetic acid treatment. **International journal of food microbiology**, v. 112, n.2, p.147-152. 2006.

LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. C. P. de; FERREIRA, M. C.; CORDEIRO, I. M. C. C. *Copaifera* spp.: Copaíba. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; VIEIRA, I. C. G. (ed.).

Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte. Brasília, DF: MMA, 2022. P. 1028-1040. 2022.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; DA SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 04, p. 3866-3889, 2012.

LEVINSON, W. Bacilos Gram - Negativos Relacionados ao Trato Intestinal: SALMONELLA. In: LEVINSON, Warren. **Microbiologia médica e imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Amgh, 2011. Cap. 18. p. 140 – 157.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, p. 105-113, 2017.

LOPES, G. V.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance and class 1 Integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. **Veterinary Microbiology**, v. 194, p. 84- 92, 2016.

LÓPEZ-VELASCO, G., TOMÁS-CALLEJAS, A., SBODIO, A., ARTÉS-HERNÁNDEZ, F., SUSLOW, T. V. Chlorine dioxide dose, water quality and temperature affect the oxidative status of tomato processing water and its ability to inactivate *Salmonella*. **Food Control**, v.26, n. 1, p. 28–35, 2012. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.016

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia.** 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 2007.

LUUKKONEN, T.; PEHKONEN, S. O. Peracids in water treatment: A critical review. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 1-39. 2016.

MACEDO, N. B. **Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): compostos**

presentes nos frutos e suas atividades antioxidante e anti-inflamatória. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

MAGIORAKOS, A.P., SRINIVASAN, A., CAREY, R.B., CARMELI, Y., FALAGAS, M.E., GISKE, C.G., HARBARTH, S., HINDLER, J.F., KAHLMETER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D.L., RICE, L.B., STELLING, J., STRUELENS, M.J., VATOPOULOS, A., WEBER, J.T., MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.3, p. 268-281, 2012. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

MANDAL, S.; DEBMANDAL, M. Chapter 94 - Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In: PREEDY, V. R. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. San Diego: **Ed. Academic Press**, 2016. p. 825-834.

MECCIA, G.; QUINTERO, P.; ROJAS, L.B.; USUBILLAGA, A.; VELASCO, J.; DIAZ, T.; DIAZ, C.; VELÁSQUEZ, J.; TORO, M. Chemical Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Carapa guianensis* Collected from Venezuelan Guayana and the Antimicrobial Activity of the Oil and Crude Extracts. **Nat. Prod. Commun.** 2013, 8, 1641–1642.

MELO, K. M., FASCINELI, M. L., MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R., GRISOLIA, C. K., SANTOS, A. S., SALGADO, H. L. C., MUEHLMANN, L. A., AZEVEDO, R. B., PIECZARKA, J.C., NAGAMACHI, C. Y. Evaluation of the Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) Oil and Nanoemulsion on Swiss Mice. **Journal of Nanomaterials**, v. 2018, p. 8, 2018.

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) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MENEGARO, A., FLORES, A. F., SIMER, P., SBARDELOTTO, P. R. R., PINTO, E. P. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 2, p. 171-174. 2016.

MERLIN, E., CRUZ, W. C. C. Teste da atividade antimicrobiana do óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*). **Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente**, v.2, n.1, 2021.

MIR, S. A.; DAR, B. N.; WANI, A. A.; SHAH, M. A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packing films. **Trends in Food and Science Technology**, v.80, p.141-154, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana Jun**, v.2, n.1, p. 11-13, 2010.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **Research**, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, 1451-1474, 2013.

NEL, S.; LUES, JF.R.; BUYS, E.M.; VENTER, P. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Meat Science**, v.66, p.667-74, 2004.

NETO, M. S. D.; NUNES, E. do S. C. de L.; SILVA, W. C. Análise retrospectiva das causas de condenações de carcaças e vísceras de bovinos abatidos em abatedouros frigoríficos na Região Norte da Amazônia Oriental. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 28-46, 2021.

PEREIRA, B. M. P.; TAGKOPOULOS, I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 13, p. e00377-19, 2019.

PEREIRA, M. S.; SILVA, P. L. Prevalência de anticorpos *Salmonella pullorum* e

identificação bacteriológica de *Salmonella* sp em galinhas “caipiras” em Uberlândia (MG). **Guia Avicultura Industrial**, Porto Feliz, n. 6, p. 22-23, 2005.

PIERI, F. A., MUSSI, M. C., MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 465-472, 2009.

PIERI, F.A. **Efeito (*in vitro/ in vivo*) do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães (*Canis lupus Familiaris*).** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). **Journal of the Serbian Chemical Society**, 2007.

PUI, C. F.; WONG, W. C.; CHAI, L. C.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; HIDAYAH, M. S.; UBONG, A.; FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K.; SON R. *Salmonella*: a foodborne pathogen. **International Food Research Journal**, v.18, n.2, 2011.

RANSOM, J.R.; BELK, K.E.; BACON, R.T.; SOFOS, J.N.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal / colonic feces hides and carcasses. **Journal of Food Protection**, v.65 p.621– 626, 2002.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, n. 15, p. 479-483, 2004.

REIS, J. B., FIGUEIREDO, L. A., CASTORANI, G. M., VEIGA, S. M. O. M. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against food Pathogens. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, p. 342-363, 2020.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria*

monocytogenes in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, 357-376, 2009.

ROCHA, B. C.A. da. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química) - Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M.; ABU-EL-HAIJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Med Infect Dis**, v. 9, n. 6, 2011.

SANTANA, T.C.F.S, MAIAO, R.C, MONTEIRO, S.G, CARMO, M.S, FIGUEIREDO, P.M.S. Perfil de resistência de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp isoladas de urocultura de comunidade do município de São Luis- MA no período de 2005-2008. **Revista de patologia tropical**. Vol. 41. n. 3. p. 295- 303. 2012.

SANTOS, A. F. DAS M., AMPARO, L. F. V., MACHADO, S. C. A., DIAS, T. S., BERTO, L. H., ABREU, D. L. DA C., AQUINO, M. H. C. DE., RODRIGUES, D.DOS P., PEREIRA, V. L. DE A. (2022). *Salmonella* serovars associated with human salmonellosis in Brazil (2011-2020). **Research, Society and Development**, 11(8), e28011830533-e28011830533.

SANTOS, D. A., AMARAL, G. V., SARTORI, F., SIMAS, J. V. A importância das condições higiênico-sanitárias em abatedouros: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n.1, p. e22610111455-e22610111455, 2021

SANTOS, Í. R. N., DE FARIAS, J. C., LIMA, T. L. S., QUEIROGA, I. M. B. N., DA SILVA CHAVES, K., CAVALCANTI, M. T., GONÇALVES, M. C. Extração de óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e determinação da citotoxicidade e contagem inibitória mínima. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e996986674-e996986674, 2020.

SANTOS, J. R. N. dos; TELES, A. M.; FERREIRA, C. G.; MOUCHREK, A. N. . Evaluation of the bactericidal and antioxidant activity of essential oil and hydroalcoholic extract of oregano (*Origanum vulgare*). **Research, Society and**

Development, v. 9, n. 10, p. e7829108410, 2020. Disponível em:<
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8410>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

SANTOS, R.C., ALVES, C.F.S., SCHNEIDER, T., LOPES, L.Q., AURICH, C., GIONGO, J.L., BRANDELLI, A., VAUCHER, R.A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **J. Invertebr. Pathol.** 109, 265-268, 2012.

SATPATHY, S., SEN, S. K., PATTANAIK, S., RAUT, S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 7, p. 56-66, 2016.

SAUER, K., STOODLEY, P., GOERES, D. M., HALL-STOODLEY, L., BURMØLLE, M., STEWART, P. S., BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608-620, 2022.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B. D.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. D. C. L. DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L.D. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p.1675-1683, 2008.

SILVA, A. S.; SOUZA, B. W. S.; BISPO, A. S. da R.; FERREIRA, M. A.; Evangelista-Barreto, N.S. Inativação de patógenos em carne bovina fresca revestida com monocamada comestível de quitosana. **MAGISTRA** v. 31, p.460-464, 2020.

SILVA, E. M. DA ; DUPONT, G. K.; MACHADO, F. P. Controle de qualidade: limpeza e higienização nas indústrias alimentícias. **Caderno Intersaberes**, v. 11, n. 34, p. 42-54, 2022.

SILVA, G.; DUTRA, P. R. S.; CADIMA, I. M. **Higiene na indústria de alimentos**. 2010. Recife: **EDUFRPE**, 2010.

SILVA, M. V., RAIMUNDO, I. T., FALCOCHIO, M. C., SOUZA, B. M. S. Dinâmica da carga microbiana de uma unidade de beneficiamento de carne e produtos cárneos. **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 2, p. 72-77, 2020.

SILVA, O. S.; ROMÃO, P. R.; BLAZIUS, R. D.; PROHIRO, J. S. The use of *Andiroba Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc** v. 20, p. 456-457. 2004.

SIMÕES, J. D. S. **Boas práticas de manipulação de carne *in natura*: fatores que influenciam a adesão em supermercados**. 2021. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Centro Universitário regional do Brasil- UNIRB, Salvador, BA, 2021.

SWART, A. Biofilm formation in food processing environments: a review. **South African Journal of Science**, v.112, p. 1-9, 2016.

TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y.; OUELLETTE, M.; OUTTERSON, K.; PATEL, J.; CAVALERI, M.; COX, E. M.; HOUCHENS, C. R.; GRAYSON, M. L.; HANSEN, P.; SINGH, N.; THEURETZBACHER, U.; MAGRINI, N. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **PubMed**, v.18, p. 318–327, 2018.

VAUCHER, R. DE A., GIONGO, J. L., BOLZAN, L. P., CÔRREA, M. S., FAUSTO, V. P., ALVES, C. F. DOS S., SANTOS, R. C. V. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205-210, 2015.

VEIGA-JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n. 02, p. 248-254, 2007.

VELHO, J.P.; BARCELLOS, J. O. J.; LENGLER, L.; ELIAS, S. AL-ALAM; OLIVEIRA, T. E. Disposição dos consumidores porto-alegrenses à compra de carne bovina com certificação. **Bras. Zootec.**, v.38, n.2, p.399-404, 2009.

WANZELER, A.M.V.; JÚNIOR, S.M.A.; GOMES, J.T.; GOUVEIA, E.H.H.; HENRIQUES, H.Y.B.; CHAVES, R.H.; SOARES, B.M.; SALGADO, H.L.C.; SANTOS, A.S.; TUJI, F.M. Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) against oral mucositis: An experimental study in golden Syrian hamsters. **Clin. Oral Investig.** v. 22, p. 2069–2079. 2017.

WELLS, C. L.; HENRY-STANLEY, M. J.; BARNES, A. M. T.; DUNNY, G. M.; HESS, D. J. Relation between Antibiotic Susceptibility and Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Biofilms on Surgical Suture. **SURGICAL INFECTIONS**, v. 12, n. 4, 2011.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: a review. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 456-467, 2013.

WHO. 2022. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. 2017. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WHO. 2019 **New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis**. Disponível em: < [New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis \(who.int\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)>. Acessado em: 15 Set. 2021.

WHO. 2020. **Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acessado em: 13 Set. 2021.

XAVIER, R.V.G.; JOELE, M.R.S.P. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da carne bovina *in natura* comercializada na cidade de Belém – PA. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.125, p.64-73, 2004.

YAAGOUBI, M. E.; MECHQOQ, H.; HAMDAROU, A. E.; MUKKU, V. J.; MOUSADIK, A. E.; MSANDA, F.; AOUAD, N. E. A review on Moroccan Thymus species: traditional uses, essential oils chemical composition and biological effects. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 278, 2021.

YAN S. S.; PENDRAK M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing: public health perspectives. **Clinical and Applied Immunol Reviews**, v. 4, n. 3, p. 189-204, 2004.

YANG, X.; HUANG, J.; WU, Q.; ZHANG, J.; LIU, S.; GUO, W.; CAI, S.; YU, S. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready to-eat foods in China. **Food Control**, v. 60, p. 50-56, 2016.

APÊNDICE

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O/A Sr./a está sendo convidado/a, como voluntário/a, a participar da pesquisa **“Uma abordagem em *One Health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos entre animais, alimentos, ambiente e humanos”**. Nesta pesquisa pretendemos caracterizar o potencial de diferentes cadeias produtivas de alimentos de origem animal no Brasil em disseminar a resistência a diferentes antibióticos entre animais, ambiente de produção e processamento, alimentos e humanos, contemplando uma abordagem em Saúde Única. O motivo que nos leva a executar este trabalho é a necessidade de obtermos informações consistentes e relevantes para investigar a distribuição da resistência nas cadeias produtivas, e avaliar de forma precisa o papel de cada cadeia na manutenção e disseminação de cepas resistentes, devido à preocupação com o impacto que isso pode causar na saúde humana e animal. Embora os agentes antimicrobianos sejam utilizados com diferentes finalidades na produção animal, as consequências que a resistência representa para a saúde pública é de nível global, já que podem resultar em complicações do quadro clínico de pacientes infectados, podendo ter como desfecho o óbito. Assim, os dados que serão obtidos permitirão responder algumas questões sobre o tema “resistência aos antibióticos” que ainda estão em aberto, sendo essas respostas de alta relevância para o planejamento do enfrentamento deste que é um dos maiores desafios para a medicina nos dias atuais.

Para esta pesquisa adotaremos a realização de coleta de fezes por *swab* fecal de funcionários envolvidos em alguma etapa da cadeia de produção de alimentos de origem animal (propriedades rurais, abatedouros frigoríficos e laticínios), saudáveis, sem envolvimento em surto de origem alimentar ou que apresentem qualquer patologia gastrointestinal, e que não tenha tomado antibióticos recentemente. Na sua participação você receberá o material necessário para realização da coleta que poderá ser realizado na sua casa (frasco de coleta, *swab* estéril, tubo contendo meio de transporte e manual de instruções). Este material receberá um código de forma a não permitir a sua identificação. Após este procedimento será pedido a você que armazene a amostra até a equipe de trabalho passar para processamento no laboratório.

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em riscos mínimos, relacionados a eventuais constrangimentos e/ou identificação pessoal. Para tais riscos serem evitados, o convite à pesquisa será realizada individualmente, garantindo o pleno direito de recusa em participar da pesquisa. É importante ressaltar que a pesquisa não possui vínculos diretos com os estabelecimentos, sendo um projeto livre de custo ao local de coleta, financiado por órgão público e de interesse exclusivo científico, onde os resultados não serão disponibilizados para o empregador de forma individual. Este estudo traz benefícios para os envolvidos e a toda população, uma vez que os resultados permitirão a caracterização do tema “resistência a antibióticos” considerando uma visão ampla e abrangente, uma vez que será possível a cobertura de todas as etapas das cadeias produtivas de alimentos de origem animal, desde suas etapas iniciais (animais de produção), passando pelos estágios de produção primária (fazendas), processamento (indústria, funcionários) e chegando as etapas finais (produtos), contemplando os elementos “animal”, “ambiente” e “homem”, num contexto de Saúde Única. Esse tema é considerado um problema atual e crescente, com previsão de ser o principal responsável por mortes nas próximas décadas, caso não seja controlado adequadamente nos dias atuais. Assim, uma abordagem ampla contribuirá para o entendimento do problema e definição de propostas para seu controle.

Para participar desse estudo o Sr./a não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes dessa pesquisa, o Sr./a tem assegurado o direito à indenização. O/A Sr./a tem

garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr./a é atendido/a pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O/A Sr./a não será identificado/a em nenhuma publicação que possa resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados. A amostra entregue por cada participante receberá imediatamente uma identificação numérica, sem relação com o TCLE, de forma a garantir a não identificação do participante.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, da Universidade Federal de Pelotas, e a outra será fornecida ao Sr./a.

Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os/As pesquisadores/as tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____,
contato _____,
fui informado(a) dos objetivos da pesquisa **“Uma abordagem em *One Health* para estabelecer as potenciais rotas de distribuição de resistência a antibióticos entre animais, alimentos, ambiente e humanos”** de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

_____, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do/a Participante

Assinatura do Pesquisador

Nome da Pesquisador Responsável: Wladimir Padilha da Silva
Endereço: *Campus* Capão do Leão - Universidade Federal de Pelotas, s/n
CEP 96010-900 - Caixa Postal 354 - Pelotas - RS
Telefone: (53)3275-7284 - Ramal 210
E-mail: wladimir.padilha2011@gmail.com

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - FAMED – UFPel

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas
Avenida Duque de Caxias, 250, Bairro: Fragata. CEP: 96.030-001. Pelotas/RS
E-mail: cep.famed@gmail.com/ Telefone: (53)3284-4960

ANEXO

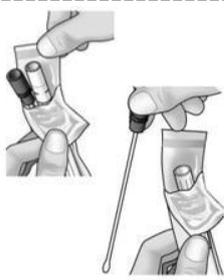
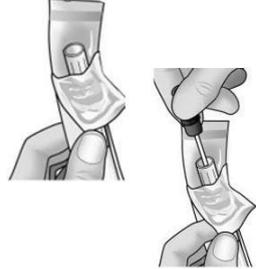
Anexo A: Instruções para coleta de amostra de fezes ds funcionários

INSTRUÇÕES PARA COLETA DE AMOSTRAS

TÍTULO: Procedimentos para Coleta, Acondicionamento e Envio de Amostras de Fezes – SUABE FECAL

1. Coleta

A coleta deverá ser feita em ambiente domiciliar seguindo as instruções:

	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizar o frasco de boca larga fornecido e coletar as fezes (aproximadamente ¼ do frasco)
	<ul style="list-style-type: none"> - Higienizar bem as mãos antes de abrir o suabe - Abrir primeiro o frasco com as fezes - Em seguida, abrir a embalagem expondo somente a tampa do suabe ("cotonete") - Retirar apenas o suabe ("cotonete") da embalagem SEGURANDO SOMENTE pela tampa
	<ul style="list-style-type: none"> - Mergulhar a ponta do suabe ("cotonete") diretamente nas fezes, mexendo para que toda ponta esteja mergulhada
	<ul style="list-style-type: none"> - Remover a tampa do outro tubo (que contém o meio de transporte) - Inserir o suabe ("cotonete") com a amostra dentro do tubo. Fechar bem a tampa do tubo com o suabe ("cotonete") já inserido - O restante das fezes deverá ser descartado em local apropriado, armazenando e enviando APENAS o tubo com o suabe ("cotonete") dentro

2. Armazenamento e envio

Manter o tubo com o suabe ("cotonete") refrigerado em geladeira e encaminhar imediatamente (dentro de um prazo de 24h) ao responsável informado no dia da entrega do material de coleta

Referência

Manual de procedimentos técnicos para coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas/ LACEN – Laboratórios Centrais de Saúde Pública