

RAQUEL CRISTINA KONRAD BURIN

**INTERFERÊNCIA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA
MULTIPLICAÇÃO DE *Salmonella* spp. E EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A TOLERÂNCIA ÁCIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B958i
2014

Burin, Raquel Cristina Konrad, 1989-
Interferência de ácidos orgânicos na multiplicação de
Salmonella spp. e expressão de genes relacionados a
tolerância ácida / Raquel Cristina Konrad Burin. - Viçosa,
MG, 2014.
xii, 61f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Luis Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Salmonella* spp. 2. Bovino de corte - Carcaças.
3. Tolerância ácida. 4. qPCR. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

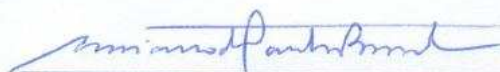
CDD 22. ed. 579.344

RAQUEL CRISTINA KONRAD BURIN

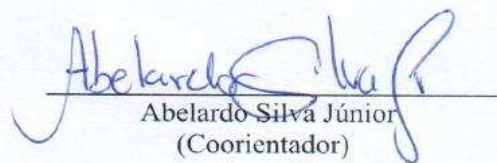
**INTERFERÊNCIA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA
MULTIPLICAÇÃO DE *Salmonella* spp. E EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A TOLERÂNCIA ÁCIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

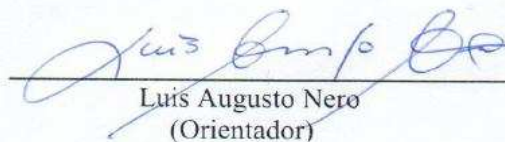
APROVADA: 24 de abril de 2014.



Luciano dos Santos Bersot



Abelardo Silva Júnior
(Coorientador)



Luís Augusto Nero
(Orientador)

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído.”

- Confúcio -

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela educação, orientação e sabedoria, que com certeza foram indispensáveis nas escolhas e decisões tomadas até o momento, além da segurança que sempre me transmitiram para que eu seguisse em frente.

Ao meu irmão Eduardo, exemplo de caráter e amizade, que me apoia e esclarece as dúvidas que surgem no decorrer da minha formação acadêmica.

Aos amigos que me ajudaram durante o mestrado e que foram meus companheiros nos vários momentos de Viçosa: Marisa e filhos (minha família mineira), Japa, Valéria, Aline, Monique, Rodrigo, Mariane, Natália, Eduardo, Mococa, Danilo, Anderson, Fábio, Vitor, Pedro, Cristian, Saneli, David, Cleiton, Otávio e amigas da República Casa da Mãe Joana.

Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV, em especial ao Dagoberto e Luiz Carlos, por toda disposição e ajuda nos momentos em que precisei.

Agradeço ao Professor Luciano Bersot que me orientou durante a faculdade e contribuiu de forma importante para meu futuro profissional, ao me conceder muitas oportunidades que influenciaram nas decisões sobre qual área seguir após a graduação.

Ao orientador de mestrado, Luis Augusto Nero, que através de sua sabedoria e paciência como professor e pesquisador, me fez crescer pessoalmente e profissionalmente durante este período.

Ao meu co-orientador, Professor Abelardo da Silva Junior, que me ajudou, apoiou e também esclareceu muitas dúvidas que surgiram durante a execução do meu projeto de mestrado.

A CAPES pela bolsa de mestrado, que foi fundamental para o meu sustento e permanência em Viçosa.

E a Deus que me tranquilizou durante meus desabafos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Carne bovina.....	3
1.1. Cadeia Produtiva.....	3
1.2. Riscos Microbiológicos Incorporados Durante o Abate.....	4
2. Salmonella spp.	6
2.1. Características do micro-organismo e da doença	6
2.2. Epidemiologia.....	8
3. Aplicação de ácidos orgânicos na descontaminação de carcaças bovinas	10
3.1. Perspectivas e Controvérsias	10
3.2. Características dos ácidos orgânicos.....	12
3.3. Mecanismo de Ação.....	13
3.4. Eficiência antimicrobiana dos ácidos orgânicos.....	14
4. Tolerância ácida de Salmonella spp.	18
4.1. Mecanismos moleculares envolvidos na tolerância ácida de Salmonella spp.	19
4.2. Regulação do fator sigma alternativo RpoS.	22
4.3. Características Moleculares do gene rpoS.....	24
5. Referências	24
OBJETIVOS	33
Objetivo geral	33
Objetivos específicos.....	33
Artigo a ser submetido a publicação	34
Resumo	35
Abstract	36
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	38
2.1. Micro-organismos	38
2.2. Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE.....	39

2.3. Detecção dos genes associados à tolerância ácida.....	40
2.4. Expressão de genes relacionados a tolerância à ácidos orgânicos.....	41
Micro-organismos.....	41
Tratamentos.....	42
Monitoramento das populações de Salmonella spp.....	42
Monitoramento da expressão de genes relacionados a tolerância ácida.....	42
3. Resultados e Discussão	44
5. Referências	56
CONCLUSÕES	61

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Esquema de uma membrana celular de *Salmonella* spp. contendo os dois sistemas de descarboxilase dos aminoácidos Lisina e Arginina. Fonte: Álvarez-Ordóñez et al. (2011).20
- Figura 2. Aspectos da regulação do *rpoS* na presença de estresse ácido. Durante o estresse ácido a transcrição do gene *rpoS* é ativado e a degradação do σ^s é inibida, permitindo seu acúmulo. Fonte: Modificado de Foster (2001).23
- Figura 3. A influência de diversas condições de estresse na regulação do σ^s24

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1. Os perfis genotípicos dos isolados de *Salmonella* spp. estão agrupados em três principais clusters, sendo que os isolados destacados em vermelho foram os utilizados nos ensaios in vitro.45
- Figura 2. Produtos de PCR dos genes *rpoS* (213pb), *nlpD* (237pb), *clpP* (226pb), *clpX* (275pb), *mviA* (165 pb) e *gmK* (101pb). O controle negativo está identificado como c-.46
- Figura 3. Variações da expressão dos genes relacionados à resistência ácida (*S. Derby* – cepa I) durante os intervalos de análise de 0, 6, 24 e 48 horas. A, B e C: Testes realizados com ácido lático em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. D, E e F: Testes realizados com ácido acético em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. Gene *rpoS* (-●-), Gene *nlpD* (-o-), Gene *clpP* (-□-), Referência (---).47
- Figura 4. Variações da expressão dos genes relacionados à resistência ácida (*S. Derby* – cepa I) durante os intervalos de análise de 0, 6, 24 e 48 horas. A, B e C: Testes realizados com ácido lático em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. D, E e F: Testes realizados com ácido acético em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. Gene *rpoS* (-●-), Gene *nlpD* (-o-), Gene *clpP* (-□-), Referência (---).48
- Figura 5. Variações da expressão dos genes relacionados à resistência ácida (*S. Meleagridis* – cepa III) durante os intervalos de análise de 0, 6, 24 e 48 horas. A, B e C: Testes realizados com ácido lático em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. D, E e F: Testes realizados com ácido acético em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. Gene *rpoS* (-●-), Gene *nlpD* (-o-), Gene *clpP* (-□-), Referência (---).49

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Fatores que influenciam na atividade inibitória dos ácidos orgânicos sobre os micro-organismos.....	14
---	----

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Tabela 1. Sorotipos e origens das cepas utilizadas no presente estudo.....	39
Tabela 2. Sequências dos primers obtidas através do número de acesso do genbank ou de estudos prévios, e respectivos produtos de PCR (pb) e Temperatura de Anelamento.	41
Tabela 3. Taxas de multiplicação de <i>S. Derby</i> (cepa I) quando em contato com ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.	50
Tabela 4. Taxas de multiplicação de <i>S. Typhimurium</i> (cepa II) quando em contato com ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.	50
Tabela 5. Taxas de multiplicação de <i>S. Meleagridis</i> (cepa III) quando em contato com ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.	50

RESUMO

BURIN, Raquel Cristina Konrad, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2014. **Interferência de ácidos orgânicos na multiplicação de Salmonella spp. e expressão de genes relacionados a tolerância ácida.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientador: Abelardo Silva Júnior.

Em condições de estresse ácido, micro-organismos do gênero *Salmonella* spp. utilizam como estratégia de sobrevivência um complexo mecanismo de tolerância que envolve vários genes. Os genes *rpoS* e *nlpD* são responsáveis pela expressão de proteínas que promovem a proteção da célula bacteriana contra os danos provocados pelo estresse, e os genes *clpP*, *clpX* e *mviA* estão envolvidos na regulação dessas proteínas no interior da célula. O presente estudo tem como objetivo associar as variações na expressão desses genes com as populações de *Salmonella* spp. durante um estresse ácido, condição que pode ser encontrada em carcaças bovinas que sofrem a aspensão de ácidos orgânicos para descontaminação microbiológica. A partir de uma coleção composta por 79 cepas de *Salmonella* spp., foi realizado um agrupamento genético por restrição enzimática através da técnica PFGE utilizando-se a enzima *XbaI*, e detecção dos genes *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA*. Três cepas foram selecionadas (sorotipos: *S. Derby*, *S. Typhimurium* e *S. Meleagridis*) e semeadas em caldo extrato de carne com diferentes valores de pH (4,0, 5,0, e 6,0), ajustados com ácido láctico e ácido acético. Logo após inoculação, e após 6, 12, 24 e 48 h de incubação a 37 °C, as populações bacterianas foram monitoradas por plaqueamento direto, e a expressão dos genes *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA* por qPCR. Os resultados revelaram que *Salmonella* spp. pode se adaptar aos ácidos testados (acético e láctico), principalmente quando estão em pH 5,0 ou 6,0, com expressão evidente do gene *rpoS*. Em pH 4,0, a redução completa das populações de *Salmonella* spp. ocorreu após 6 ou 24 h de incubação, o que em uma situação industrial representaria um período suficiente para que as proteínas da carne promovam o aumento

do pH do meio, possibilitando dessa forma a adaptação de *Salmonella* spp. nesse substrato. A capacidade de adaptação de *Salmonella* spp. em valores de pH 5,0 e 6,0, demonstrada no presente estudo, ressalta a importância de um monitoramento adequado da redução de pH promovido pela aspersão de ácidos orgânicos em carcaças bovinas durante o processamento: caso o controle de pH não seja adequado, cepas de *Salmonella* spp. potencialmente contaminantes podem sobreviver e se manterem ativas nos produtos cárneos finais. Adicionalmente, é necessário que ocorra um equilíbrio entre a aplicação de ácidos orgânicos em concentrações que garantam o controle de *Salmonella* spp., além de outros micro-organismos, e a ausência de efeitos negativos sobre qualidade sensorial dos produtos cárneos, além de descoloração e exsudação. Os resultados obtidos permitem concluir que os ácidos orgânicos avaliados no presente estudo (ácido láctico e ácido acético) podem ser considerados alternativas no controle de *Salmonella* spp., desde que ocorra um rígido controle dos valores de pH das soluções durante a interação com esse patógeno, e demanda o desenvolvimento de estudos em sistemas cárneos para demonstração desse comportamento.

ABSTRACT

BURIN, Raquel Cristina Konrad, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. April 2014. **Interference of organic acids on the growth of Salmonella spp. and the expression of genes involves on acid tolerance.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Abelardo Silva Júnior.

Under acid stress conditions, *Salmonella* spp. presents a complex mechanism of tolerance that involves multiple genes. The *rpoS*, *nlpD* genes are responsible for the proteins expression that protect the bacterial cell against damage caused by acid stress, and *clpP*, *clpX*, *mviA* genes are involved in the regulation of these proteins inside the cell. The aim of this study was to associate the variations in these genes expression and *Salmonella* spp. populations when subjected to acid stress condition, a situation usually observed in bovine carcasses after cleaning procedures with organic acids spraying in slaughterhouse environment. Considering a culture collection composed by 79 *Salmonella* spp. strains, their fingerprinting were obtained by PFGE using *XbaI*, and all strains were subjected to PCR reactions to detect *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX*, *mviA* genes. Based on the obtained data, three strains were selected (serotypes: *S. Derby*, *S. Typhimurium* and *S. meleagridis*) and inoculated in meat extract broth with different pH values (4.0, 5.0, and 6.0), adjusted with lactic acid and acetic acid. Immediately after inoculation, and after 6, 12, 24 and 48 h of incubation at 37 °C, the bacterial populations were monitored by direct plating, and the expression of *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* and *mviA* genes by qPCR . The results showed that *Salmonella* spp. can adapt to the tested acids (acetic and lactic), especially at pH 5.0 and 6.0, with evident expression of the *rpoS* gene. When the pH was adjusted to 4.0, complete reduction of *Salmonella* spp. populations occurred after 6 or 24 h of incubation, but in industrial situation this period would be sufficient for the meat proteins promote an increase in pH value, enabling the adaptation of *Salmonella* spp. on the substrate. The adaptability of *Salmonella* spp. at

pH 5.0 and 6.0, as demonstrated in this study, shows the importance of adequate monitoring of pH reduction promoted by the organic acids spraying in bovine carcasses during processing: if pH control is not adequate, strains of *Salmonella* spp. can survive and remain active in the end meat products. Additionally, the ideal concentration of organic acids for the application in meat products depends in the balance between the pathogen contamination reduction and the absence of negative effects under sensorial quality. The results indicate that organic acids evaluated in the present study (lactic acid and acetic acid) can be considered as alternatives to control *Salmonella* spp., since associated to a rigorous pH control of the applied solutions during interaction with this pathogen. Furthermore, it demands further studies in meat systems to demonstrate this behavior.

INTRODUÇÃO

Durante o processo de abate de bovinos, a carne está suscetível à contaminações biológicas principalmente na esfolagem e na evisceração, já que durante estas etapas as superfícies das carcaças podem entrar em contato com pelos e fezes dos animais (Smulders & Woolthuis, 1985). Fontes adicionais podem levar a contaminação cruzada, principalmente através de equipamentos mal higienizados, de manipuladores ou ainda do contato das carcaças com outras contaminadas (IFT, 2002).

Além dos micro-organismos não patogênicos que podem causar aparências indesejáveis e deterioração na carne, outros, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, também podem ser incorporados nas superfícies das carcaças durante os procedimentos de abate, determinando em perdas econômicas relacionadas a saúde dos consumidores pela ingestão desses patógenos ou seus metabólitos quando presentes na carne (Currier et al., 1986; Doyle, 1991; Kotula & Kotula, 2000).

Práticas operacionais que tenham como objetivo reduzir a probabilidade de contaminação microbiana tem sido aplicadas procurando combinar ações rotineiras, como o resfriamento rápido das carcaças, a uma série de novas tecnologias de natureza física ou química (Huffman, 2002). Entre essas tecnologias, a sanitização de carcaças bovinas com aspersão de ácidos orgânicos tem sido rotineiramente utilizada em frigoríficos nos Estados Unidos e Canadá, porém ainda não permitido pela regulamentação de procedimentos higiênicos de outros países, como o Brasil e os da União Europeia (Del Río et al., 2007).

A resistência em se utilizar ácidos orgânicos como sanitizantes de carcaças ocorre devido a existência de muitas controvérsias sobre a real eficiência desses agentes. Neste sentido, muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de avaliar a

ação dessa tecnologia coadjuvante na redução da carga microbiana em carcaças, expondo suas vantagens e desvantagens dentro da indústria de alimentos.

Alguns estudos mostram os benefícios de sua utilização, uma vez que quando aplicados na superfície da carne, caracterizam-se pela sua alta toxicidade aos micro-organismos e baixa toxicidade aos humanos, capacidade de aumentarem a durabilidade (shelf-life) do produto e minimizarem os riscos de patógenos associados a alimentos sem afetar a qualidade sensorial da carne (Adams & Hall, 1988; Delmore et al., 1998; Goddard et al., 1996). Entretanto, deve-se evitar a utilização dessas associações para mascarar uma possível ausência de aplicação de procedimentos higiênicos adequados em abatedouros. Além disso, é preciso entender como as interações microbiológicas ocorrem, para se evitar a seleção de micro-organismos resistentes à ácidos orgânicos, fator que implicaria num maior risco a saúde do consumidor (Smulders & Greer, 1998).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Carne bovina

1.1. Cadeia Produtiva

A produção de alimentos é um dos grandes desafios desse século, já que é necessário atender a demanda relacionada ao crescimento populacional mundial. Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2009), a produção mundial de alimentos deverá dobrar nos próximos 50 anos para alimentar uma população que deverá chegar a 9 bilhões de pessoas.

O desafio de aumentar a produção de alimentos no mundo terá que ser superado, apesar das mudanças climáticas provocadas pela poluição, e do esgotamento das áreas agricultáveis. Com esse cenário fica evidente que a demanda por alimentos é enorme e que a tendência é produzir de forma cada vez mais intensiva (FAO, 2009). Neste aspecto não se deve deixar de considerar a importância do Brasil em âmbito mundial quando refere-se a produção de alimentos, em especial a produção de carnes.

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Em 2011 foram abatidos 21,5 milhões de bovinos em todo o país, sendo que Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Pará lideraram os abates, com 62,4% dos abates nacionais (Brasil, 2012a).

Segundo as projeções realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entre o período de 2011/12 a 2021/22, as taxas de crescimento da produção brasileira de carne bovina serão em torno de 2,1% ao ano, ficando atrás somente da taxa de crescimento de carne de frango (4,2% ao ano) (Brasil, 2012b). Este

aumento da produção refletirá também numa expansão das exportações, mantendo o Brasil em posição de liderança: o país ocupa a posição de maior exportador de carne bovina do mundo desde 2008. Na relação exportação brasileira/comércio mundial, o Brasil representará 42,7% do comércio mundial de carne bovina no período de 2019/20, com vendas para mais de 180 países (Brasil, 2010a; Brasil, 2012b). Quanto ao consumo nacional, a carne bovina é o segundo tipo mais consumido, com uma taxa de crescimento anual projetada de 2,0%, entre 2011/2012 a 2021/2022. Isso significa um consumo interno de 9,4 milhões de toneladas daqui a 10 anos (Brasil, 2012b).

Porém, tão importante quanto o Brasil manter esta participação expressiva no fornecimento de alimentos para o mundo, é assegurar a qualidade e inocuidade da produção visando a saúde do consumidor. A carne bovina é um alimento de grande importância nutricional para o homem, por ser rico em proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais. Porém, quando não processada de forma correta pode ser contaminada por diversos micro-organismos e esses mesmos substratos nutricionais podem permitir a multiplicação dos mesmos, transformando a carne num potencial veículo de patógenos de importância em saúde pública.

1.2. Riscos Microbiológicos Incorporados Durante o Abate

Os riscos e os perigos em uma linha de abate são muitos. Sabe-se que além dos micro-organismos não patogênicos que podem causar aparências indesejáveis e deterioração na carne, outros de importância a nível mundial: *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *S. aureus*, *Clostridium* spp. também podem ser incorporados nas superfícies das carcaças e determinar problemas relacionados a saúde dos consumidores (Currier et al., 1986; Doyle, 1991; Kotula & Kotula, 2000).

Dessa forma, os cuidados com a contaminação iniciam já no transporte dos animais, que devem apresentar um adequado estado sanitário e devem ser transportados de forma que se evite a superlotação. A higiene geral dos animais também deve ser controlada, pois quanto menos sujidades externas apresentarem, menores serão os riscos de contaminação da carcaça durante as operações de abate. Um adequado manejo deve ser realizado para evitar o estresse durante as viagens, uma vez que a redução do estado imunológico dos animais facilita a invasão dos tecidos pelos micro-organismos (Bonesi & Santana, 2008; Brasil, 2007).

Nos currais de descanso é importante que os animais permaneçam sob jejum e dieta hídrica, pois com a redução do conteúdo gastrointestinal será menor o risco de rompimento do aparelho digestório durante a etapa de evisceração (Pardi et al., 2001). Os animais devem sofrer uma lavagem com água hiperclorada sob pressão de 3 atmosferas para proporcionar a retirada da maior parte das sujidades presentes na pele. Após o banho, é importante que os animais permaneçam por alguns segundos para escorrer e eliminar o excesso de água presente na pele antes de entrarem no box de atordoamento (Bonesi & Santana, 2008; Brasil, 2007).

Durante a esfolagem, a pele, os pelos e as patas dos animais ainda podem estar impregnados com sujidades e micro-organismos, os quais poderão entrar em contato com a superfície da carcaça. Por isso, essa etapa deve ser realizada com técnicas adequadas e por magarefes conscientes e treinados, que realizam frequentemente a higienização das mãos e antebraços. É preciso também realizar a troca de facas principalmente ao iniciarem as tarefas em outro animal (Bonesi & Santana, 2008; Brasil, 2007).

Micro-organismos do intestino podem contaminar a carcaça durante a evisceração, sendo necessário conduzir esta etapa de forma cuidadosa para que não ocorra extravasamento do conteúdo intestinal. Para isso, medidas preventivas durante o

abate são imprescindíveis, como por exemplo a oclusão do reto e do esôfago (Brasil, 2007; Pardi et al., 2001).

Na etapa final do abate, a lavagem das carcaças tem como finalidade promover a retirada de materiais aderidos como sangue e restos de tecidos. A água utilizada na lavagem deve ser potável e monitorada como uma das condições de controle de qualidade do abate (Bonesi & Santana, 2008; Brasil, 2007). Além disso, fontes adicionais também podem levar a contaminação cruzada, principalmente através de equipamentos mal higienizados, de manipuladores ou ainda do contato das carcaças com outras contaminadas (IFT, 2002).

Dessa forma para se ter uma qualidade aceitável do produto é preciso conhecer e controlar cada etapa, desde os cuidados com a sanidade dos animais até o controle de todo o processo de produção do alimento, com o intuito de garantir um produto final livre não só de ameaças biológicas, mas também de ameaças físicas e químicas.

2. Salmonella spp.

2.1. Características do micro-organismo e da doença

O gênero *Salmonella* spp., pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. O pH ótimo para multiplicação de *Salmonella* spp. fica próximo de 7, não toleram concentrações de sal superiores a 9% e a temperatura ideal para multiplicação desses micro-organismos é de 35 a 37°C (Silva et al., 2010).

As doenças causadas por *Salmonella* spp. costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *S. Typhi*, as febres entéricas, causadas por *S.*

Paratyphi (A, B e C) e as enterocolites (ou salmoneloses), causadas pelos demais sorotipos de *Salmonella* spp. (Coburn et al., 2007; Pui et al., 2011).

A febre tifóide é uma doença sistêmica caracterizada por febre e dores abdominais. Acomete o homem, e normalmente é transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano. É mais comum em países com carências em saneamento básico, abastecimento de água insuficiente e em locais com aglomerações de casas e assentamentos. Acomete principalmente crianças e pessoas imunossuprimidas (Cliver et al., 2006). A infecção se inicia com a penetração nas células epiteliais intestinais, invasão da lâmina própria (logo abaixo da camada epitelial), e entrada na corrente linfática. Os micro-organismos são então fagocitados por células de defesa (macrófagos), dentro dos quais se multiplicam. Essa multiplicação causa destruição dos macrófagos, com liberação de inúmeras bactérias na corrente circulatória, através da qual podem atingir diversos órgãos, como fígado, baço e vesícula biliar, até estabelecer uma infecção (Coburn et al., 2007; Pui et al., 2011). Os sinais incluem mal-estar, dores de cabeça, febre e pode haver constipação (dificuldade para defecar) e tosse não produtiva. Com a evolução da doença e sem tratamento, os sinais ficam mais severos e incluem febre alta e persistente, estado de delírios e diarreia, podendo levar a morte por septicemias e hemorragias (Cliver et al., 2006).

As febres entéricas são bastante semelhantes à febre tifóide, mas os sintomas clínicos são mais brandos. Enquanto a febre tifóide pode durar de uma a oito semanas, as febres entéricas duram no máximo três semanas. Estas doenças podem ser causadas pelo consumo de água e alimentos contaminados, especialmente leite cru, vegetais crus, mariscos e ovos (Coburn et al., 2007; Pui et al., 2011).

Ao contrário do que ocorre na febre tifóide e nas febres entéricas, nas salmoneloses a penetração de *Salmonella* spp. fica limitada à lâmina própria. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecções sistêmicas e as lesões ficam

restritas à mucosa intestinal. Os pacientes com salmonelose apresentam diarreia como principal sintoma, dores abdominais, febre, calafrios, dores de cabeça, vômito, dores nas articulações e mal-estar geral. Os sintomas aparecem em média, 12 a 36 horas dependendo da dose infectante do micro-organismo, e permanecem durante um a quatro dias. Este tempo de duração da infecção é uma das características que diferencia das gastroenterites virais, as quais ocorrem durante um período mais curto. A ocorrência de salmonelose pode estar associada ao consumo de vários tipos de alimentos. Verifica-se, no entanto que carnes são mais frequentemente envolvidos (Cliver et al., 2006; Coburn et al., 2007; Pui et al., 2011).

2.2. Epidemiologia

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países desenvolvidos e em desenvolvimento colocam o gênero *Salmonella* spp. entre os agentes patogênicos mais comumente encontrados em surtos por toxinfecção de origem alimentar. Dados estimados revelam que *Salmonella* spp. é responsável anualmente por 93,8 milhões de casos de enfermidade em humanos, sendo 80,3 milhões dos casos de origem alimentar, e leva a morte em torno de 155.000 pessoas (Majowicz et al., 2010).

Em todas as regiões do mundo, com exceção da Oceania e América do Norte, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* estão entre o primeiro e segundo sorotipo mais comumente relatado nos surtos, respectivamente. Na Oceania e América do Norte essas posições se invertem. Globalmente, a proporção geral de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram de 43,5% e 17,1% (Hendriksen et al., 2011).

S. Agona foi frequentemente observada na América Latina, estando entre os três sorotipos não tifóides mais comuns. Também foi classificado em 7º na Europa e 13º na América do Norte. No geral, a proporção deste sorotipo foi alterada de 0,8% para

1,5% entre 2001 e 2007. Este aumento foi observado em países desenvolvidos e também em desenvolvimento, e foi acentuada entre 2005 e 2007 (Hendriksen et al., 2011).

Um aumento na proporção de *S. Typhi* em todas as regiões do mundo foi observado inicialmente em 2003. Desde então houve um aumento de 0,7% em 2003 para 2,2% em 2007. Em todos os países da América Latina, com a exceção da Costa Rica, Paraguai e Uruguai, *S. Typhi* está entre os 15 sorotipos mais comuns nacionalmente. No Brasil e no Chile, a proporção diminuiu de 9,7% em 2001 para 3% em 2007 e de 15,4% em 2001 para 4,1% em 2007, respectivamente (Hendriksen et al., 2011).

Quando avaliados os dados epidemiológicos do Brasil especificamente, observa-se que, segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, no período de 1999 a 2010 ocorreram 6.791 surtos de doenças associadas ao consumo de alimentos envolvendo 133.954 pessoas. Dos surtos em que foi possível determinar o micro-organismo envolvido, verificou-se que 45,9% foram causados por *Salmonella* spp. e dentre estes 11,6% envolviam o consumo de carne bovina contaminada (Brasil, 2010b). O sorotipo mais frequentemente isolado de amostras clínicas é *S. Enteritidis*, seguido dos sorotipos *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Typhi* (Hendriksen et al., 2011).

Sabe-se que no Brasil, assim como em outros países, os dados epidemiológicos de surtos alimentares não refletem a realidade, conhecendo-se pouco sobre a magnitude do problema. Ou seja, os dados obtidos poderiam ser ainda mais significativos se todos os surtos associados a consumo de alimentos contaminados fossem realmente notificados.

3. Aplicação de ácidos orgânicos na descontaminação de carcaças bovinas

3.1. Perspectivas e Controvérsias

A necessidade de produzir alimentos com qualidade tem recebido considerável atenção nos últimos anos. Inúmeros estudos estão sendo realizados na busca de novas tecnologias coadjuvantes ou desenvolvimento de procedimentos operacionais que possibilitem ganhos na qualidade do produto final. Sabe-se que a base para uma produção com qualidade começa com a adoção de boas práticas de produção, tanto nas propriedades rurais quanto nas indústrias nas quais os alimentos serão processados. Assim, as tecnologias coadjuvantes devem servir apenas como formas complementares para garantir a segurança.

Técnicas de descontaminação, como por exemplo o uso de ácidos orgânicos como sanitizantes de carcaças, tem sido estudadas por microbiologistas e oficiais da saúde pública. Entretanto, ainda há resistência em sua utilização devido a necessidade de se obter informações mais precisas sobre seus mecanismos de ação sobre microorganismos importantes na cadeia produtiva de produtos cárneos (Smulders & Greer, 1998). Apesar de haver muitas pesquisas sobre a eficiência antimicrobiana desses agentes sanitizantes, ainda há escassez de dados sobre sua real eficiência na prática comercial. Isto acontece porque existe uma ampla diferença entre os resultados obtidos de estudos laboratoriais e de estudos em abatedouros, indicando que é inapropriado extrapolar seus impactos sobre a qualidade e tempo de estocagem do produto (Dorsa et al., 1997).

A aspersão de ácidos orgânicos em carcaça bovina não é uma técnica comumente praticada pelos países. No Brasil, sabe-se que seu uso não é permitido pelo Sistema Federal de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Da mesma forma acontece

em países da União Europeia, onde o uso de ácidos orgânicos também não é permitido pela regulamentação de procedimentos higiênicos, com a justificativa de que essas tecnologias pudessem mascarar a falta de higiene dos abatedouros. Dessa forma, esses países somente permitem a lavagem das carcaças com água potável sob pressão (Smulders & Greer, 1998). Por outro lado, os ácidos orgânicos têm sido utilizados rotineiramente em abatedouros localizados nos Estados Unidos. As concentrações preconizadas pelo Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) são de 2,5% de ácido acético e cítrico em soluções de água para lavagem das carcaças na etapa de pré-resfriamento ou 5% de ácido láctico nas etapas de pré ou pós-resfriamento das carcaças (USDA., 2008). Além disso, em alguns abatedouros dos Estados Unidos, a aspersão de ácidos orgânicos é considerada como uma Boa Prática de Fabricação (BPF), mas não como um Ponto Crítico de Controle (PCC), uma vez que nem todas as carcaças necessariamente são tratadas com sanitizantes (Lues & Theron, 2011).

A Agência de Inspeção de Alimentos do Canadá permite a utilização dos ácidos orgânicos para descontaminação de carcaças somente em abatedouros onde há um controle rígido de qualidade e descrição detalhada de todos os procedimentos operacionais sobre o uso dos sanitizantes. Os ácidos orgânicos podem ser utilizados numa concentração de 1,5 a 2,5% nas etapas de lavagem das carcaças ou nas etapas de pré-evisceração. As carcaças que sofrerem a aspersão dos sanitizantes na etapa de pós-evisceração devem passar por uma lavagem com água potável antes e depois da aplicação (Lues & Theron, 2011; USDA., 2012).

Os efeitos dos ácidos orgânicos sobre a qualidade sensorial da carne também são discutidas. Acredita-se que a sanitização das carcaças com soluções diluídas a 1 e 2% não afetam as propriedades sensoriais da carne. Porém, os efeitos podem ser irreversíveis dependendo das condições de tratamento. Em casos em que cortes cárneos

são imersos em soluções ácidas, os efeitos observados são mais prejudiciais, resultando em descoloração, alterações de sabor e exsudação (Smulders & Greer, 1998).

Acredita-se que o ideal seria aumentar a atividade antimicrobiana utilizando baixas concentrações de ácidos orgânicos (<1%), dessa forma os efeitos sobre a qualidade sensorial da carne seriam reduzidos, além do menor custo associado à utilização de altas concentrações dos sanitizantes. Adicionalmente, haveria uma redução na indução de tolerância ácida dos micro-organismos de importância em saúde pública (Tamblyn & Conner, 1997).

3.2. Características dos ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos são produtos do metabolismo de micro-organismos e por isso ocorrem naturalmente em uma variedade de substratos de origem animal ou vegetal. Nos alimentos podem estar presentes como resultado bioquímico do metabolismo da microbiota residente, ou ainda pela adição direta durante as etapas do processamento do alimento (Gomis, 1992).

Os ácidos orgânicos mais comuns são os ácidos carboxílicos, os quais tem sua atividade ácida associada a um grupo carboxil (COOH). O ácido acético, assim como o ácido láctico possuem apenas um grupo (monocarboxílicos), o que implica na necessidade de estarem numa concentração maior do que os ácidos orgânicos que tenham mais de um grupo carboxil, para atingirem o mesmo pH. De forma geral os ácidos orgânicos são considerados ácidos fracos e por isso não se dissociam completamente em água quando comparado aos ácidos fortes (Lues & Theron, 2011).

São os valores de pKa dos ácidos orgânicos que determinam sua ação bactericida: os ácidos que apresentam um pKa alto possuem uma constante de dissociação menor, e por isso possuem concentrações mais elevadas da porção não

dissociada do ácido, a qual é justamente a responsável por exercer o efeito bactericida. Nesse sentido o ácido acético, por apresentar um pKa maior que do ácido láctico, possui um efeito antimicrobiano também maior (Lues & Theron, 2011).

3.3. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos é baseado no potencial acidificante e sua capacidade de dissociação. A forma não dissociada dos ácidos é a que possui ação bactericida, pelo fato de ter característica lipofílica e por isso maior facilidade em atravessar a membrana celular dos micro-organismos (Lues & Theron, 2011). Uma vez no interior do citoplasma bacteriano, onde o pH é em torno de 7, os ácidos irão dissociar-se rapidamente produzindo íons H⁺, e reduzindo o pH da célula. Assim, a célula bacteriana reage eliminando os prótons ao tentar manter o pH constante, aumentando dessa forma seu gasto energético e conseqüentemente reduzindo sua taxa de multiplicação (França, 2008; Lues & Theron, 2011).

Além disso, a membrana bacteriana poderá se romper e com isso perder sua atividade de transporte de nutrientes. Adicionalmente haverá inibição de reações metabólicas importantes como a glicólise, com a conseqüente inibição da produção de ATP, e acúmulo de ânions no interior do citoplasma bacteriano, uma vez que esses são incapazes de sair do interior da célula (Lues & Theron, 2011).

A parte aniônica dos ácidos orgânicos ao se acumular no interior do citoplasma compromete muitas funções metabólicas e leva a um aumento da pressão osmótica, incompatível com a sobrevivência das bactérias. Podem também impedir a síntese de DNA interferindo na tradução proteica (França, 2008; Lues & Theron, 2011).

Os fatores que podem influenciar na atividade inibitória dos ácidos orgânicos sobre os micro-organismos são, valor do pKa do ácido, temperatura e pH do meio (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores que influenciam na atividade inibitória dos ácidos orgânicos sobre os micro-organismos.

Fatores	influência sobre a atividade inibitória dos ácidos orgânicos
pKa do ácido	quanto maior o valor do pKa, maior a concentração da porção não dissociada do ácido que promove a ação bactericida.
pH do meio	quando o pH do meio for baixo, a constante de dissociação do ácido será reduzida (\uparrow pKa = \uparrow [não dissociada]) e por isso melhor será seu efeito bactericida.
temperatura do meio	altas temperaturas do meio promovem maior fluidez da membrana celular, permitindo uma rápida difusão do ácido não dissociado para o interior do citoplasma.

Fonte: Lues & Theron, 2011; Jung & Beuchat, 2000; Chikthimmah et al., 2003; Chaveerach et al., 2002

3.4. Eficiência antimicrobiana dos ácidos orgânicos

No estudo in vitro realizado por Álvarez-Ordóñez et al. (2010) sobre a tolerância ácida de *S. Typhimurium* induzida pela presença de ácidos orgânicos, observou-se que em temperaturas de 10 °C ou 45 °C e acidificações à pH menor ou igual a 6,4 com ácido acético e pH menor ou igual a 5,4 com ácido cítrico, láctico ou hidrocloreídrico, ocorria a inibição desse micro-organismo. Verificou-se também, que a ordem decrescente dos ácidos que promoveram melhor inibição no desenvolvimento de *S. Typhimurium* foram: acético, láctico, cítrico, e hidrocloreídrico.

Considerando a eficiência de ácidos orgânicos em diferentes concentrações, os resultados do estudo desenvolvido por Silva et al. (2001) demonstraram que ao testar o ácido acético a 1 e a 2% em nove carcaças de frango sanitizadas por aspersão, aquelas

que foram tratadas com o ácido a 1%, quatro ainda apresentaram *Salmonella* spp., porém quando tratadas com ácido a 2% nenhuma carcaça foi positiva, demonstrando efetividade. Resultados semelhantes foram verificados em pesquisa realizada por Blackburn et al. (1997), onde ácido lático e ácido acético a 2% foram mais letais para *S. Enteritidis* (D_{value} de 1,7 e 0 respectivamente) do que as concentrações de 1% (D_{value} de 13,3 e 14,8 respectivamente); além disso, constataram que o poder de inativação microbiana foi em ordem decrescente: ácido acético, ácido lático, ácido clorídrico, ácido cítrico.

Dubal et al. (2004) avaliaram a eficiência de ácidos orgânicos sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* inoculados em carne de cabra/ovelha e analisados após diferentes períodos de estocagem em temperatura de refrigeração. A partir dos dados obtidos, verificou-se que a utilização do ácido lático à 2% e da combinação de 1,5% de ácido acético com 1,5% de ácido propiônico, diminuíram as contagens de bactérias viáveis na carne em 0,52 e 1,16 log respectivamente; e também inibiram a multiplicação dos patógenos durante os diferentes dias de estocagem da carne. Isto resultou num aumento da durabilidade correspondente à 5 dias quando comparado às carnes não tratadas com ácidos (controle). Além disso, a combinação dos ácidos acético e propiônico foi mais eficiente do que a utilização de ácido lático isoladamente.

No estudo de Tinney et al. (1997), foram realizados três experimentos com aplicação de quatro tratamentos cada: controle (carne não tratada), ácido acético à 2%, pulso elétrico e a combinação de ácido acético e pulso elétrico. No experimento 1 o micro-organismo inoculado na carne foi *E. coli*; no experimento 2, *S. Typhimurium*; e no experimento 3, a carne era inoculada com *S. Typhimurium* e depois estocada à baixas temperatura para simular a etapa de resfriamento das carcaças. Os dados demonstraram que a utilização de ácido acético à 2% diminuiu significativamente as

contagens de *E. coli* em 67% e *Salmonella* spp. em 85% nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Já no experimento 3, a técnica de descontaminação mais eficiente para redução das contagens de *Salmonella* spp. foi a utilização da combinação ácido acético e pulso elétrico (redução de 95%), quando comparado à utilização dessas técnicas isoladamente (redução de 85%).

A eficiência do ácido láctico na redução de contagens de patógenos em carne de frango foi estudada por Anang et al. (2007). Segundo os dados obtidos nesse estudo, a utilização de maiores concentrações do ácido láctico (1,5% e 2%) foi mais eficiente na redução das contagens bacterianas (*S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*) do que a utilização de concentrações menores (0,5%). Além disso, verificou-se que a carne que sofria a imersão ao ácido por um período de 30 min garantia uma maior redução das contagens bacterianas após 14 dias de estocagem à 4 °C, quando comparado aos tempos de imersão de 10 e 20 min. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que a descontaminação de carcaças de frango é mais eficiente quando realizada com ácido láctico, porém há dependência da contaminação inicial da carne e da combinação de parâmetros químicos, físicos e mecânicos que podem estar envolvidos na aplicação do sanitizante.

Os resultados obtidos por Hwang & Beuchat (1995), após avaliar a aplicação de 0,5% de ácido láctico e 0,05% de benzoato de sódio em carne de frango, demonstraram a inativação e o controle da multiplicação de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni*; porém, foi verificado menor eficiência para controle de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. A combinação desses sanitizantes também permitiu um retardamento na multiplicação de psicrotróficos à 4 °C.

No estudo realizado por Greer & Dilts (1995), a aplicação da solução de ácido láctico à 3% em carne suína teve ação bactericida e também bacteriostática sobre microorganismos deteriorantes (*Pseudomonas fragi* e *Brochotrrix thermosphacta*) e

patogênicos (*L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila*) que eram inoculados na carne. Reduções significativas das contagens bacterianas foram verificadas logo após a aplicação do ácido e também a estabilização das contagens após diferentes dias de estocagem da carne (até 15 dias à 4 °C). Na mesma pesquisa, os experimentos foram feitos com dois tipos de carne suína, um contendo tecido gorduroso e o outro não: verificou-se que na carne com gordura o ácido teve maior ação bactericida, permitindo maiores reduções das contagens bacterianas quando comparado à carne sem gordura. Uma das razões para a obtenção desses resultados foi a redução do pH em carne promovida pela gordura presente. Meios com pHs baixos permitem uma menor dissociação do ácido aplicado, fazendo com que maiores concentrações da porção não-dissociada do ácido láctico estejam disponíveis no meio, porção que é justamente a responsável pelo efeito antimicrobiano (Greer & Dilts, 1995).

Pipek et al. (2005) avaliaram a combinação de dois tratamentos (vaporização e aspersão de ácido láctico à 2%) aplicados em carcaças bovinas ao final da linha de abate, e observaram que as contagens de micro-organismos psicrótróficos e mesófilos após o tratamento reduziu entre 1 e 3 logs de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após 5 dias de estocagem em baixas temperaturas.

Após comparar a efetividade dos métodos (aspersão versus imersão) utilizando água ou ácido láctico à 4,4% na redução de patógenos inoculados em carne bovina, Wolf et al. (2012) demonstraram que a imersão em ácido láctico promoveu reduções significativas das populações de *E. coli* O157:H7 (0,91 a 1,41 log), *E. coli* shiga toxigênica – STEC (0,48 a 0,82 log) e *Salmonella* spp. (0,51 a 0,81 log). Nenhum outro tratamento promoveu reduções significativas nas contagens bacterianas.

4. Tolerância ácida de *Salmonella* spp.

A tolerância ácida é uma característica encontrada em determinados microorganismos, e é um fator que permite sua sobrevivência durante o estresse ácido, condição encontrada, por exemplo, nos alimentos. Mas também é uma característica importante aos patógenos de origem alimentar que precisam sobreviver às condições ácidas presentes no estômago do homem (Lues & Theron, 2011). Estas respostas adaptativas ocorrem em vários sorotipos de *S. enterica*, como por exemplo, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis*, *S. Gaminara*, *S. Heidelberg*, *S. Javiana*, *S. Mbandaka*, *S. Michigan*, *S. Montevideo*, *S. Poona*, *S. Leitura*, *S. Saintpaul*, *S. Senftenberg*, e *S. Typhi* (Álvarez-Ordóñez et al., 2011).

Desde a década de 1990 numerosos estudos têm surgido descrevendo a relação dos mecanismos de tolerância ácida de *Salmonella* spp. com outros fatores, como a fase de multiplicação da bactéria (fase exponencial ou estacionária), temperatura, modo de acidificação (ácidos orgânicos ou inorgânicos), constituintes do meio e virulência (Álvarez-Ordóñez et al., 2011). Acredita-se que determinados genes que participam do mecanismo de tolerância ácida estejam envolvidos na regulação de genes encontrados nos plasmídeos de virulência (spv) presentes em *Salmonella* spp. Estes genes de virulência influenciam as taxas de multiplicação da bactéria no interior de células hospedeiras, durante infecções sistêmicas (Chen et al., 1995; El-Gedaily et al., 1997; Fang et al., 1992; Heiskanen et al., 1994).

Além disso, outro fator importante é que o estresse ácido pode proporcionar proteção cruzada contra outros desafios ambientais que a bactéria encontrar. Ao expor as células que estão em fase de multiplicação (exponencial) à um estresse ácido, estas podem proporcionar uma proteção contra outros tipos de danos, tais como estresse oxidativo, calor, osmolaridade e danos ao DNA. Entretanto, sabe-se que resposta

recíproca de proteção cruzada não ocorre, ou seja, o estresse oxidativo não induz tolerância ácida (Audia et al., 2001).

Apesar dos esforços significativos feitos recentemente para caracterizar a tolerância ácida e relacioná-la à fatores ambientais ou intrínsecos das bactérias, ainda encontra-se na literatura resultados bastante contraditórios. Neste sentido, mais estudos devem ser realizados para se obter uma visão completa dos parâmetros críticos que estão envolvidos na indução de uma tolerância ácida (Álvarez-Ordóñez et al., 2011).

4.1. Mecanismos moleculares envolvidos na tolerância ácida de *Salmonella* spp.

Como foi descrito anteriormente, o desenvolvimento da tolerância ácida pode ser influenciada pelo estágio de multiplicação da bactéria. Dependendo do estágio em que o micro-organismo se encontra (exponencial ou estacionária), diferentes sistemas de adaptação a estas condições poderão ser ativados no momento em que houver um estresse ácido.

Na fase de multiplicação bacteriana (fase exponencial), a tolerância ácida será ativada quando o pH do meio for moderado (4,5-5,8): as células normalmente se multiplicam ativamente a um pH neutro (7,0-7,7), porém podem morrer rapidamente quando encontrarem uma condição com pH abaixo de 4. Para que os micro-organismos possam sobreviver, é preciso então se adaptarem primeiro à um pH mediano, de 5,8 por um período de 30 a 60 min. A partir desta adaptação a próxima geração bacteriana apresentará uma maior tolerância ácida a pHs extremos (3,0) (Foster & Hall, 1990). Neste caso, o sistema que atua e permite que células adaptadas à pHs moderados sobrevivam a pHs mais baixos, é conhecido como Homeostase de Emergência, e é ativado através da descarboxilação de lisina ou arginina (Álvarez-Ordóñez et al., 2011; Foster, 2000). A descarboxilação da lisina é composta por um regulador de transcrição

do operon CadBA (CadC), uma enzima de descarboxilação da lisina (CadA) e um transportador de membrana lisina-cadaverina (CadB) (Foster, 2000). No momento em que as condições externas apresentarem um pH reduzido, a lisina (CadC) atuará como um sensor e também como regulador da transcrição do operon CadBA. Após esta indução, a enzima CadA promoverá a descarboxilação da lisina convertendo-a em cadaverina, com o consumo de 1 próton que resultará no aumento do pH interno da célula. Através do transportador de membrana CadB, a cadaverina será então transportada para o meio extracelular (Figura 1) (Álvarez-Ordóñez et al., 2011; Foster, 2000).

Outro sistema semelhante descrito é o da arginina, que sofre descarboxilação pela enzima AdiA e perde um próton, com conseqüente aumento do pH celular interno. Agmatina é então transportada para o meio externo através do transportador AdiC (Figura 1) (Álvarez-Ordóñez et al., 2011).

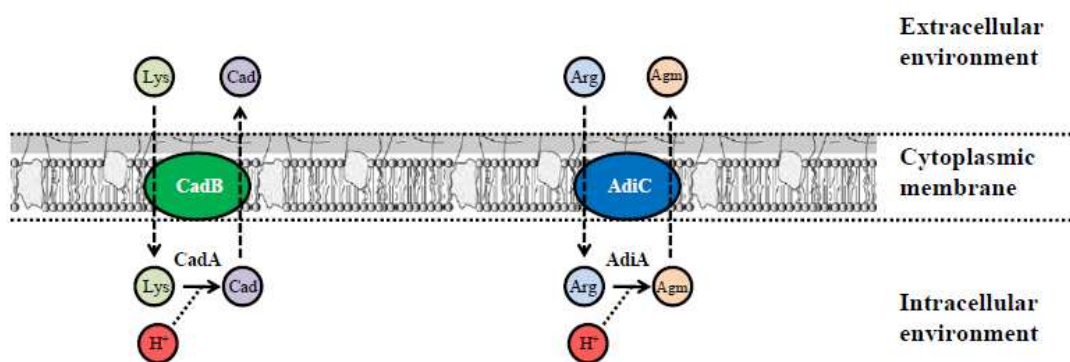


Figura 1. Esquema de uma membrana celular de *Salmonella* spp. contendo os dois sistemas de descarboxilase dos aminoácidos Lisina e Arginina. Fonte: Álvarez-Ordóñez et al. (2011).

No entanto, apenas a atuação da Homeostase de Emergência não é suficiente para promover uma efetiva tolerância ácida. São necessários que outros sistemas atuem ainda na fase exponencial da bactéria. Nesta situação também conhecida como “pós-choque”, dois grupos serão ativados: Fator Sigma Independente e Fator Sigma Dependente, ambos mecanismos responsáveis pela produção de ASPs (acid shock

proteínas) que atuam na proteção da célula contra danos ao estresse ácido (Bearson et al., 1997).

No primeiro grupo, Fator Sigma Independente, estão os componentes regulatórios PhoP/Q e Fur. PhoP/Q confere proteção aos ácidos inorgânicos, aos macrófagos e aos peptídeos antimicrobianos. Além disso, é ativado em condições ambientais com baixas concentrações de Mg^{2+} . Já a proteína Fur está ligada a aquisição de ferro pelas bactérias, mas também está envolvida no controle de ASPs que contribuem para a tolerância à ácidos orgânicos. Porém não se sabe ao certo como a proteína Fur regula esta síntese de ASPs (Audia et al., 2001).

No segundo grupo, Fator Sigma Dependente, está o mecanismo conhecido como fator sigma alternativo RpoS, o qual é essencial para permitir a sobrevivência de *Salmonella* spp. sob condições de estresse ácido que poderão ser encontradas no meio durante a fase exponencial (Hengge-Aronis, 2002).

Na fase estacionária da bactéria a tolerância ácida poderá ser ativada por dois sistemas distintos. No momento em que a célula bacteriana encontrar condições de estresse ácido, o sistema controlado por uma proteína chamada OmpR poderá atuar. Esta proteína será ativada quando passar para seu estado fosforilado, capaz então de induzir a expressão de vários genes necessários para promover a resposta adaptativa. Apesar de se conhecer bem a importância dessa proteína na resistência de *Salmonella* spp. ao estresse ácido, os mecanismos que a OmpR utiliza para regular a expressão dos genes envolvidos na tolerância ácida não estão esclarecidos (Bang et al., 2000).

Outro sistema importante que estará presente nesta fase do desenvolvimento bacteriano é o fator sigma alternativo RpoS. Como foi descrito anteriormente, este mecanismo também exercerá sua função nas condições ácidas encontradas já na fase exponencial da bactéria. Esse fator é regulado de uma forma bastante complexa, e por esse motivo será descrito com mais detalhes no próximo item.

4.2. Regulação do fator sigma alternativo RpoS.

Muitas bactérias se adaptam às mudanças do meio através da utilização de fatores sigmas alternativos. Durante a fase exponencial e na transição para a fase estacionária de *Salmonella* spp., o fator sigma alternativo RpoS, também conhecido por σ^s ou σ^{38} , é codificado pelo gene *rpoS*. Trata-se de uma proteína capaz de ligar a molécula de RNA polimerase à promotores de genes envolvidos em várias condições de estresse, incluindo pH ácido. A partir desta ligação inicia-se a transcrição de RNA mensageiros, capazes de traduzir proteínas responsáveis por proteger a célula bacteriana contra os danos provocados pelo estresse (Lues & Theron, 2011).

O σ^s começa a ser produzido já na fase de multiplicação exponencial da bactéria. Nesta fase, porém, as concentrações de σ^s são mais baixas pelo fato de ser rapidamente degradado (tempo de meia vida < 3 min). Quando a célula entra na fase estacionária, ou então encontra uma condição ácida, a meia vida do σ^s aumenta para mais de 30 min. Este aumento da estabilidade do fator sigma promove sua acumulação e então permite a expressão de genes dependentes do σ^s (Bearson et al., 1996; Moreno et al., 2000).

A degradação do σ^s ocorre pela atuação de uma protease ClpXP e de uma proteína MviA. Já foi claramente demonstrado que a proteína MviA exibe dois tipos de interações, uma com o σ^s e uma com a subunidade ATPase da protease (a porção ClpX). A interação da porção C-terminal da proteína MviA permite a ligação com o σ^s , já a porção N-terminal permite a ligação com a protease ClpX. Assim, acredita-se que a proteína MviA apresenta o σ^s à ClpX, possibilitando a formação de uma ponte entre as duas proteínas (Foster, 2001).

No momento em que houver estresse ácido, o fator sigma não é mais degradado e por isso acumula-se na célula. Não se sabe ao certo como a presença do ácido impede esta degradação, porém acredita-se que o ácido possa influenciar na fosforilação das porções amino terminais da proteína MviA impedindo sua interação com ClpX e σ^S (Figura 2) (Foster, 2001)

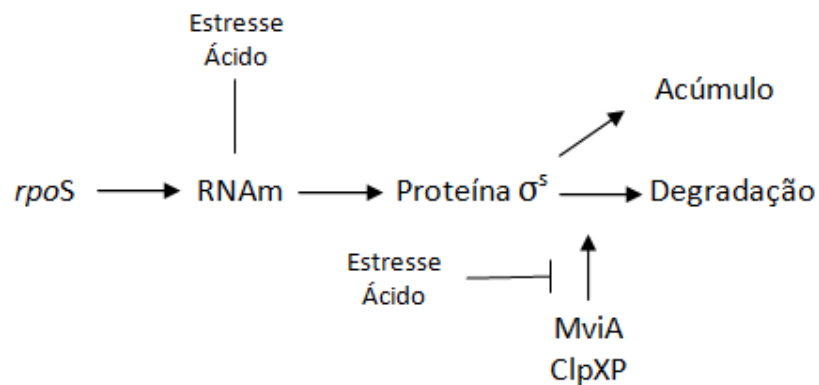


Figura 2. Aspectos da regulação do *rpoS* na presença de estresse ácido. Durante o estresse ácido a transcrição do gene *rpoS* é ativada e a degradação do σ^S é inibida, permitindo seu acúmulo.

Fonte: Modificado de Foster (2001).

Na Figura 3 também é possível observar como as diferentes condições de estresse influenciam a regulação do σ^S . A alta densidade celular, baixas temperaturas, alta osmolaridade e baixo pH estimulam a tradução do RNA mensageiro em proteína (σ^S). Além disso, a degradação do fator sigma alternativo pode ser impedida quando as condições de altas temperaturas, carência de carbono no meio e baixo pH estiverem presentes.

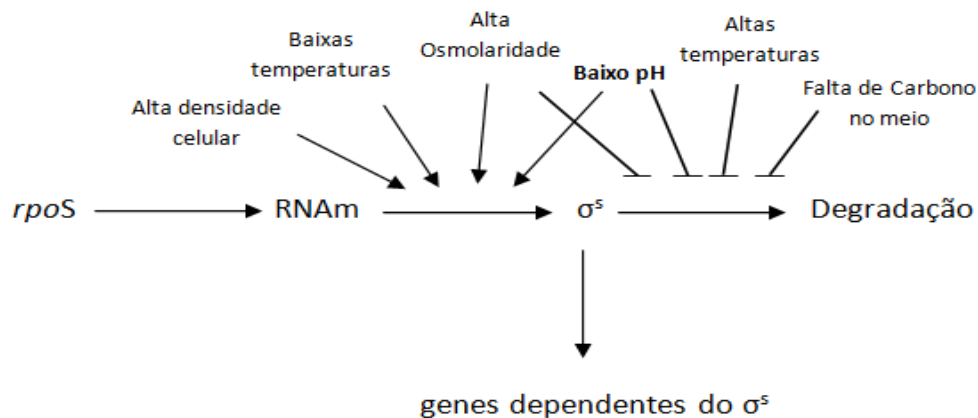


Figura 3. A influência de diversas condições de estresse na regulação do σ^5 .

Fonte: Modificado de Hengge-Aronis (2002).

4.3. Características Moleculares do gene *rpoS*.

Estudos revelam que o RNA mensageiro que origina o σ^5 é policistrônico, ou seja, traduz uma mensagem com informações de mais de um gene, neste caso o *rpoS* e o *nlpD*. Caso deleções sejam feitas na região dos promotores *nlpD*, uma redução de até 40% na expressão de *rpoS* poderá ser observada durante a fase exponencial de multiplicação bacteriana. Isto indica que uma fração substancial de pequenos níveis de σ^5 são sintetizados pela porção policistrônica do RNAm que compreende a porção *nlpD*. (Hengge-Aronis, 2002; Lange et al., 1995; Paesold & Krause, 1999).

5. Referências

Adams, M. & Hall, C., 1988. Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology* 23:287-292.

- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., & López, M., 2010. Acid Tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology* 27:44-49.
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & López, M., 2011. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International* 45:482-492.
- Anang, D.M., Rusul, G., Bakar, J., & Ling, F.H., 2007. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. *Food Control* 18:961-969.
- Audia, J.P., Webb, C.C., & Foster, J.W., 2001. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* 291:97-106.
- Bang, I.S., Kim, B.H., Foster, J.W., & Park, Y.K., 2000. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal Bacteriology* 182:2245-2252.
- Bearson, S., Bearson, B., & Foster, J.W., 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 147:173-180.
- Bearson, S.M., Benjamin, W.H., Swords, W.E., & Foster, J.W., 1996. Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella* Typhimurium. *Journal Bacteriology* 178:2572-2579.
- Blackburn, C.W., Curtis, L.M., Humpheson, L., Billon, C., & McClure, P.J., 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal Food Microbiology* 38:31-44.

- Bonesi, G.L. & Santana, E.H.W., 2008. Fatores Tecnológicos e Pontos Críticos de Controle de Contaminação em Carcaças Bovinas no Matadouro. UNOPAR, Ciência, Biologia e Saúde 10:39-46.
- Brasil, 2007. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Inspeção de Carnes Bovinas – Padronização de Técnicas, Instalações e Equipamentos.
- Brasil, 2010a. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio – Brasil 2009/2010 a 2019/2020.45.
- Brasil, 2010b. Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica, Alimentar e Sexual. 2010. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Brasil, 2012a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>, 15,11,2012.
- Brasil, 2012b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio 2011/12 a 2021/22, Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOE_S-web.pdf, 15,11,2012.
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D.A., Urlings, H.A., Lipman, L.J., & van Knapen, F., 2002. In vitro study on the effect of organic acids on Campylobacter jejuni / coli populations in mixtures of water and feed. Poultry Science 81:621-628.
- Chen, C.Y., Buchmeier, N.A., Libby, S., Fang, F.C., Krause, M., & Guiney, D.G., 1995. Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of Salmonella Dublin plasmid virulence genes. Journal Bacteriology 177:5303-5309.

- Chikthimmah, N., LaBorde, L.E., & Beelman, R.B., 2003. Critical factors affecting the destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider treated with fumaric acid and sodium benzoate. *Journal of Food Science* 68:1438-1442.
- Cliver, D.O., Potter, M., & Riemann, H.P., 2006. *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press.
- Coburn, B., Grassl, G.A., & Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology* 85:112-118.
- Currier, M., Singleton, M., Lee, J., & Lee, D.R., 1986. *Salmonella* in Swine at Slaughter - Incidence and serovar distribution at different seasons. *Journal of Food Protection* 49:366-368.
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., & Capita, R., 2007. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal Food Microbiology* 115:268-280.
- Delmore, L.R.G., Sofos, J.N., Schmidt, G.R., & Smith, G.C., 1998. Decontamination of inoculated beef with sequential spraying treatments. *Journal of Food Science* 63:890-893.
- Dorsa, W.J., Cutter, C.N., & Siragusa, G.R., 1997. Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua*, and *Clostridium sporogenes*. *Journal of Food Protection* 60:619-624.
- Doyle, M.P., 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal Food Microbiology* 12:289-301.

- Dubal, Z.B., Paturkar, A.M., Waskar, V.S., Zende, R.J., Latha, C., Rawool, D.B., & Kadam, M.M., 2004. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science* 66:817-821.
- El-Gedaily, A., Paesold, G., Chen, C.Y., Guiney, D.G., & Krause, M., 1997. Plasmid virulence gene expression induced by short-chain fatty acids in *Salmonella* Dublin: identification of *rpoS*-dependent and *rpoS*-independent mechanisms. *Journal Bacteriology* 179:1409-1412.
- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J., & Guiney, D.G., 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 89:11978-11982.
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. How to Feed the World in 2050. , Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How to Feed the World in 2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf), 15,11,2012.
- Foster, J.W., 2000. Microbial responses to acid stress, p. 99-115, *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, DC.
- Foster, J.W., 2001. Acid Stress Responses of *Salmonella* and *E. coli* : Survival Mechanisms, Regulation, and Implications for Pathogenesis. *The Journal of Microbiology* 39:89-94.
- Foster, J.W. & Hall, H.K., 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. *Journal Bacteriology* 172:771-778.
- França, M.J., 2008. Uso de formiato de sódio e potássio em rações para frangos. Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências Agrárias. UFPR.

- Goddard, B.L., Mikel, W.B., & Conner, D.E., 1996. Use of organic acids to improve the chemical, physical and microbial attributes of beef strip loins stored at -1°C for 112 days. *Journal of Food Protection*:849-853.
- Gomis, D.B., 1992. HPLC analysis of organic acids, p. 371–385, *Food Science and Technology*. Marcel Dekker, New York.
- Greer, G.G. & Dilts, B.D., 1995. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *International Journal Food Microbiology* 25:141-151.
- Heiskanen, P., Taira, S., & Rhen, M., 1994. Role of rpoS in the regulation of *Salmonella* plasmid virulence (spv) genes. *FEMS Microbiology Letters* 123:125-130.
- Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D.M., Jensen, A.B., Wegener, H.C., & Aarestrup, F.M., 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:887-900.
- Hengge-Aronis, R., 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 66:373-395, table of contents.
- Huffman, R.D., 2002. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science* 62:285-294.
- Hwang, C.A. & Beuchat, L.R., 1995. Efficacy of a lactic acid/sodium benzoate wash solution in reducing bacterial contamination of raw chicken. *International Journal Food Microbiology* 27:91-98.

- IFT, 2002. Institute of Food Technologists. Expert report on emerging microbiological food safety issues implications for control in the 21st century. Chicago, Ill, January, .
- Jung, Y.S. & Beuchat, L.R., 2000. Sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 to organic acids and thermal inactivation in liquid egg products. *Food Microbiology* 17:63-71.
- Kotula, K.L. & Kotula, A.W., 2000. Microbial ecology of different types of food-fresh red meats. *The microbiological safety and quality of food*, Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, MD:359-388.
- Lange, R., Fischer, D., & Hengge-Aronis, R., 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology* 177:4676-4680.
- Lues, J.F. & Theron, M.M., 2011. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. *Foodborne Pathogens Diseases* 9:1126-1129.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., & Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infections Diseases* 50:882-889.
- Moreno, M., Audia, J.P., Bearson, S.M., Webb, C., & Foster, J.W., 2000. Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* Typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA(RssB) and ClpX. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2:245-254.
- Paesold, G. & Krause, M., 1999. Analysis of rpoS mRNA in *Salmonella* Dublin: identification of multiple transcripts with growth-phase-dependent variation in transcript stability. *Journal Bacteriology* 181:1264-1268.

- Pardi, M.C., dos Santos, I.F., de Souza, E.R., & Pardi, H.S., 2001. Ciência, higiene e tecnologia da carne. CEGRAF-UFG: EDUFF, Niterói.
- Pipek, P., Houška, M., Jeleníková, J., Kýhos, K., Hoke, K., & Šikulová, M., 2005. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. *Journal of Food Engineering* 67:309-315.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, N., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., & Son, R., 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 18.
- Silva, J.A., Soa, L.F., & Costa, E.L., 2001. Sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos e comerciais e suco de limão. *Tecnologia de Carnes*:19-26.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwak, M.H., Santos, R.F.S., & Gomes, R.A.R., 2010. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. Varela, São Paulo.
- Smulders, F.J. & Greer, G.G., 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal Food Microbiology* 44:149-169.
- Smulders, F.J.M. & Woolthuis, C.H.J., 1985. Immediate and delayed microbiological effects of lactic acid decontamination of calf carcasses: influence on conventionally boned versus hot-boned and vacuum-packaged cuts. *Journal of Food Protection*.
- Tamblyn, K.C. & Conner, D.E., 1997. Bactericidal activity of organic acids in combination with transdermal compounds against *Salmonella Typhimurium* attached to broiler skin. *Food Microbiology* 14:477-484.

- Tinney, K.S., Miller, M.F., Ramsey, C.B., Thompson, L.D., & Carr, M.A., 1997. Reduction of microorganisms on beef surfaces with electricity and acetic acid. *Journal of Food Protection* 60:625-628.
- USDA., 2008. United States Department of Agriculture. Answers: What is the maximum amount of organic acid(s) permitted to be applied to livestock carcasses pre-chill without having to declare the organic acid(s) on the label? , Disponível em: http://askfsis.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/950/related/1/session/L2F2LzEvdGltZS8xMzUzNTAzMDkyL3NpZC9MRzR1aVFibA%3D%3D, 21,11,2012.
- USDA., 2012. United States Department of Agriculture. Guidelines for submitting requests for acetic and citric acid sprays to the CFIA for meat products for export from the United States to Canada, Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/fo/export/gu_acid.htm, 21,11,2012.
- Wolf, M.J., Miller, M.F., Parks, A.R., Loneragan, G.H., Garmyn, A.J., Thompson, L.D., Echeverry, A., & Brashears, M.M., 2012. Validation comparing the effectiveness of a lactic acid dip with a lactic acid spray for reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef trim and ground beef. *Journal of Food Protection* 75:1968-1973.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo da presente pesquisa foi demonstrar o comportamento de *Salmonella* spp. em diferentes situações de estresse ácido, determinadas por ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as variações das populações de *Salmonella* spp. em diferentes condições de estresse ácido, simuladas em caldo com ácido láctico e ácido acético
- ✓ Mensurar a expressão de genes relacionados a tolerância em estresse ácido: *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA*
- ✓ Associar as variações na expressão dos genes relacionados à tolerância em estresse ácido com as populações de *Salmonella* spp. nas condições avaliadas.

Artigo a ser submetido a publicação

Interferência de ácidos orgânicos sobre a multiplicação de *Salmonella* spp. e expressão de genes envolvidos na tolerância ácida.

Resumo

Em condições de estresse ácido, micro-organismos do gênero *Salmonella* spp. utilizam como estratégia de sobrevivência um complexo mecanismo de tolerância que envolve os genes *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA*. O presente estudo tem como objetivo associar as variações na expressão desses genes com as populações de *Salmonella* spp. durante estresse ácido, condição que pode ser encontrada pela aspersão de ácidos orgânicos em carcaças bovinas para descontaminação microbiológica. Três cepas de *Salmonella* spp. dos sorotipos Derby, Typhimurium e Meleagridis foram semeadas em caldo extrato de carne com pH (4,0, 5,0, e 6,0), ajustados com ácido láctico e ácido acético, e incubados por 6, 12, 24 e 48 h a 37 °C. As populações bacterianas foram monitoradas por plaqueamento direto, e a expressão dos genes por qPCR. Os resultados revelam que *Salmonella* spp. pode se adaptar aos ácidos testados (acético e láctico), principalmente quando estão em pH 5,0 ou 6,0, com expressão evidente do gene *rpoS*. Em pH 4,0, houve redução completa das populações de *Salmonella* spp. após 6 ou 24 h de incubação. A capacidade de adaptação de *Salmonella* spp. em pH 5,0 e 6,0, ressalta a importância de um monitoramento adequado da redução de pH durante aspersão de ácidos orgânicos em carcaças bovinas. É importante que ocorra um equilíbrio entre a aplicação de ácidos orgânicos em concentrações que garantam o controle de *Salmonella* spp. e de outros micro-organismos, e a ausência de efeitos negativos sobre qualidade sensorial dos produtos cárneos, assim como descoloração e exsudação. Os dados obtidos neste estudo podem ser complementados com o desenvolvimento de pesquisas envolvendo sistemas cárneos para demonstração desse comportamento.

Palavras-chaves: *Salmonella* spp., tolerância ácida, ácido láctico, ácido acético, qPCR.

Abstract

Under acid stress conditions, *Salmonella* spp. has as a complex mechanism of tolerance that involves the genes *rpoS*, *nlpD*, *clpX*, *clpP*, and *mviA*. The aim of the present study is to associate the variations in the genes expression and the populations of *Salmonella* spp. under acid stress condition, a situation usually found during the microbiological decontamination of bovine carcasses using organic acid spraying. Three strains of *Salmonella* serovar Derby, Typhimurium and Meleagridis were inoculated in meat extract broth added lactic acid or acetic acid at final pHs 4.0, 5.0, 6.0, and incubated for 6, 12, 24 and 48 h at 37 ° C. Bacterial populations were monitored by direct plating, and the genes expression by qPCR. The results show that *Salmonella* spp. can adapt to the tested acids (acetic and lactic), especially at pH 5.0 and 6.0, with evident expression of the *rpoS* gene. At pH 4.0, there was a complete reduction of the *Salmonella* spp. populations after 6 or 24 h of incubation. The adaptability of *Salmonella* spp. at pH 5.0 and 6.0, emphasizes the importance of adequate monitoring of pH reduction during organic acids spraying in bovine carcasses. The ideal concentration of organic acids for the application in meat products depends in the balance between the pathogen contamination reduction and the absence of negative effects under sensorial quality. The data obtained in this study can be complemented with research involving meat systems to demonstrate this behavior.

Keywords: *Salmonella* spp., acid tolerance, lactic acid, acetic acid, qPCR.

1. Introdução

A sanitização de carcaças bovinas com aspersão de ácidos orgânicos tem sido rotineiramente utilizada por abatedouros e frigoríficos nos Estados Unidos e Canadá, visando minimizar riscos de contaminação por micro-organismos patogênicos e deteriorantes (Adams & Hall, 1988; Delmore et al., 1998; Goddard et al., 1996). Entretanto, a utilização dessas substâncias pode mascarar possíveis falhas, ou mesmo ausência de procedimentos higiênicos adequados, apontadas como razões que impedem a sua utilização em países da União Europeia e no Brasil (Del Río et al., 2007).

Os principais ácidos orgânicos utilizados como sanitizantes de carcaças são os ácidos láctico, acético e cítrico. Suas concentrações durante a aplicação podem variar de 1 à 5% dependendo do ácido ou da etapa de processamento da carne. Possuem atividade bactericida quando estão na forma não dissociada, comprometendo várias funções metabólicas nos micro-organismos, como interferência na expressão proteica, inibição na produção de ATP, acúmulo de ânions, aumento da pressão osmótica e consequente reduções nas taxas de multiplicação bacteriana (Lues & Theron, 2011).

Para a utilização adequada desses sanitizantes, é necessário o esclarecimento de como os micro-organismos se comportam e quais fatores interferem durante a ação bactericida dos ácidos. Esse conhecimento, por exemplo, permitiria evitar a seleção de micro-organismos resistentes à ácidos orgânicos, o que representaria um importante risco a saúde dos consumidores (Smulders & Greer, 1998). Adicionalmente, seria possível definir as condições ideais de sua utilização, visando o controle de diferentes grupos microbianos.

Patógenos são usualmente os principais alvos de controle pelas indústrias de alimentos e quando estão sob a ação dos ácidos orgânicos podem apresentar comportamentos variáveis (Dubal et al., 2004; Greer & Dilts, 1995; Hwang & Beuchat,

1995; Tinney et al., 1997; Wolf et al., 2012). *Salmonella* spp., um importante patógeno associado a carne bovina, utiliza como estratégia de sobrevivência em estresse ácido, um complexo mecanismo de tolerância que envolve vários genes. Os genes *rpoS* e *nlpD* promovem a expressão de proteínas de choque ácido que protegem a célula bacteriana contra danos provocados pelo estresse, e os genes *clpP*, *clpX* e *mviA* estão envolvidos na regulação dessas proteínas no interior da célula (Foster, 2001; Hengge-Aronis, 2002; Lange et al., 1995; Lues & Theron, 2011; Paesold & Krause, 1999).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as variações em populações de *Salmonella* spp. e expressão de genes relacionados ao estresse ácido em ensaios controlados com ácido lático e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição, visando a demonstração das possíveis interações microbianas que ocorrem nessas condições.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos

Foram utilizados 79 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de diferentes etapas de produção de carne bovina e suína: amostras de campo, ambientes de processamento e produtos finais. Correspondem aos projetos realizados pelas Universidades, Federal do Paraná (UFPR - campus Palotina) e Federal de Viçosa (UFV) (Tabela 1). Todos os isolados foram previamente identificados por reações sorológicas, e mantidos em caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) adicionado de glicerol a 20% (v/v) a -20 °C. Para utilização nos experimentos descritos a seguir, alíquotas das culturas estocadas eram transferidas para TSB (Oxoid), incubadas a 37 °C por 24 h, e as culturas obtidas diluídas até atingir uma turbidez

semelhante a escala 1 de MacFarland (3×10^8 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro - UFC/mL).

Tabela 1. Sorotipos e origens das cepas utilizadas no presente estudo.

Sorotipo	n	Origem
S. Dublin	7	carcaça bovina (7)
S. Derby	16	carcaça bovina (8), amostra de campo-suinocultura (6), carcaça suína (1), fezes em abatedouro suíno (1)
S. Agona	1	amostra de campo-suinocultura (1)
S. Typhimurium	28	amostra de campo-suinocultura (20), fezes em abatedouro suíno (4), carcaça suína (3), água residual/lavagem de carcaça suína (1)
S. Mbandaka	7	amostra de campo-suinocultura (5), fezes em abatedouro suíno (2)
S. Give	2	carcaça bovina (2)
S. enterica subs. Salamae	3	carcaça bovina (3)
S. Panama	3	carcaça suína (1), amostra de campo-suinocultura (1), fezes em abatedouro suíno (1)
S. Worthington	1	fezes em abatedouro suíno (1)
S. 4,5, 12:i	9	amostra de campo-suinocultura (5), fezes em abatedouro suíno (1), carcaça suína (3)
S. Infantis	1	carcaça bovina (1)
S. Meleagridis	1	fezes em abatedouro suíno (1)

2.2. Pulsed Field Gel Eletrophoresis - PFGE

A determinação dos perfis genéticos de todas as cepas da coleção de culturas foi realizada por PFGE após restrição com a enzima XbaI. As culturas previamente obtidas foram diluídas para atingirem valores de absorvância de 1,0 ($\lambda = 660$ nm), e 400 μ L foram transferidos para micro-tubos contendo 20 μ L de uma solução de proteinase K (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 400 μ L agarose à 1% (m/v) (Megabase Agarose, Bio-Rad Laboratories), para construção dos plugs. As etapas de lise celular e lavagem dos plugs, seguiram o protocolo da PulseNet, para subtipagem

molecular de *Escherichia coli* O157:H7, sorotipos de *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* (PulseNet, 2013).

Durante a etapa de restrição enzimática, fragmentos dos plugs foram colocados em micro-tubos contendo 5 µL de uma solução com a enzima XbaI (10 U/µL, Promega, Madison, WI, EUA), 20 µL de solução de restrição 10X (Promega) e 175 µL de água estéril. Após incubação à 37°C por 2 h, a separação dos fragmentos oriundos da restrição foi realizada utilizando-se gel de agarose 1% (m/v) (Agarose, LE, Analytical Grade, Promega) em um sistema de eletroforese em campo pulsado (CHEF DR-III, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) à 6 V/cm e ângulo de 120°, durante o período de 19 h. Para verificação das bandas, a coloração do gel foi realizada em banho de GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e a visualização em transiluminador. PulseMarker (50-1.000kb) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) foi incluído em todos os géis como marcador de peso molecular. A análise dos perfis de restrição e a construção do dendrograma foram realizados utilizando o software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Belgium), considerando um coeficiente de Dice em 5% para similaridade.

2.3. Detecção dos genes associados à tolerância ácida

A partir dos dados obtidos no PFGE, 35 perfis genotípicos com grau de similaridade de 98% foram identificados, e em seguida, selecionados para detecção dos genes de tolerância ácida (*rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA*) e do gene housekeeping (*gmK*). A extração de DNA foi conduzida a partir das 35 cepas representantes de cada um dos perfis genéticos identificados por PFGE, utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), segundo as indicações do fabricante.

Os primers utilizados para detecção dos genes *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA*, foram desenhados a partir dos acessos obtidos no banco de dados GenBank, pelo

programa DNAMAN, e a sequência do primer utilizado na detecção do gene gmK foi obtida de um estudo realizado por Botteldoorn et al. (2006). As reações de PCR foram compostas por 12,5 µL de Go Taq Green Master Mix, 2X (Promega), 2,0 µL de DNA, 1,0 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 8,5 µL de água ultra pura e livre de DNA (Promega). As condições da reação de amplificação por PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 1 min; 30 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 min, anelamento em diferentes temperaturas (Tabela 2) por 1 min, e extensão a 72 °C por 2 min; e extensão final a 72 °C por 5 min. A verificação da amplificação dos produtos de PCR, foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1%, Promega) corado com GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) e visualizado em transiluminador. Os tamanhos dos fragmentos obtidos também estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências dos primers obtidas através do número de acesso do genbank ou de estudos prévios, e respectivos produtos de PCR (pb) e Temperatura de Anelamento.

gene alvo	seqüência dos primers	tamanho frag. (pb)	temperatura de anelamento	referência/nº acesso GeneBank
rpoS	F:GGTGAGATTGGGTATTCACC R:TTCTCGACTGCACGGATAAGC	213	50°C	NC_011294
nlpD	F:TATGGCTGGCAGGTTGTACC R:CCCATTTTCCATCTGCACG	237	50°C	NC_011294
clpP	F:GATGGTCATTGAACAGACC R:GTGTCATAGATGGACATCC	226	50,4°C	NC_011294
clpX	F:CAAAAGCCAGCATGAAGTGC R:TAACGACGCCATTGCTGG	275	50,4°C	NC_011294
mviA	F:TGTATTTTCGCTCGCTTCTGG R:TTTCTACCAGTTTGAGACC	165	56,8°C	AM933172.1
gmK	F:TTGGCAGGGAGGCGTTT R:GCGCGAAGTGCCGTAGTAAT	101	52,1°C	Botteldoorn et al, 2006

2.4. Expressão de genes relacionados a tolerância à ácidos orgânicos

Micro-organismos. Considerando os perfis genéticos obtidos por PFGE e a presença de genes relacionados a tolerância ácida, três cepas de *Salmonella* spp. foram selecionadas para realização dos ensaios in vitro: cepa I (*S. Derby*), cepa II (*S. Typhimurium*) e cepa III (*S. Meleagridis*). Cada cepa foi semeada em placas contendo ágar Xilose Lisina

Desoxicolato (XLD, Oxoid), incubadas à 37°C durante 24 horas. Com o auxílio de um swab, as colônias isoladas foram transferidas um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo extrato de carne, preparado conforme descrito por Freney et al. (1999), até atingir uma turbidez semelhante a escala 4 de MacFarland, que corresponde a aproximadamente $1,2 \times 10^9$ UFC/mL.

Tratamentos. Alíquotas de 1 mL de cada uma das culturas foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo extrato de carne (Freney et al., 1999) com valores de pH ajustados para 4,0, 5,0 e 6,0, ajustados com soluções de ácido acético (4%, v/v) ácido láctico (4%, v/v). Como controle, as culturas também eram transferidas para tubos contendo caldo extrato de carne com pH ajustado em 7,0. Ao final foram obtidos sete tratamentos para cada cepa testada. Cada tratamento foi incubado à 37 °C por 48 h, e após 0, 6, 24 e 48 h de incubação, alíquotas das culturas foram retiradas e utilizadas para estimar as populações bacterianas por plaqueamento direto e expressão dos genes relacionados a tolerância ácida por qPCR.

Monitoramento das populações de *Salmonella* spp. Nos intervalos estabelecidos, alíquotas de 1 mL foram retiradas dos tratamentos e submetidas a diluição seriada em escala decimal com NaCl 0.85% (m/v), e semeadas por profundidade em ágar padrão de contagem (Oxoid) com incubação a 37°C por 24 h. As colônias formadas foram enumeradas e os valores expressos em \log_{10} de Unidades Formadoras de Colônias por mL (Log UFC/mL). A partir desses resultados, os cálculos das taxas de multiplicação bacteriana foram obtidos para avaliar em porcentagem o aumento ou a redução das populações quando em contato com os ácidos orgânicos, em função das contagens bacterianas que não receberam tratamento ácido.

Monitoramento da expressão de genes relacionados a tolerância ácida. Nos intervalos estabelecidos, alíquotas de 250 μ L foram retiradas dos tratamentos para extração do RNA total, segundo o protocolo indicado pela Life Technologies (Grand Island, NY, EUA), utilizando-se

uma solução de Trizol (Life). O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, utilizando NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA).

O RNA extraído foi submetido a uma etapa de purificação para a eliminação de DNA presente nas amostras. Em micro tubos estéreis foram adicionados 300 ng do RNA extraído das amostras, 1 µl de Reaction Buffer à 10X (200mM Tris-HCl, pH 8,3, 20mM MgCl₂), 1 µl de DNase I (1U, Sigma-Aldrich) e água livre de nuclease (Promega) até completar o volume de 10 µl. Em seguida os micro-tubos eram colocados em termociclador e permaneciam por 10 min à 37 °C. Após essa etapa, 1 µL de Stop Solution DNase (50 mM de EDTA) foi adicionado por tubo para interromper a reação de purificação do RNA.

Após purificação, 50 µM de primer Random Hexamer (Invitrogen) e 10 mM da mistura de desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen) foram adicionados em cada tubo, e então acondicionados em termociclador durante 5 minutos à 65 °C, e 1 min a 4 °C. Em seguida, 4 µL de First Buffer 5 X (250 mM Tris-HCl – pH8,3; 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2 µL de DTT (Invitrogen) e 1 µL de RNase Out (40 U, Invitrogen) foram adicionados por tubo e incubados a 37 °C por 2 min. Ao final, 1 µl (200U) da enzima transcriptase reversa Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV RT) (Invitrogen) foi adicionada à reação, e os micro tubos foram novamente transferidos para termociclador para uma corrida de 10 min a 25 °C, 50 min a 37 °C, e 15 min a 70 °C. Ao final dessas reações, foi obtido o cDNA de cada tratamento nos diferentes períodos de incubação avaliados.

Através da técnica de Real-Time PCR quantificação relativa (qPCR), as alterações na expressão dos genes *rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX* e *mviA* puderam ser estudadas conforme as diferentes condições ácidas testadas. Para se obter uma quantificação relativa dos mesmos, foi necessário a utilização de um controle endógeno, neste caso o gene *gmK* (Botteldoorn et al., 2006). Para cada gene estudado, foram realizadas reações

em triplicata formadas por 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (2X) (Sigma-Aldrich), 1 µL dos primers relacionados ao gene alvo na concentração final de 2 pMol/µL (Tabela 2), 1 µL do cDNA obtido anteriormente na concentração de aproximadamente 15 ng/µL e água livre de nuclease (Promega) até completar o volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em placas com 48 micro-compartimentos no equipamento Eco Real Time PCR System (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), que foi programado para que as reações passassem por uma etapa de incubação de 2 min a 50 °C, seguida da ativação da polimerase por 10 min a 95 °C, e 40 ciclos nas seguintes condições: 95 °C por 20 s e 60 °C por 1 min. Ao final, uma etapa de dissociação foi realizada (95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 95 °C por 15 s) para a obtenção da curva de Melting, para verificar a especificidade de cada reação. Em cada corrida foram utilizados dois controles negativos, sendo uma reação sem o cDNA e uma reação de cDNA sem a enzima transcriptase reversa (M-MLV RT).

Finalmente, os resultados dos valores médios de curvas *theresfold* (Cts) obtidos por triplicata foram utilizados para calcular a expressão gênica relativa dos genes alvos através do método comparativo utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3. Resultados e Discussão

A análise de similaridade dos perfis genéticos obtidos por PFGE dos 79 isolados de *Salmonella* spp. considerados no presente estudo é apresentada da Figura 1. Por essa análise, foi possível identificar 35 perfis genotípicos distintos considerando um grau de similaridade de 98%, e também perfis de macrorestrição com 6 à 15 fragmentos ou bandas (Figura 1). Adicionalmente, foi possível o agrupamento das cepas em 3 grandes clusters, com taxas de similaridades entre os isolados variando entre 70 e 90% (Figura 1).

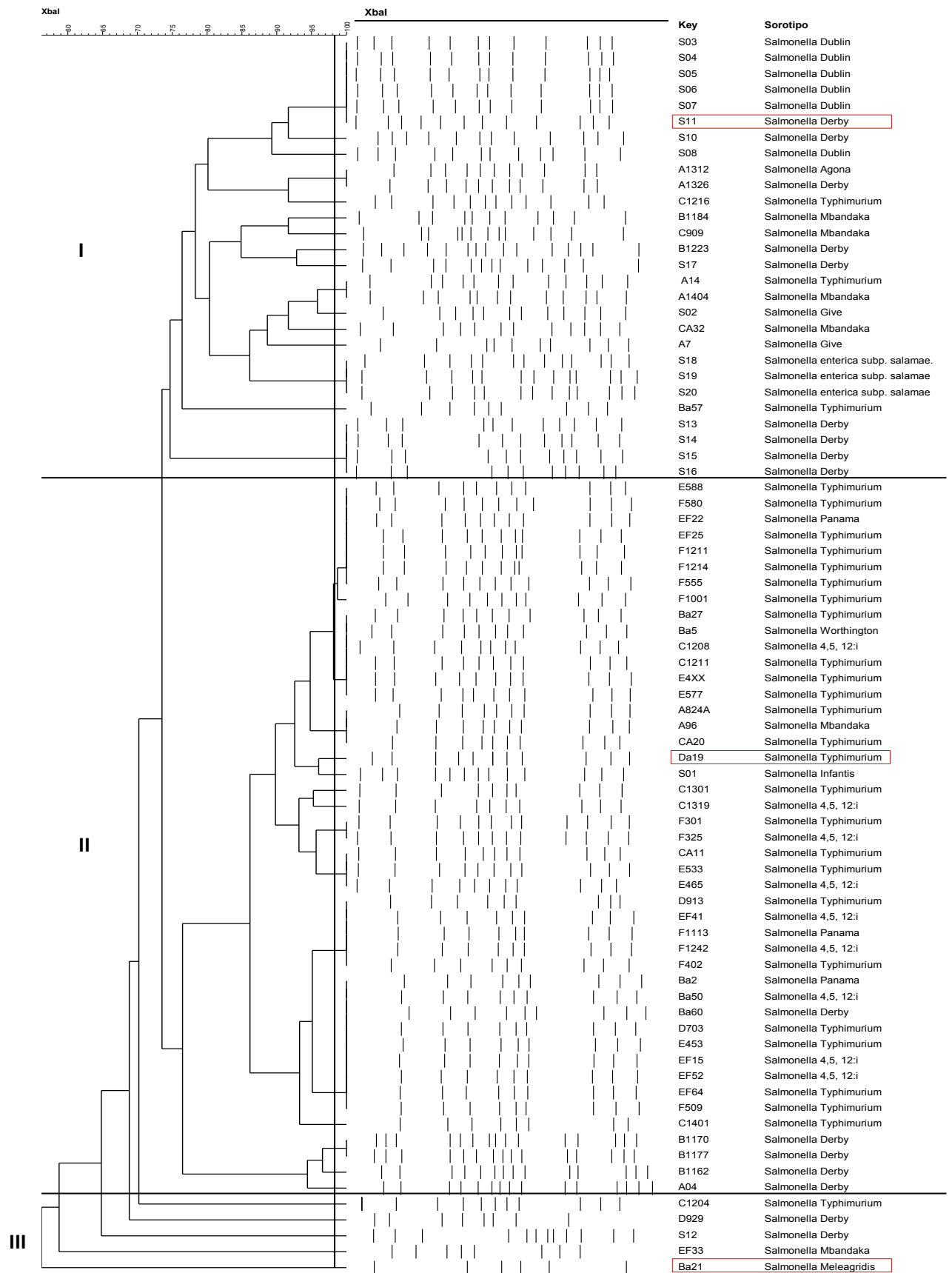


Figura 1. Os perfis genotípicos dos isolados de Salmonella spp. estão agrupados em três principais clusters, sendo que e os isolados destacados em vermelho foram os utilizados nos ensaios in vitro

Considerando esses resultados, uma cepa representativa de cada perfil genético foi selecionada para a pesquisa dos genes relacionados a tolerância ácida (*rpoS*, *nlpD*, *clpP*, *clpX*, *mviA*) e do gene housekeeping (*gmK*) (Figura 1). Todas as 35 cepas selecionadas apresentaram resultado positivo para todos os genes pesquisados (Figura 2), demonstrando que os mesmos estão presentes num conjunto de cepas de *Salmonella* spp. com diferentes perfis genéticos e evidenciando a capacidade desse gênero em desenvolver mecanismos de resistência a ambiente ácido.

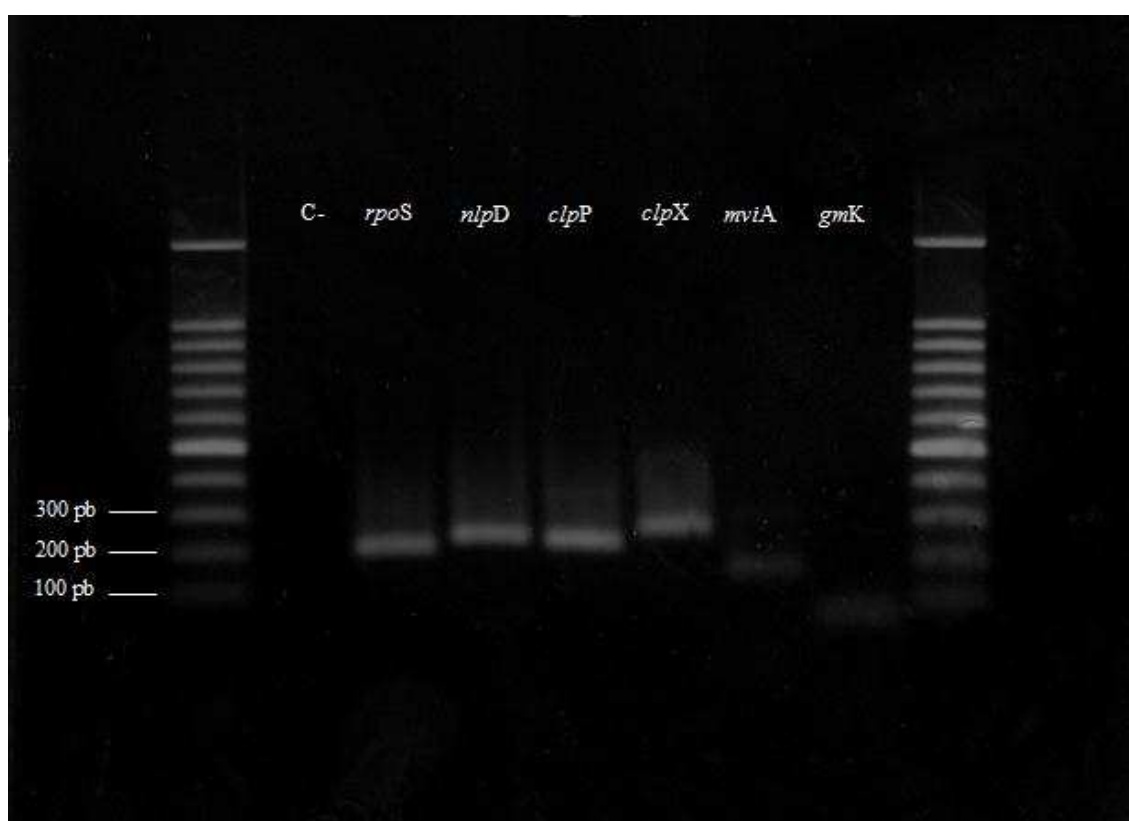


Figura 2. Produtos de PCR dos genes *rpoS* (213pb), *nlpD* (237pb), *clpP* (226pb), *clpX* (275pb), *mviA* (165 pb) e *gmK* (101pb). O controle negativo está identificado como c-.

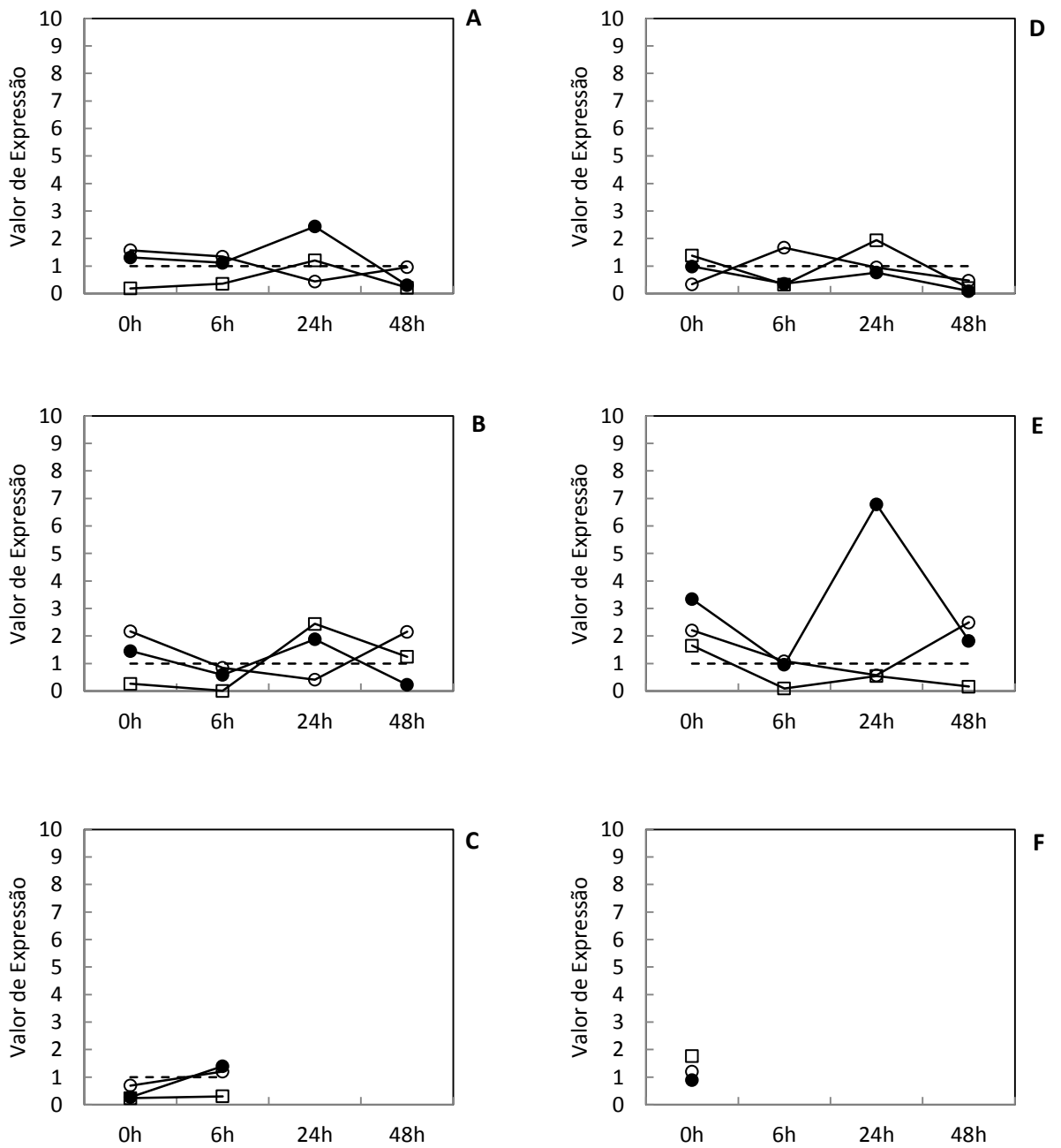


Figura 3. Variações da expressão dos genes relacionados à resistência ácida (*S. Derby* – cepa I) durante os intervalos de análise de 0, 6, 24 e 48 horas. A, B e C: Testes realizados com ácido láctico em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. D, E e F: Testes realizados com ácido acético em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. Gene *rpoS* (-●-), Gene *nlpD* (-○-), Gene *clpP* (-□-), Referência (---).

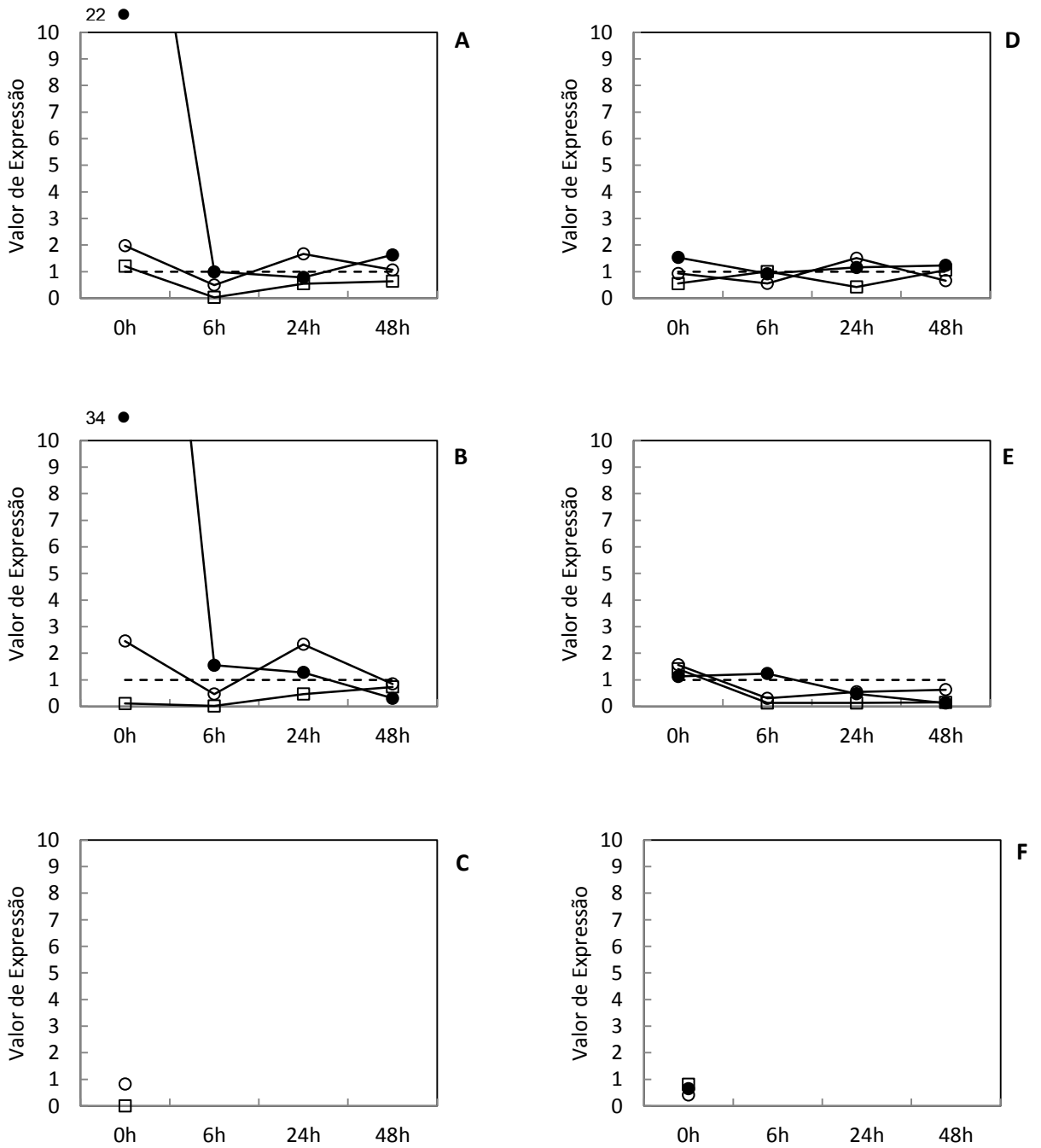


Figura 4. Variações da expressão dos genes relacionados à resistência ácida (*S. Derby* – cepa I) durante os intervalos de análise de 0, 6, 24 e 48 horas. A, B e C: Testes realizados com ácido láctico em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. D, E e F: Testes realizados com ácido acético em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. Gene *rps* (●-), Gene *nlpD* (○-), Gene *clpP* (□-), Referência (---).

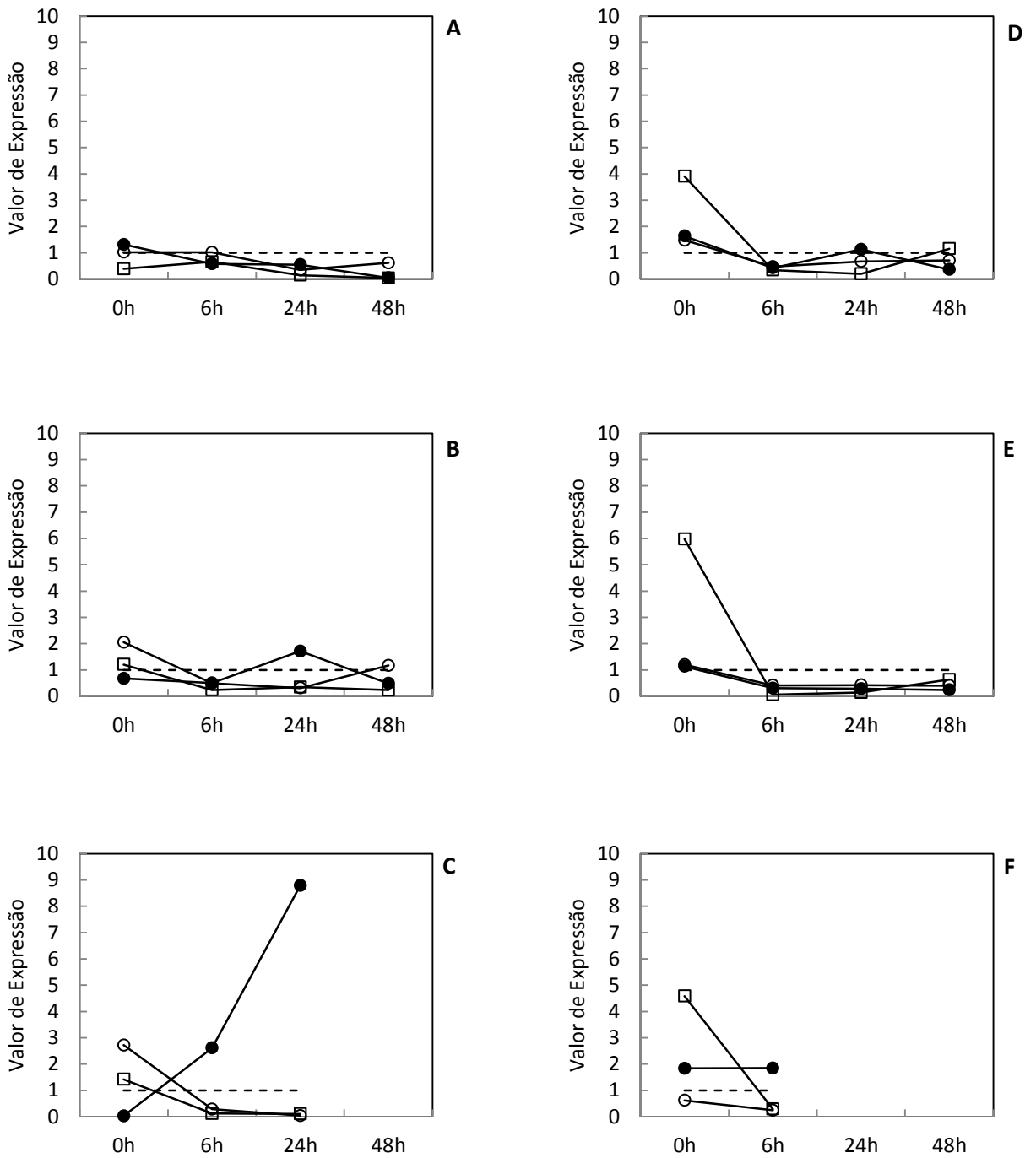


Figura 5. Variações da expressão dos genes relacionados à resistência ácida (*S. Meleagridis* – cepa III) durante os intervalos de análise de 0, 6, 24 e 48 horas. A, B e C: Testes realizados com ácido láctico em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. D, E e F: Testes realizados com ácido acético em pH 6,0, 5,0 e 4,0, respectivamente. Gene rpoS (-●-), Gene nlpD (-○-), Gene clpP (-□-), Referência (---).

Tabela 3. Taxas de multiplicação de *S. Derby* (cepa I) quando em contato com ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.

ácido	pH	Tempo			
		0h	6h	24h	48h
ácido láctico	6.0	0,3%	-5,8%	1,3%	3,8%
	5.0	1,5%	-5,4%	2,3%	0,5%
	4.0	-2,4%	-37,5%	SC	SC
ácido acético	6.0	1,9%	-2,9%	2,0%	1,1%
	5.0	3,5%	-4,8%	-1,3%	-5,0%
	4.0	-3,8%	SC	SC	SC

SC: sem contagem

Tabela 4. Taxas de multiplicação de *S. Typhimurium* (cepa II) quando em contato com ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.

ácido	pH	Tempo			
		0h	6h	24h	48h
ácido láctico	6.0	3,3%	0,0%	-6,9%	3,1%
	5.0	0,7%	8,9%	2,6%	3,1%
	4.0	-2,6%	SC	SC	SC
ácido acético	6.0	0,7%	-2,7%	-6,8%	4,9%
	5.0	0,7%	-6,9%	-8,3%	2,8%
	4.0	-4,3%	SC	SC	SC

SC: sem contagem

Tabela 5. Taxas de multiplicação de *S. Meleagridis* (cepa III) quando em contato com ácido láctico e ácido acético em diferentes pHs e tempos de exposição.

ácido	pH	Tempo			
		0h	6h	24h	48h
ácido láctico	6.0	-1,9%	-1,1%	-2,9%	-0,2%
	5.0	-2,3%	-2,7%	-3,0%	0,6%
	4.0	-1,9%	-38,6%	-76,4%	SC
ácido acético	6.0	-1,8%	-3,9%	2,0%	-0,9%
	5.0	-1,9%	-6,2%	-9,4%	-8,4%
	4.0	-8,9%	-57,0%	SC	SC

SC: sem contagem

As alterações observadas no comportamento das populações de *Salmonella* spp. em contato com ácido láctico ou acético em diferentes pHs (tabelas 3, 4 e 5), podem ser explicadas pela expressão de genes que estão envolvidos no mecanismo de tolerância ácida desta bactéria (figuras 3, 4 e 5). Os três genes pesquisados neste estudo (*rpoS*, *nlpD* e *clpP*) produzem ou regulam proteínas capazes de proteger a bactéria contra danos celulares provocados por estresse (Foster, 2001; Hengge-Aronis, 2002; Lange et al., 1995; Lues & Theron, 2011; Paesold & Krause, 1999). A pesquisa dos genes *mviA* e *clpX* também seria incluída no presente estudo, entretanto não foi possível a padronização de suas reações por qPCR. Usualmente, o gene *mviA* está presente em níveis intracelulares muito baixos, o que pode ter comprometido a padronização para a sua quantificação (Moreno et al., 2000).

Em relação a expressão dos genes relacionados a tolerância ácida, pode ser observado que as cepas de *Salmonella* spp. avaliadas apresentam menor expressão do gene *rpoS* quando em contato com ácido acético (Figuras 3D, 3F, 4D, 4E, 4F, 5D e 5E), e maior expressão do mesmo gene quando em contato com o ácido láctico (exceto figuras 3C, 4C e 5A). Esse comportamento pode explicar a maior eficiência do ácido acético sobre o controle das populações de *Salmonella* spp., Como observado nas tabelas 3, 4 e 5, é possível verificar maiores taxas de redução da população principalmente quando em contato com o ácido acético em pH5,0 ou pH4,0. Adicionalmente, esta eficiência também pode ser explicada pelo fato do ácido acético possuir menor poder de dissociação e conseqüente maior poder bactericida (Lues & Theron, 2011).

Observando individualmente o comportamento de cada cepa na expressão do gene *rpoS*, é possível verificar que a cepa I expressa este gene em três principais momentos: na presença do ácido láctico à um pH 6,0 (Figura 3A), e na presença do ácido láctico e do ácido acético a um pH 5,0 (Figuras 3B e 3E). Este comportamento ocorre nas 24 h de exposição aos ácidos. Quando se avalia a influência desta expressão gênica

sobre as taxas de multiplicação da cepa I, observa-se que a expressão do gene *rpoS* ocorre justamente após o momento em que há uma queda na multiplicação bacteriana (6 h – Tabela 3). Este comportamento indica uma tentativa da população em reagir à condição adversa determinada pela presença dos ácidos orgânicos. Além disso, a expressão deste gene pode ter proporcionado o restabelecimento das taxas de multiplicação bacteriana após o período de 24h, principalmente nas condições determinadas pelo ácido láctico à um pH 6,0 e pH 5,0.

Nos ensaios realizados com a cepa II, a expressão do gene *rpoS* ocorre no primeiro contato da bactéria com o ácido láctico (Figuras 4A e 4B). Pode-se observar que tanto o pH 6,0 quanto o pH 5,0 induzem esta expressão. Após avaliar o comportamento da população bacteriana nestas condições, observa-se que após 6 h de exposição ao ácido láctico à um pH 5,0, a expressão do gene *rpoS* pode ter estimulado a população bacteriana ao promover um aumento em mais de 8% nas taxas de multiplicação (Tabela 2).

A reação da cepa III quanto a expressão do gene *rpoS* foi menos evidente. Verifica-se uma expressão baixa quando a população está sob a ação do ácido láctico ou ácido acético à um pH 6,0 ou pH 5,0 (Figuras 5A, 5B, 5D e 5F). Já no contato da bactéria com o ácido láctico à um pH 4,0, a expressão do gene aumenta até as 24 h de exposição. Esta condição pode ter permitido a sobrevivência da população por mais tempo, uma vez que sua eliminação completa (SC) só ocorre após o período de 24h de exposição ao ácido (Tabela 3), diferente do comportamento observado nas outras cepas, onde à um pH4 as populações foram eliminadas antes, a partir de 6 h de exposição aos ácidos.

As respostas adaptativas de *Salmonella* spp. quando em contato com ácidos orgânicos já foram descritas para diferentes sorotipos (Álvarez-Ordóñez et al., 2011): no presente estudo, os três sorotipos avaliados (*S. Derby*, *S. Typhimurium* e *S. Meleagridis*)

apresentaram este comportamento de tolerância ácida. Os resultados obtidos revelam que *Salmonella* spp. pode se adaptar aos ácidos orgânicos, principalmente quando estão à um pH 6,0 ou pH 5,0. No entanto, quando o pH é inferior (pH 4,0) a sobrevivência desta bactéria torna-se inviável após 6 a 24 h. Essas condições podem ser observadas na prática comercial, uma vez que o pH de uma carcaça bovina que sofre a aspensão de ácidos orgânicos, pode variar entre 3,3 e 5,8. Esta variação vai depender do ácido utilizado, do tempo de aspensão, da concentração e da combinação com outras técnicas de descontaminação (Alvarez-Ordóñez et al., 2009).

Neste caso, a principal preocupação seria em como garantir que as carcaças atinjam um pH ideal para promover a eliminação dos patógenos. Como descrito, as variáveis são muitas, e até que ponto o aumento na concentração do ácido ou no tempo de aspensão poderiam conferir problemas na qualidade sensorial ou resultar em descoloração e/ou exsudação da carne (Smulders & Greer, 1998).

Outro fator limitante no uso dos ácidos orgânicos pela indústria está no tempo de estocagem das carcaças. Durante este período o pH da carne pode aumentar uma vez que o tecido cárneo tem a capacidade de promover um tamponamento do meio (Alvarez-Ordóñez et al., 2009). Como observado nos resultados apresentados pelas Figuras 3C, 3F, 4C, 4F, 5C e 5F, os ácidos quando em pH 4,0 promovem a eliminação completa da população bacteriana somente após 6 ou 24 h. Este tempo poderia ser suficiente para que as proteínas da carne promovessem o aumento do pH do meio, possibilitando dessa forma a adaptação de *Salmonella* spp. no tecido cárneo.

A capacidade de *S. Typhimurium* desenvolver tolerância a ácidos orgânicos aumenta a preocupação quanto à segurança alimentar, uma vez que este sorotipo está entre os mais relatados em surtos e casos de toxinfecção alimentar (Hendriksen et al., 2011). Além disso, a indústria de alimentos utiliza agentes sanitizantes, como os ácidos orgânicos, justamente com o principal objetivo de eliminar patógenos responsáveis por

toxinfeções alimentares. Outra evidência importante, e que pode refletir em problemas na saúde pública, é que determinados genes que participam do mecanismo de tolerância ácida podem estar envolvidos na regulação de genes encontrados nos plasmídeos de virulência (spv) presentes em *Salmonella* spp.. Esses genes podem interferir nas taxas de multiplicação da bactéria no interior de células hospedeiras, durante infecções sistêmicas (Chen et al., 1995; El-Gedaily et al., 1997; Fang et al., 1992; Heiskanen et al., 1994).

Alvarez-Ordóñez et al. (2009), também demonstraram o desenvolvimento de tolerância ácida de *Salmonella* spp. em ensaios realizados *in vitro*. A tolerância foi verificada em ordem decrescente para os ácidos cítrico, acético, láctico, málico, clorídrico e ascórbico. Nesse estudo é ressaltado a ampla utilização dos ácidos cítrico, acético e láctico pela indústria de alimentos, sendo os que mais induzem o desenvolvimento de tolerância ácida por *Salmonella* spp.

Segundo Audia et al. (2001), o mecanismo utilizado por *Salmonella* spp. durante estresse ácido também pode proporcionar proteção cruzada contra outros desafios ambientais que a bactéria encontrar, como estresse oxidativo, calor, osmolaridade e danos ao DNA. Nestas condições a ação de outros sanitizantes utilizados pela indústria de alimentos não teriam a mesma eficiência sobre os microorganismos, como por exemplo, os compostos a base de cloro. Essas substâncias possuem efeito oxidativo e são os principais biocidas utilizados pelo Brasil para desinfecção de equipamentos e utensílios das indústrias de alimentos (Brasil, 2004).

Como descrito previamente, o mecanismo de tolerância ácida em *Salmonella* spp. também envolve o gene *nlpD*. Sua participação ainda não é bem conhecida pelos pesquisadores, porém acredita-se que este gene, juntamente com o *rpoS*, compõe um RNA mensageiro policistrônico (Hengge-Aronis, 2002; Lange et al., 1995; Paesold & Krause, 1999). Como demonstrado nas Figuras 3, 4 e 5, a expressão do *nlpD* está

relacionada à participação do gene *rpoS*: no momento em que há um aumento da expressão do *rpoS*, a expressão do *nlpD* diminui, e o contrário também ocorre (Figuras 3A, 3B, 3D, 3E, 4A, 4B, 4E, 5B, 5C e 5F). Alguns estudos indicam que uma fração substancial do σ^s é produzida pela porção do RNA policistrônico que compreende o gene *nlpD*, sendo que deleções nessa região comprometem a produção em até 40% (Lange et al., 1995; Paesold & Krause, 1999). Nesse sentido, os resultados podem indicar que a participação do *nlpD* na produção das proteínas acontece nos momentos em que o *rpoS* não está atuando.

Na avaliação da expressão do gene *clpP*, é possível identificar comportamentos que não seguem um padrão comum, e por isso torna-se difícil compreender de que forma este gene se comporta no interior da célula bacteriana diante de um estresse ácido. No entanto, o gene *clpP* está envolvido em mecanismos que promovem a degradação do σ^s quando a célula não encontra uma condição de estresse (Foster, 2001). Nos momentos onde houve uma expressão mais pronunciada deste gene (Figuras 3D, 5D, 5E e 5F), o *rpoS* e/ou *nlpD* foram menos expressos. Esta característica pode indicar que a população bacteriana não apresentou um comportamento de tolerância ácida, e por isso não houve a necessidade de acumular σ^s no interior da célula. Conseqüentemente, a ativação do mecanismo de degradação do σ^s pode ter influenciado a maior expressão do gene *clpP*.

Os resultados obtidos demonstraram a capacidade de adaptação de *Salmonella* spp. quando em contato com soluções de ácido láctico e ácido acético em valores de pH entre 5,0 e 6,0, com evidente expressão do gene *rpoS*. Esse comportamento indica que em situações similares, como durante a aspensão de ácidos orgânicos em carcaças bovinas para sanitização, os valores de pH devem ser adequadamente monitorados para evitar o desenvolvimento de tolerância ácida por *Salmonella* spp. eventualmente presente.

5. Referências

- Adams, M. & Hall, C., 1988. Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology* 23:287-292.
- Alvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., & López, M., 2009. Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. *Meat Science* 81:65-70.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., & López, M., 2010. Acid Tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology* 27:44-49.
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & López, M., 2011. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International* 45:482-492.
- Audia, J.P., Webb, C.C., & Foster, J.W., 2001. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* 291:97-106.
- Blackburn, C.W., Curtis, L.M., Humpheson, L., Billon, C., & McClure, P.J., 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal Food Microbiology* 38:31-44.
- Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Grijspeerd, K., Werbrouck, H., Haesebrouck, F., Donne, E., D'Haese, E., Heyndrickx, M., Pasmans, F., & Herman, L., 2006. Real-

- Time reverse transcription PCR for the quantification of the *mntH* expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. *Journal Microbiology Methods* 66:125-135.
- Brasil, 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação de Boas Práticas para Serviços de Alimentação: Resolução. RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004, Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public>, 11,01,2014.
- Chen, C.Y., Buchmeier, N.A., Libby, S., Fang, F.C., Krause, M., & Guiney, D.G., 1995. Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella* Dublin plasmid virulence genes. *Journal Bacteriology* 177:5303-5309.
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., & Capita, R., 2007. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal Food Microbiology* 115:268-280.
- Delmore, L.R.G., Sofos, J.N., Schmidt, G.R., & Smith, G.C., 1998. Decontamination of inoculated beef with sequential spraying treatments. *Journal of Food Science* 63:890-893.
- Dubal, Z.B., Paturkar, A.M., Waskar, V.S., Zende, R.J., Latha, C., Rawool, D.B., & Kadam, M.M., 2004. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science* 66:817-821.
- El-Gedaily, A., Paesold, G., Chen, C.Y., Guiney, D.G., & Krause, M., 1997. Plasmid virulence gene expression induced by short-chain fatty acids in *Salmonella* Dublin: identification of *rpoS*-dependent and *rpoS*-independent mechanisms. *Journal Bacteriology* 179:1409-1412.

- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J., & Guiney, D.G., 1992. The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates Salmonella virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 89:11978-11982.
- Foster, J.W., 2001. Acid Stress Responses of Salmonella and E. coli : Survival Mechanisms, Regulation, and Implications for Pathogenesis. *The Journal of Microbiology* 39:89-94.
- Freney, J., Kloos, W.E., Hajek, V., Webster, J.A., Bes, M., Brun, Y., & Vernozy-Rozand, C., 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 2:489-502.
- Goddard, B.L., Mikel, W.B., & Conner, D.E., 1996. Use of organic acids to improve the chemical, physical and microbial attributes of beef strip loins stored at -1°C for 112 days. *Journal of Food Protection*:849-853.
- Greer, G.G. & Dilts, B.D., 1995. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *International Journal Food Microbiology* 25:141-151.
- Heiskanen, P., Taira, S., & Rhen, M., 1994. Role of rpoS in the regulation of Salmonella plasmid virulence (spv) genes. *FEMS Microbiology Letters* 123:125-130.
- Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlslose, S., Lo Fo Wong, D.M., Jensen, A.B., Wegener, H.C., & Aarestrup, F.M., 2011. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:887-900.

- Hengge-Aronis, R., 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 66:373-395, table of contents.
- Hwang, C.A. & Beuchat, L.R., 1995. Efficacy of a lactic acid/sodium benzoate wash solution in reducing bacterial contamination of raw chicken. *International Journal Food Microbiology* 27:91-98.
- Lange, R., Fischer, D., & Hengge-Aronis, R., 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology* 177:4676-4680.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408.
- Lues, J.F. & Theron, M.M., 2011. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. *Foodborne Pathogens Diseases* 9:1126-1129.
- Moreno, M., Audia, J.P., Bearson, S.M., Webb, C., & Foster, J.W., 2000. Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* Typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA(RssB) and ClpX. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2:245-254.
- Paesold, G. & Krause, M., 1999. Analysis of rpoS mRNA in *Salmonella* Dublin: identification of multiple transcripts with growth-phase-dependent variation in transcript stability. *Journal Bacteriology* 181:1264-1268.
- PulseNet, 2013. The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of

Escherichia coli O157:H7, *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei*, and *Shigella flexneri* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Smulders, F.J. & Greer, G.G., 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal Food Microbiology* 44:149-169.

Tinney, K.S., Miller, M.F., Ramsey, C.B., Thompson, L.D., & Carr, M.A., 1997. Reduction of microorganisms on beef surfaces with electricity and acetic acid. *Journal of Food Protection* 60:625-628.

Wolf, M.J., Miller, M.F., Parks, A.R., Loneragan, G.H., Garmyn, A.J., Thompson, L.D., Echeverry, A., & Brashears, M.M., 2012. Validation comparing the effectiveness of a lactic acid dip with a lactic acid spray for reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and non-O157 Shiga toxinogenic *Escherichia coli* on beef trim and ground beef. *Journal of Food Protection* 75:1968-1973.

CONCLUSÕES

- ✓ *Salmonella* spp. podem se adaptar aos ácidos testados (acético e láctico), principalmente quando entram em contato com pH 5,0 ou 6,0, enquanto que em pH 4,0, a redução completa da população é observada após 6 e/ou 24 h.
- ✓ O principal gene que apresentou maior relação com a adaptação das cepas de *Salmonella* spp. em pH 5,0 e 6,0, foi o *rpoS*: em determinadas condições, a expressão deste gene foi importante para o restabelecimento das contagens de *Salmonella* spp após queda provocada pelo estresse ácido, e em outras, sua expressão ocorreu logo após contato de *Salmonella* spp. com os ácidos testados, permitindo um estímulo na multiplicação bacteriana.
- ✓ A participação do gene *nlpD* foi verificada em momentos onde o *rpoS* não teve atuação, sendo que o contrário também ocorreu.
- ✓ O gene *clpP* esteve envolvido nos momentos em que a população bacteriana não apresentou comportamento de tolerância ácida (evidenciado pela menor expressão dos genes *rpoS* e *nlpD*) e a necessidade de ativar o mecanismo de degradação do σ^S nessas condições, pode ter influenciado a maior expressão deste gene.
- ✓ As respostas adaptativas de *Salmonella* spp. em pHs 5,0 e 6,0, ressalta a importância de um monitoramento adequado na redução do pH das carcaças bovinas, durante a aspersão dos ácidos orgânicos. Sua aplicação deve ser feita em condições adequadas e que permitam uma redução suficiente do pH para um controle efetivo de *Salmonella* spp. e outros micro-organismos, sem que promovam efeitos negativos sobre a qualidade sensorial dos produtos cárneos.