

PATRÍCIA AMARAL SOUZA TETTE

**ADESÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SUPERFÍCIES E CONDIÇÕES DO  
PROCESSAMENTO DE PRODUTOS CÁRNEOS.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

PATRÍCIA AMARAL SOUZA TETTE

**ADESÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SUPERFÍCIES E CONDIÇÕES DO  
PROCESSAMENTO DE PRODUTOS CÁRNEOS.**

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

APROVADA: 30 de julho de 2010.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Co-orientadora)

---

Prof. José Antonio Marques Pereira  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Edimar Aparecida Filomeno Fontes

---

Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

---

Prof<sup>a</sup>. Regina Célia Santos Mendonça  
(Orientadora)

*Ao meu marido, pelo amor  
incondicional, carinho  
e compreensão.*

**DEDICO**

"... Sê forte e corajoso; não temas, nem te  
espantes, porque o Senhor, teu Deus,  
é contigo por onde quer que andares".

( Js 1:9 )

## AGRADECIMENTOS

Ao soberano Deus pelo amor, fidelidade e presença constante em minha vida. Toda honra e glória seja dada a ti!

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade concedida de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Professora Regina Célia Santos Mendonça pela orientação, amizade, confiança, oportunidade de aprendizado e crescimento.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela amizade, ensinamentos, incentivo, preciosas sugestões e participação na banca examinadora.

Ao professor José Antonio Marques Pereira pelas sugestões, contribuições com o trabalho e participação na banca examinadora.

À professora Edimar Aparecida Filomeno Fontes e a Dra Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto (EPAMIG) pelas sugestões e participação na banca examinadora.

À minha linda família... Minha querida mãe, Eunice, pelo infinito amor, incentivo, orações e compreensão. Meu pai, José Luiz, pelo amor, apoio e orações. Aos meus irmãos, Edmilson e Rodrigo, pelo carinho, amizade, exemplo e pelos suportes em informática. Amo vocês!

Ao meu super marido, Wálmiron Tette, pelo amor incondicional, pelas oportunas palavras de apoio, pelo respeito, compreensão e companheirismo. Sem você essa trajetória seria muito difícil. Obrigada por tornar tudo na minha vida mais simples e mais feliz. Te amo!

Às amigas estagiárias Cristiane Cabral e Nádia Lopes, pela disposição, participação ativa no experimento, pelas conversas, gargalhadas e agradável companhia. Vocês são show!

Ao Raphael e a Mary Hellen pela sensacional ajuda nos experimentos em biologia molecular. Não sei como agradecer vocês...

À minha família em Viçosa, grandes amigas, Fatinha, Andréia, Ana Cláudia e Lívia pelas conversas, risadas e por tornarem minha estadia em Viçosa muito mais feliz.

Às amigas Ana Carolina e Élide pela ajuda no experimento, momentos de descontração, passeios pelas lojas da cidade e pela alegria contagiante.

À todos os amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH): Márcia, Andreza, Humberto, Arthur, Micaela, Luiz Augusto, Delaine, Daniela, Flávia, Ariana, Isabelle e Janaína, pela amizade, momentos vividos, pela colaboração na execução do experimento e parceria nos trabalhos.

À família da minha cunhada Luciane, Sr. Geraldo, Dona Graça, Darlan e Júnior, pelo carinhoso acolhimento em minha chegada em Viçosa e durante todo o período do curso.

Aos meus vizinhos em Itabirito, Sirlene, Reinaldo e Pedrinho, por toda generosidade e carinho.

À grande amiga Ana Iris pela força, companhia nos estudos e sugestões na redação da dissertação. Sou sua fã!

Ao professor José Ivo pelos esclarecimentos quanto às análises estatísticas.

À professora Andréia Ribon por disponibilizar o Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) para realização de parte do experimento.

Ao Professor Daniel Assis (ICB/UFMG), pela amizade, incentivo, correções da dissertação e por ser exemplo de professor e pesquisador.

À professora Patrícia Cisalpino (ICB/UFMG) e a todos os pesquisadores do Laboratório de Interação Micro-organismo Hospedeiro (LIMHO), em especial ao Marco Aurélio pela paciência no ensino de técnicas de biologia molecular.

À toda a equipe da Agrogenética, em especial a Néia e o Darlan pela disposição em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela amizade e colaboração.

À todos os amigos que mesmo distantes sempre deram um jeitinho de se fazerem presentes!

## **BIOGRAFIA**

Patrícia Amaral Souza Tette, filha de José Luís de Souza e Maria Eunice do Amaral Souza, nasceu em 13 de abril de 1985, na cidade de Santa Bárbara, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2004, iniciou o curso de Nutrição na Universidade do Vale do Rio Doce, graduou-se em dezembro de 2007, e, em agosto de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2. 1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
2. 1. 1. Características de <i>S. aureus</i> .....	3
2. 1. 2. Intoxicação alimentar estafilocócica .....	3
2. 2. Fatores que interferem no comportamento de <i>S. aureus</i> .....	5
2. 2. 1. Temperatura .....	5
2. 2. 2. pH .....	6
2. 2. 3. Nitrito de sódio .....	7
2. 2. 4. Cloreto de sódio .....	8
2. 3. <i>S. aureus</i> na indústria de produtos cárneos .....	9
2. 3. 1. <i>S. aureus</i> em produtos cárneos fermentados .....	11
2. 4. Adesão e formação de biofilmes .....	12
2. 5. Genes envolvidos na adesão e formação de biofilme .....	14
2. 6. Superfícies utilizadas no processamento de alimentos .....	16
2. 7. Microbiologia preditiva .....	18
2. 8. Metodologia de Superfície de Resposta .....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3. 1. Planejamento experimental .....	22
3. 1. 1. Delineamento experimental .....	22
3. 1. 2. Modelo estatístico .....	24
3. 2. Procedimentos experimentais .....	24
3. 2. 1. Manutenção e ativação de <i>S. aureus</i> .....	24
3. 2. 2. Superfícies avaliadas .....	24
3. 2. 3. Preparo dos cupons .....	25
3. 2. 4. Preparo dos meios de cultura .....	25
3. 2. 5. Suspensão do micro-organismo .....	26
3. 2. 6. Determinação da adesão de <i>S. aureus</i> .....	26
3. 3. Validação do modelo .....	27
3. 4. Análise da expressão gênica de <i>S. aureus</i> .....	28
3. 4. 1. Extração do RNA total .....	29
3. 4. 2. Quantificação do RNA e tratamento com Dnase .....	30
3. 4. 3. Síntese de cDNA .....	30
3. 4. 4. PCR quantitativo em tempo real .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32

4. 1. Adesão de <i>S. aureus</i> em aço inoxidável .....	32
4. 2. Adesão de <i>S. aureus</i> em poliuretano.....	35
4. 3. Adesão de <i>S. aureus</i> em cloreto de polivinila.....	38
4. 4. Modelo da adesão de <i>S. aureus</i> .....	43
4. 5. Validação do modelo .....	45
4. 6. Expressão gênica em <i>S. aureus</i> .....	49
5. CONCLUSÃO .....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO I .....	65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gráficos de superfície de resposta (1a, 1c e 1e) e de contorno (1b, 1d e 1f) da adesão de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável 304 (AIN): 1a e 1b) temperatura em função do tempo de contato, onde o pH do tratamento foi mantido constante em 6,25; 1c e 1d) pH em função do tempo de contato, onde a temperatura do tratamento foi mantida constante à 35 °C; 1e e 1f) temperatura em função do pH, onde o tempo de contato do tratamento foi mantido constante por 6h.....33
- Figura 2. Gráficos de superfície de resposta (2a, 2c e 2e) e de contorno (2b, 2d e 2f) da adesão de *S. aureus* em superfície de poliuretano (PU): 2a e 2b) pH em função da concentração de NaCl, onde tempo de contato do tratamento foi mantido constante em 6 h; 2c e 2d) concentração de NaCl em função do tempo de contato, onde o pH do tratamento foi mantido constante em 6,25; 2e e 2f) pH em função do tempo de contato, onde a concentração de NaCl do tratamento foi mantida constante em 4 %. ....36
- Figura 3. Gráficos de superfície de resposta (3a, 3c e 3d) e de contorno (3b, 3d e 3f) da adesão de *S. aureus* em superfície de cloreto de polivinila (PVC): 3a e 3b) temperatura em função do pH, onde a concentração de NaCl (4 %) e o tempo de contato (6 h) do tratamento foram mantidos constantes; 3c e 3d) temperatura em função da concentração de NaCl, onde o pH (6,25) e o tempo de contato (6h) do tratamento foram mantidos constantes; 3e e 3f) temperatura em função do tempo de contato, onde o pH (6,25) e a concentração de NaCl (4 %) do tratamento foram mantidos constantes. ....39
- Figura 4. Gráficos de superfície de resposta (4a, 4c e 4e) e de contorno da adesão de *S. aureus* em superfície de cloreto de polivinila (PVC): 4a e 4b) concentração de NaCl em função do pH, onde a temperatura (35 °C) e o tempo de contato (6h) foram mantidos constantes; 4c e 4d) pH em função do tempo de contato, onde a temperatura (35 °C) e a concentração de NaCl (4 %) foram mantidas constantes; 4e e 4f) concentração de NaCl em função do tempo de contato, onde a temperatura (35 °C) e o pH (6,25) foram mantidos constantes.....42
- Figure 5. Comparação entre os valores observados e os valores preditos da adesão de *S. aureus* sobre as superfícies de a) aço inoxidável (AIN); b) poliuretano (PU) e c) cloreto de polivinila (PVC). ....48
- Figura 6. Expressão dos genes *icaD* (a) e *icaR* (b) em *S. aureus* quando submetidos a diferentes tratamentos. O tratamento a 35 °C foi utilizado como controle.....50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Delineamento experimental Box-Behnken utilizado na avaliação da adesão de *S. aureus* em função dos fatores temperatura, pH, NaCl, NaNO<sub>2</sub> e tempo de contato.....23
- Tabela 2. Dimensões dos cupons utilizados para avaliar a adesão de *S. aureus* ..25
- Tabela 3. Experimento de validação do modelo gerado para as superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila.....28
- Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a avaliação da expressão gênica de *S. aureus*.....29
- Tabela 5. Equação de regressão do modelo ajustado das superfícies: aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila.....43
- Tabela 6. Combinação dos fatores estudados que maximizam e minimizam a adesão de *S. aureus* sobre as superfícies de processamento de alimentos.....44
- Tabela 7. Valores observados e preditos da adesão de *S. aureus* em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila sob diferentes condições utilizadas na validação do modelo de superfície de resposta. ....46
- Tabela 8. Avaliação matemática do modelo de superfície de resposta gerado com base nos dados da adesão de *S. aureus* em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila sob diferentes condições. 47

## RESUMO

TETTE, Patrícia Amaral Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Adesão de *Staphylococcus aureus* em diferentes superfícies e condições utilizadas no processamento de produtos cárneos.** Orientador: Regina Célia Santos Mendonça. Co-orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e José Antonio Pereira.

Em função da demanda por alimentos mais saudáveis e convenientes, existe a necessidade crescente do desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam o comportamento dos micro-organismos sob diversas condições. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes combinações de temperatura, pH, concentração de NaCl, concentração de NaNO<sub>2</sub> e tempo de contato, aplicadas simultaneamente, na adesão de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável (AIN), poliuretano (PU) e cloreto de polivinila (PVC). Os experimentos foram conduzidos de acordo com o delineamento de Box-Behnken, sendo portanto, escolhidos três níveis de cada variável independente estudada. Os níveis inferiores, centrais e superiores de cada variável foram designados como -1, 0 e +1. Foram ensaiadas 40 combinações entre os níveis dos cinco fatores de interesse e seis repetições referente a combinação no ponto central para estimativa da variância experimental. O programa MINITAB<sup>®</sup> 13 foi utilizado nas análises estatísticas. *S. aureus* aderiu, em determinadas condições, nas superfícies de AIN, PU e PVC. Em todas as superfícies estudadas os níveis extremos dos fatores proporcionaram menor capacidade de adesão do micro-organismo à superfície, sendo a condição ótima de adesão próxima ao ponto central estudado. Foi observado que a adesão de *S. aureus* às superfícies torna-se maior com o aumento do tempo de contato. Nenhuma das concentrações de NaNO<sub>2</sub> influenciaram a adesão de *S. aureus* ( $p > 0,05$ ). As condições utilizadas na fabricação de produtos cárneos fermentados como baixo pH alcançado em curto intervalo de tempo e manutenção do produto em baixas

temperaturas, além de diminuir a proliferação de *S. aureus* neste produto podem impedir que esse micro-organismo inicie o processo de adesão sobre as superfícies de AIN, PU e PVC. Os altos valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) demonstraram a adequação do modelo quadrático em explicar a influência das variáveis independentes na resposta. Em superfície de AIN o modelo respondeu por 80,5 %, em PU 78,2 % e em PVC 80,6 %. Os fatores bias (*fb*) calculados para as superfícies de AIN, PU e PVC foram 1,05, 1,05 e 1,08 respectivamente, enquanto os fatores exatidão (*fe*) foram 1,18, 1,16 e 1,82 respectivamente. Os modelos gerados no presente estudo foram classificados como bons e aceitáveis e, deste modo, podem ser utilizados para predição da adesão de *S. aureus* sobre as superfícies de AIN, PU e PVC.

## ABSTRACT

TETTE, Patrícia Amaral Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Adhesion of *Staphylococcus aureus* on different surfaces and conditions used in the processing of meat products.** Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and José Antonio Pereira.

Depending on the demand for healthier foods and convenience, the researchers acknowledge that there is a growing need for mathematical models that describe the behavior of micro-organisms under different conditions. This study aimed to evaluate the effect of different combinations of temperature, pH, NaCl concentration, concentration of NaNO<sub>2</sub> and contact time, applied simultaneously, in the adhesion of *Staphylococcus aureus* on surfaces of stainless steel (STS), polyurethane (PU) and polyvinyl chloride (PVC). The experiments were conducted in accordance with the Box-Behnken design, being therefore, selected three levels of each independent variable studied. The lower, central and upper levels of each variable were designated as -1, 0 and +1. 40 combinations between the levels of five factors and six replicates of interest regarding the combination at the center point to estimate the experimental variance were tested. The Minitab<sup>®</sup> 13 program was used in the statistical analysis. *S. aureus* was able to adhere, under certain conditions, on the surfaces of STS, PU and PVC. On all studied surfaces the extreme levels of the factors provided lower adhesion ability of the microorganism to the surface, being the best condition of the adhesion close to the studied central point. It was observed that the adherence of *S. aureus* to the surfaces becomes more pronounced as the contact time increases. None of the NaNO<sub>2</sub> concentrations used in this study were significant in the adhesion of *S. aureus* ( $p > 0,05$ ). The results indicated that the conditions used in the manufacture of fermented meat products such as low pH achieved in a short period of time and the packaging of the product at low temperatures, besides decreasing the proliferation of *S.*

*aureus* in this product may prevent the micro-organism to start the adhesion process on the surfaces of STS, PVC and PU. The high coefficients values of determination ( $R^2$ ) demonstrated the suitability of the quadratic model to explain the influence of independent variables in the response. On the surface of STS the model accounted for 80.5 %, 78.2 % in PU and in PVC 80,6 %. The bias factors (bf) calculated for the surfaces of STS, PU and PVC were 1.05, 1.05 and 1.08 respectively, while the accuracy factors (af) were 1.18, 1.16 and 1.82 respectively. The models generated in this study were classified as good and acceptable and thus can be used to predict the adhesion of *S. aureus* on the surfaces of STS, PU and PVC.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças resultantes do consumo de alimentos contaminados continuam a aumentar consideravelmente em todo o mundo. Um dos tipos mais comuns de intoxicação alimentar é causada pela toxina de *Staphylococcus aureus*. Esse micro-organismo é mau competidor e apresenta maiores riscos em alimentos onde a microbiota normal é inativada ou inibida, como por exemplo, carnes cozidas e salgadas.

Alimentos embutidos fermentados são comumente envolvidos em surtos de intoxicação causados por *S. aureus*. A contaminação desses produtos pode ser proveniente de condições inadequadas de abate e evisceração, extensa manipulação a qual o alimento é submetido, bem como superfícies de equipamentos e utensílios utilizados em sua produção.

Se as condições forem favoráveis, *S. aureus* pode aderir às superfícies de processamento de alimentos e formar biofilmes. A ocorrência de biofilmes é ubíqua e constitui uma estratégia de sobrevivência microbiana. Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada, por exemplo, à proteção contra agentes estressantes do ambiente. Os biofilmes maduros tendem a se dispersar, liberando micro-organismos que podem colonizar novos ambientes. Deste modo, a adesão e consequente formação de biofilme por patógenos nas superfícies de equipamentos de indústrias de alimentos é fonte de alto risco de contaminação cruzada. Esse processo é passível de ocorrer na maior parte das superfícies envolvidas no processamento de alimentos.

Superfícies de aço inoxidável (AIN), poliuretano (PU) e cloreto de polivinila (PVC) são amplamente utilizadas em várias indústrias de alimentos, incluindo a de produtos cárneos. Portanto, torna-se necessário o estudo de identificação das condições de processamento de alimentos, armazenagem e distribuição em que *S. aureus* é capaz de sobreviver, multiplicar e formar biofilme. Deste modo, a metodologia de superfície de resposta (MSR) é recomendada, pois permite avaliar a influência simultânea de diversos fatores na resposta.

Espera-se que este estudo possa contribuir para melhor compreensão das condições que favorecem a adesão de *S. aureus* no ambiente de produção de produtos cárneos.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar o efeito da temperatura, pH, concentração de NaCl, concentração de NaNO<sub>2</sub> e tempo de contato semelhantes às utilizadas na indústria de produtos cárneos na adesão de *S. aureus* em superfícies de AIN, PU e PVC.
- b) Modelar os dados experimentais da adesão de estirpes de *S. aureus* nas superfícies de AIN, PU e PVC em função da temperatura, pH, concentração de NaCl, concentração de NaNO<sub>2</sub> e tempo de contato utilizando a técnica de superfície de resposta;
- c) Validar o modelo obtido, por meio de condições experimentais diferentes daquelas utilizadas na construção do modelo;
- d) Avaliar a expressão dos genes *icaD*, *icaR* e *atl* na linhagem de *S. aureus*, ATCC 6538, em condições compreendidas no intervalo do estudo de adesão.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2. 1. *Staphylococcus aureus*

#### 2. 1. 1. Características de *S. aureus*

*Staphylococcus* são micro-organismos freqüentemente analisados no laboratório de microbiologia (PALAVECINO, 2002). As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, imóveis, não esporulados, capsulados ou não e anaeróbios facultativos (JAY, 2005). O gênero *Staphylococcus* é composto por 38 espécies, sendo *S. aureus* o mais envolvido em doenças humanas (SHALE et al, 2005).

*S. aureus* é uma bactéria patogênica e entre os fatores de virulência produzidos encontram-se estafiloquinases, hialuronidases, fosfatases, coagulases, hemolisinas e toxinas termorresistentes (SANT'ANA e AZEREDO, 2005).

A mucosa nasal representa a principal reserva ecológica de *S. aureus* em humanos (MELLES et al, 2004; WERTHEIM et al, 2005; CORNE et al, 2005; SOUZA e SANTOS, 2009). Quando presente em alimentos, *S. aureus* é muitas vezes associado à manipulação inadequada por parte do pessoal contaminado com este micro-organismo (GUNDOGAN et al, 2005; MARQUES et al, 2006). Em unidades de processamento de alimentos pode aderir e formar biofilmes (MORETRO et al, 2003; HERRERA et al, 2007; MARQUES et al, 2007; RODE et al, 2007).

#### 2. 1. 2. Intoxicação alimentar estafilocócica

Diversas espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir toxinas, mas apenas uma espécie, *S. aureus*, está comumente associada com doença de origem alimentar (LINDQVIST et al, 2002; HUDSON, 2004). As enterotoxinas de *S. aureus* podem ser detectadas quando a população excede  $10^5$  células  $g^{-1}$  (NEWSOME e STEWART, 2004; RODRIGUES et al, 2004). Este agente produz diversas enterotoxinas (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G, H e I) causadoras de intoxicações alimentares (FIGUEROA et al, 2002). No entanto, as enterotoxinas A e E são as mais frequentemente implicadas em intoxicação alimentar estafilocócica (NEMA et al, 2007), sendo a enterotoxina A, a mais tóxica. Dados de surtos envolvendo enterotoxina A indicam que a ingestão de

menos de 1 µg da toxina pode resultar em doença (NEWSOME e STEWART, 2004). A produção dessas toxinas depende principalmente da natureza do alimento, dos processos aos quais foi submetido e da exposição ao tratamento térmico (FIGUEROA et al, 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas são compostos de massa molar entre 27 e 31 kDa resistentes a enzimas proteolíticas e estáveis ao calor (NEMA et al, 2007), embora a célula vegetativa de *S. aureus* possa ser facilmente inativada por tratamento térmico (SHALE et al, 2005). Algumas são formadas durante o crescimento exponencial da bactéria, outras são predominantemente formadas quando a bactéria entra em fase estacionária. As condições ambientais para que *S. aureus* seja capaz de produzir toxina são mais restritas do que aquelas necessárias para seu crescimento (LINDQVIST et al, 2002).

A intoxicação é causada pela ingestão de alimentos com enterotoxinas produzidas por *S. aureus* normalmente porque o alimento foi mantido à temperatura ambiente. Os alimentos que requerem considerável manipulação durante a preparação e que são mantidos sem refrigeração são geralmente implicados em intoxicação alimentar estafilocócica (RODRIGUES et al, 2004; BAEZA et al, 2009). Assim, os alimentos contaminados com *S. aureus* são potenciais fontes de enterotoxinas quando armazenados em temperaturas que favoreçam o crescimento do micro-organismo e síntese enterotoxinas (HUANG et al, 2007).

O período de incubação da doença pode variar de 30 min até 8 h, porém, na maioria dos casos, os sintomas são manifestados entre 2 a 4 h após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas estafilocócicas preformadas (RODRIGUES et al, 2004). Os efeitos agudos incluem náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia (LINDQVIST et al, 2002; JORGENSEN et al, 2005). Esses sintomas são reduzidos com 24 a 48 h, mas a doença pode permanecer durante 7 a 10 dias.

A intoxicação alimentar estafilocócica é muito comum, apesar de pouco reportada (NEMA et al, 2007). A verdadeira incidência da doença é desconhecida por várias razões, incluindo resposta inadequada por parte das vítimas nas entrevistas realizadas por funcionários da saúde, diagnóstico errôneo devido aos sintomas serem semelhantes aos de outros tipos de intoxicação alimentar, como por exemplo, os sintomas causados pela toxina emética de *Bacillus cereus*, coleta insuficiente de amostras para análise em

laboratório e inadequada análise laboratorial (NEWSOME e STEWART, 2004).

## **2. 2. Fatores que interferem no comportamento de *S. aureus***

Muitos fatores são apontados por desempenhar importante função na sobrevivência e multiplicação de *S. aureus*, incluindo presença e concentração de sais, pH, temperatura, atividade de água ( $A_w$ ), exposição ao processamento, competição microbiana, entre outros (PORTOCARRERO et al, 2002). A literatura consultada é escassa com relação ao efeito da interação desses fatores no comportamento de *S. aureus*.

*S. aureus* é um organismo muito adaptável e pode sobreviver em uma grande variedade de ambientes (RODE et al, 2007). Deste modo, torna-se importante para indústria de alimentos identificar as condições em que este micro-organismo é capaz de sobreviver e multiplicar no que diz respeito ao processamento de alimentos, armazenagem e distribuição.

### **2. 2. 1. Temperatura**

O uso de temperaturas abusivas no processamento de alimentos permite a produção de toxinas por *S. aureus*, sendo essa uma das principais causas de intoxicação alimentar (RODE et al, 2007). Esta bactéria é capaz de multiplicar em uma ampla faixa de temperatura que varia de 7 a 48 °C com ótimo entre 35 e 37 °C, um intervalo de temperatura que pode ser freqüente em climas tropicais (JOFRÉ et al, 2008; BAEZA et al, 2009).

Embora o processamento térmico e o cozimento em altas temperaturas sejam suficientes para inativar as células bacterianas, as enterotoxinas são termo-estáveis e não são inativadas por tratamentos térmicos utilizados na produção de alimentos. A ausência de estafilococos viáveis, portanto, não garante que um alimento é seguro. Deste modo, é necessário o controle do binômio tempo/temperatura a fim de garantir a estabilidade do alimento e diminuir o risco de contaminação por *S. aureus* (NEWSOME e STEWART, 2004). Os alimentos, muitas vezes, podem ser preparados em condições inadequadas e armazenados em temperatura ambiente antes de serem comercializados. Desta forma, o tempo decorrido entre o preparo e o consumo dos alimentos é um importante fator a ser considerado quanto ao risco de contaminação (BAEZA et al, 2009). Apesar de estafilococos serem

proteolíticos, geralmente não produzem odores nos alimentos ou os fazem parecer deteriorados. A presença da bactéria ou de suas toxinas nos alimentos não pode ser detectável por métodos sensoriais (NEWSOME e STEWART, 2004).

A contaminação dos alimentos com *S. aureus* também pode ser em decorrência da adesão e formação de biofilmes. Estudos têm mostrado que a temperatura pode influenciar a adesão de *S. aureus* em superfícies inertes (MARQUES et al, 2007; RODE et al, 2007).

### **2. 2. 2. pH**

É geralmente aceito que a multiplicação de *S. aureus* é efetivamente controlada em ambiente de pH 5,3 ou menor (ANANOUE et al, 2005). Em pH baixo, a capacidade de linhagens enterotoxigênicas produzir enterotoxinas também é reduzida (LINDQVIST et al, 2002).

A fermentação é um método simples e barato para conservação de carne e produtos à base de carne desde a antiguidade. O processo tem uma vantagem adicional de permitir a formação de produtos específicos que contribuem com o aroma e sabor do produto final. Produção de ácido, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e bacteriocinas, quer isoladamente ou em conjunto com culturas iniciadoras, são responsáveis por prevenir o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradoras na carne (SAKHARE e RAO, 2003).

A diminuição do pH é o fator chave para a manutenção da estabilidade de produtos fermentados à base de carne (SAKHARE e RAO, 2003). Uma das formas recomendadas de inibir o crescimento de *S. aureus* em produtos cárneos fermentados é a adição de bactérias lácticas na formulação, para reduzir esse pH em um curto intervalo de tempo (ANANOUE et al, 2005).

O efeito antimicrobiano dos ácidos é devido a redução do pH abaixo da faixa de crescimento do micro-organismo e inibição metabólica por moléculas do ácido não dissociadas (DUBAL et al, 2004). No entanto, parece que metabólitos bacterianos como ácido acético e láctico são os únicos responsáveis pela inibição desta bactéria, mais do que o baixo pH em si e, de fato, quando o pH é ajustado com ácido clorídrico, nenhuma inibição de *S. aureus* foi observada (ANANOUE et al, 2005).

Além do efeito do pH na sobrevivência e multiplicação de *S. aureus*, o pH influencia na resistência do micro-organismo no interior do biofilme e também afeta a hidrofobicidade das superfícies de processamento de alimentos, o que pode contribuir com a formação de biofilme (MOZES et al, 1987; BEENKEN et al, 2004; WEINRICK et al, 2004; BORE et al, 2007; HAMADI et al, 2009)

### **2. 2. 3. Nitrito de sódio**

Aditivos alimentares, como sais de nitrato e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e de potássio, são amplamente utilizados no processamento de produtos cárneos (OLIVEIRA et al, 2005). Constituem agentes de cura e além disso, os nitritos e compostos derivados agem como eficazes antioxidantes e, assim, previnem a oxidação lipídica e o desenvolvimento de odores de ranço (GOTTERUP et al, 2007).

*Staphylococcus* coagulase-negativos são utilizados como culturas iniciadoras para maturação de diferentes tipos de carne (BLAIOTTA et al, 2004). Esses cocos gram-positivos, catalase positivos e não patogênicos são comumente aplicados como fermento na carne e a maioria das espécies possuem enzimas envolvidas no metabolismo de nitrato e nitrito (GOTTERUP et al, 2007).

De acordo com Newsome e Stewart (2004), *S. aureus* é tolerante ao nitrito e pode, portanto, multiplicar em soluções de cura ou carnes curadas, se for submetido às condições favoráveis de crescimento. No entanto, as concentrações desse composto capazes de serem toleradas por *S. aureus* e os mecanismos envolvidos na resistência não estão bem elucidados (NEWSOME e STEWART, 2004).

Segundo Schlag et al (2007), a adição de nitrito tem função importante na promoção do crescimento das células microbianas, embora altas concentrações de compostos derivados de nitrito e nitrato serem tóxicas. Em condições ácidas, os nitritos podem formar ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), que tem forte atividade bactericida. No entanto, o derivado de nitrito acidificado, óxido nítrico (NO), está diretamente ou indiretamente envolvido na inibição da formação do biofilme. Evidências indicam que a presença de nitrito no meio pode estar relacionada à falhas observadas na formação de biofilme (SCHLAG et al,

2007). Um dos mecanismos sugeridos é que esse composto orienta a indução da transcrição de *icaR*, o que resulta em repressão dos genes *icaADBC*, envolvidos na formação do biofilme. No entanto, o efeito do  $\text{NaNO}_2$  na adesão e formação de biofilmes, por *S. aureus*, em condições relevantes à indústria de alimentos não tem sido muito estudado (SCHLAG et al, 2007).

#### **2. 2. 4. Cloreto de sódio**

A presença do cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) pode funcionar como um inibidor do desenvolvimento de micro-organismos presentes no alimento. No ambiente com a presença desse composto bactérias halofílicas são selecionadas (LARA et al, 2003).

A adição de cloreto de sódio ao alimento reduz a  $A_w$  do produto e juntamente com a temperatura e pH, é uma das principais características que influenciam o crescimento e a sobrevivência bacteriana. O efeito de uma baixa  $A_w$  está relacionado ao fato da turgescência da célula ser estabelecida como resultado da  $A_w$  intracelular e a  $A_w$  do meio circundante. O processo conhecido como plasmólise, descreve como o choque hiperosmótico causa efluxo instantâneo de água, acompanhado por uma diminuição do volume citoplasmático da célula (WIJNKER et al, 2006).

A resposta universal à perda temporária de turgor é o acúmulo citoplasmático dos chamados solutos compatíveis. Solutos compatíveis são pequenas moléculas orgânicas que partilham certo número de propriedades comuns: entre outras, são solúveis em alta concentração e podem ser acumulados em concentrações muito altas (até  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no citoplasma de células osmoticamente estressadas, não alteram a atividade enzimática e podem proteger as enzimas de desnaturação por sais. Exemplos de solutos compatíveis conhecidos são betaína, glicerol, sacarose e prolina (BEALS, 2004).

Uma das características seletivas que torna o gênero *Staphylococcus* favorecido frente às outras bactérias é por serem halotolerantes, o que pode representar um perigo adicional, quando ocorre a inibição de micro-organismos competidores pela concentração elevada de sal (COSTA et al, 2001). *Staphylococcus* pode tolerar 10 a 20 % de cloreto de sódio (NEWSOME e STEWART, 2004). Nestas condições, *S. aureus* acumula solutos compatíveis

como glicina, prolina e betaína no interior do citoplasma, sem interferir nos processos celulares (GUTIERREZ,1995).

A alta concentração de cloreto de sódio e, em particular os baixos valores de  $A_w$  são obstáculos importantes para inibir o desenvolvimento de *S. aureus* (LARA et al, 2003). No entanto, o crescimento pode ocorrer em  $A_w$  tão baixa quanto 0,86 em condições aeróbias ou  $A_w$  de 0,90 em condições anaeróbias (NEWSOME e STEWART, 2004). Por outro lado, a alta osmolaridade no ambiente parece contribuir com a adesão e formação de biofilme por *S. aureus*. Diversos estudos têm mostrado que a presença de NaCl estimula esse comportamento do micro-organismo (RACHID et al, 2000; MORETRO et al, 2003; LIM et al, 2004; PLANCHON et al, 2006; RODE et al, 2007; HERRERA et al, 2007)

### **2. 3. *S. aureus* na indústria de produtos cárneos**

O aumento progressivo da população mundial e as mudanças no estilo de vida resultaram em maiores exigências na qualidade de alimentos de origem animal (DUBAL et al, 2004). Devido às suas propriedades ( $A_w$ , pH e nutrientes) e as extensas manipulações e processamentos a que são expostos, a carne e produtos à base de carne estão envolvidos em muitos surtos de doenças de origem alimentar (ANANOU et al, 2005).

Embora a carne de animais hígidos seja, geralmente, livre de micro-organismos contaminantes, pode ser contaminada pelo contato com pele suja, cascos, pelos, conteúdo intestinal, facas, ferramentas de corte, pessoal infectado, água poluída, ar, processo de abate deficiente, manuseio e armazenamento pós-abate. Diferentes tipos de organismos patogênicos e deterioradores podem ser introduzidos na carne durante o abate e o processamento, o que provoca sua rápida deterioração, grande perda de proteínas essenciais e danos a saúde de humanos. Portanto, é muito importante reduzir a carga microbiana inicial para aumentar a vida de prateleira desse alimento (DUBAL et al, 2004).

Carne e produtos à base de carne também podem ser contaminados com diferentes espécies bacterianas resistentes a antimicrobianos. O risco para a saúde humana, de um tipo de carne ou produto transportar micro-organismos resistentes à antimicrobianos depende (i) da prevalência da

contaminação por bactérias resistentes, (ii) das conseqüências para a saúde humana de uma infecção com uma bactéria resistente a um determinado antimicrobiano específico e (iii) do consumo de um volume específico do produto (PRESI et al, 2009).

Bactérias com potencial deteriorador ou patógenos geralmente associados com carnes vermelhas incluem *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Pseudomonas* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* (NEL et al, 2004).

O fato de *S. aureus* ser mau competidor e crescer em valores baixos de  $A_w$  são refletidos nos tipos de produtos cárneos normalmente associados com doenças de origem alimentar causadas por este organismo: alimentos cozidos e, portanto, sem competidores presentes, e alimentos que contêm altas concentrações de sal, proporcionam maiores chances de *S. aureus* multiplicar e produzir toxinas (HUDSON, 2004).

Segundo Nel et al (2004) devido à falta de higiene pessoal e práticas inadequadas aplicadas na sala de desossa, as carcaças são mais contaminadas por *S. aureus* do que o manipulador de alimentos. A alta incidência de *S. aureus* em amostras de carne é particularmente preocupante, porque pode se tornar fonte de contaminação para outros alimentos e representar risco em alimentos processados, por isso, é essencial reduzir a incidência de *S. aureus* na carne. Além disso, alta população de *S. aureus* no alimento, combinada com temperatura e armazenamento inadequados, aumenta a possibilidade dos consumidores se intoxicarem com o produto.

Durante o processo de desossa, os cortes são retirados da carcaça pendurada, colocados em mesas de aço inoxidável e, manualmente, aparados para remover o excesso de gordura. A carne é então colocada sobre uma esteira rolante por onde é transportada para outra sala onde pode ser embalada sob vácuo e colocada em caixas. A etapa final inclui dois diferentes procedimentos de manipulação. O primeiro envolve a expedição da carne em caixa diretamente para a área de expedição onde é transportada a uma temperatura controlada no veículo, temperatura não superior a 10 °C, para o mercado varejista. O segundo procedimento é o manuseio da carne congelada na caixa -14 a -18 °C (NEL et al, 2004).

### 2. 3. 1. *S. aureus* em produtos cárneos fermentados

Desde a antiguidade, o homem busca preservar as características da qualidade da carne para manter a provisão de alimentos, o desenvolvimento e a conservação da espécie, originando-se, assim, processos e tecnologias de transformação, inicialmente rudimentares e atualmente controláveis por padrões tecnológicos para manter a qualidade dos produtos. A fabricação de embutidos propicia o aumento da vida de prateleira das carnes, bem como diversifica a oferta de derivados (OLIVEIRA et al, 2005).

Embutidos, como lingüiças, salsichas e salames, são definidos como alimentos condimentados contidos em envoltório natural ou artificial, cuja elaboração emprega carne de bovinos, suínos ou aves, podendo ser cozidos ou não, curados, maturados ou dessecados (BRASIL, 2001). Sua obtenção requer uma série de etapas de manipulação, o que aumenta as possibilidades de contaminação por micro-organismos, patogênicos e deterioradores, o que pode comprometer a qualidade microbiológica do produto final, desde que ocorram falhas e não conformidades em seu processamento (MAURIELLO et al, 2004).

Diversos produtos embutidos fermentados têm sido envolvidos em surtos intoxicação alimentar por estafilococos (KABAN; KAYA, 2006). Segundo USDA (1978), ocorrências de intoxicações alimentares nos Estados Unidos foram associadas à enterotoxina produzida por *S. aureus*, presente em embutidos fermentados comerciais. Culturas iniciadoras são adicionadas normalmente a esse tipo de produto para que, em um menor tempo de fermentação, obtenha-se um produto final de qualidade e padronizado, com textura, aroma e sabor constantes, e ainda, vida de prateleira prolongada. É recomendado que na fermentação, o pH de 5,3 ou menos seja alcançado dentro de um certo intervalo de tempo. Esta recomendação baseia-se no tempo em que o ambiente favorável para crescimento do micro-organismo *S. aureus* esteja efetivamente controlado a pH menor do que 5,3. Durante o processamento inicial, é necessário restringir o tempo em que o produto estiver exposto a temperaturas maiores que 15,6 °C (60 °F), temperatura nas quais o referido micro-organismo pode multiplicar-se e produzir enterotoxinas (NASSU et al, 2002).

KLEIN et al (2006) em estudo da qualidade microbiológica do salame tipo colonial encontraram contaminação expressiva por *S. aureus* nas amostras e concluíram que a contaminação desse alimento por esse micro-organismo é um problema de saúde pública e que maior rigor por parte dos órgãos competentes deve ser direcionado na fiscalização desses alimentos, uma vez que esse é muito consumido *in natura*, o que representa uma importante via de transmissão desse patógeno.

Nos últimos anos, várias contaminações por estafilococos em alimentos que incluem carne vermelha foram implicados em surtos de intoxicação alimentar. Devido à ubiquidade de organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* em humanos, a contaminação de alimentos em plantas de processamento tem se apresentado como resultado de manipuladores de alimentos portadores assintomáticos e infectados com lesões cutâneas (SHALE et al, 2005; SOUZA e SANTOS, 2009).

O isolamento da mesma estirpe do alimento e de determinado manipulador, no mesmo período de tempo, ou durante a investigação de um surto, sugere fortemente que o manipulador de alimentos pode ser a fonte de contaminação (GUNDOGAN et al, 2005). No caso da intoxicação alimentar estafilocócica, a recuperação do paciente em curto espaço de tempo é também razão de pouco conhecimento e notificação dos surtos. No entanto, com o surgimento de mercados globais e o desenvolvimento de aparatos de pesquisas, estudar e relatar tais surtos podem ser possíveis (NEMA et al, 2007).

#### **2. 4. Adesão e formação de biofilmes**

A adesão bacteriana é um fenômeno reconhecido como o primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes (VALCARCE et al, 2002). Os mecanismos de adesão dos micro-organismos são bastante complexos e afetados por diferentes fatores, incluindo as características do organismo, o ambiente circundante (temperatura do ambiente, pH, umidade relativa, entre outros) e as propriedades da superfície como porosidade, geometria, composição, aspereza e hidrofobicidade (FOSCHINO et al, 2003).

A adesão microbiana em superfícies abióticas e a consequente formação de biofilmes têm sido documentada em ambientes variados

(RAYNER, 2004; FUSTER-VALLS et al, 2008; SIMÕES et al, 2008). Biofilmes, de micro-organismos patogênicos e de deteriorantes, foram identificados nas paredes, pisos, ralos, borracha, correias transportadoras e equipamentos de processamento de alimentos (OULAHAL et al, 2007; FUSTER-VALLS et al, 2008; SHI e ZHU, 2009).

Grande parte das bactérias em ambientes naturais está organizada em biofilmes (LASA e PENADÉS, 2006; RODE et al, 2007). A formação do biofilme ocorre por uma série de eventos sequenciais em que a adesão inicial das bactérias planctônicas à superfície é seguida por subsequente multiplicação e acúmulo de camadas de células e, finalmente, pela formação da comunidade microbiana, embebida em matriz de exopolissacarídeo (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; HERRERA, 2007; OULAHAL et al, 2008;). Polissacarídeos, proteínas, fosfolipídeos e ácidos nucléicos são os principais componentes das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que caracterizam o biofilme (SHI e ZHU, 2009).

O crescimento de qualquer biofilme também é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela multiplicação das células localizadas no interior do biofilme (SILVA et al, 2006). Os biofilmes maduros são ecossistemas altamente organizados nos quais canais de água estão dispersos e podem fornecer passagens para troca de nutrientes, metabólitos e produtos de resíduos (SHI e ZHU, 2009). O desprendimento do biofilme pode causar contaminação pós-processamento, o que leva a redução da vida de prateleira do produto ou à ocorrência de doenças (DEVERE e PURCHASE, 2007). Além disso, podem causar bloqueios mecânicos, redução na transferência de calor, aumento da resistência friccional de fluidos e corrosão de metais (RAYNER, 2004; FUSTER-VALLS et al, 2008).

A detecção e rápida correção das falhas no processamento dos alimentos e a adoção de medidas preventivas, são as principais estratégias para o controle de qualidade desses produtos (ALMEIDA et al, 1995). O processo de higienização, de acordo Andrade (2008), é uma das operações que deve ser avaliada de forma periódica nas indústrias de alimentos, pois auxilia na manutenção da qualidade e na segurança do produto final. Agentes químicos, como biocidas e surfactantes, e força mecânica são os principais métodos usados para inativar e remover biofilmes, entretanto deve-se considerar que as bactérias em biofilmes apresentam mecanismos que as

protegem de condições ambientais mais agressivas, incluindo agentes químicos antimicrobianos (HERRERA, 2007; SIMÕES et al, 2009).

Em unidades de processamento de alimentos, *S. aureus* pode aderir às superfícies e formar biofilmes (HERRERA et al, 2007). Esse micro-organismo pode persistir no biofilme durante longo período na indústria de alimentos e ser transferido para outro ponto causando contaminação cruzada (SHALE et al, 2005). A formação de biofilme por *S. aureus* é considerado um importante fator de virulência (TOLEDO-ARANA et al, 2005). Segundo Rode et al (2007), o biofilme é uma estratégia de sobrevivência de *S. aureus* e a sua formação é maior em condições sub-ótimas de crescimento.

## **2. 5. Genes envolvidos na adesão e formação de biofilme**

A capacidade de *S. aureus* em produzir biofilme é dependente das condições ambientais, o que sugere que há um mecanismo que detecta e responde a sinais do ambiente (TOLEDO-ARANA et al, 2005).

Várias proteínas de superfície bacteriana contribuem significativamente para a adesão e foram identificadas como sendo importantes na formação do biofilme estafilocócico (HALL-STOODLEY, 2004). As autolisinas *atlA*, autolisina de *S. aureus* (OSHIDA et al, 1995), e *atlE*, autolisina de *S. epidermidis* (HEILMANN et al, 1997), pertencem a um grupo de peptidoglicano hidrolases que desempenham um papel fundamental na degradação da parede celular bacteriana. Durante a divisão celular, estas autolisinas são responsáveis pela separação do septo entre duas células filhas (ZOLL et al, 2010).

A *atl* é predominante em estafilococos, sendo *atlA* e *atlE* muito semelhantes em sequência e propriedades. As enzimas são bifuncionais, compostas por uma amidase e uma glucosamidase. Mutantes de *S. aureus* e *S. epidermidis* com deleção de *atlA* e *atlE* são deficientes na fixação primária à superfície, resultando em não formação de biofilme (BISWAS et al, 2006).

Vários genes estão envolvidos na produção de biofilme, no entanto os mecanismos reguladores ainda são mal compreendidos (RODE et al, 2007). Há um consenso que o principal determinante da formação do biofilme em *S. aureus* é a adesina intercelular polissacarídica (PIA), cuja produção é dependente dos genes de adesão intercelular *icaADBC* operon (BEENKEN et al, 2004; YAZDANI et al, 2006). PIA consiste de ligação  $\beta$  1,6-N-

acetilglicosamina (MORETRO et al, 2003; CHOKR et al, 2007). Estudos têm demonstrado que isolados que produzem PIA são capazes de formar espesso biofilme em placas de microtitulação de poliestireno (MORETRO et al, 2003).

A expressão do operon *ica* tem sido associada com a formação de biofilme em *S. aureus*, porém o aumento da transcrição não está necessariamente correlacionado com o aumento da formação de biofilme (FITZPATRICK et al, 2005).

O operon *ica* foi identificado pela primeira vez em *Staphylococcus epidermidis*. No entanto, esse operon também está presente e parece ter a mesma função em *S. aureus* (BEENKEN et al, 2004). Genes do operon *ica* são encontrados em até 100 % dos isolados clínicos de *S. aureus* (RODE et al, 2007). Entre os genes *ica*, o *icaA* e *icaD* são relatados como significativos na formação de biofilme em *S. aureus* e *S. epidermidis* (YAZDANI et al, 2006).

Cramton et al (1999) demonstraram que ambas as espécies, *S. epidermidis* e *S. aureus*, controlam a etapa de adesão célula-célula na formação do biofilme por meio do locus *ica* e que a deleção dos genes *ica* elimina a capacidade de produzir PIA e formar biofilme *in vitro*. No entanto, está claro que existem diferenças estirpes-dependentes com relação à capacidade global de formação do biofilme *in vitro* (BEENKEN et al, 2004).

Estudos revelaram que todas as estirpes com o gene *icaA*, um componente do locus *ica*, também ostentam *icaD*. Assim, a detecção de um destes genes pode ser usada para determinar se *S. aureus* é um formador em potencial de biofilme. No estudo de Arciola et al (2001) foi relatado que 60 % das estirpes de *S. aureus* foram capazes de produzir biofilme (ARCIOLA et al, 2001). Resultados contraditórios, obtidos por outros pesquisadores, sugeriram que todas as estirpes de *S. aureus* possuem genes *icaADBC* (ROHDE et al, 2001)

Grinholc et al (2007) sugeriram que não é possível determinar, com base na detecção de apenas um dos genes *ica*, se a estirpe tem potencial para produção do biofilme. Existe uma variação considerável na expressão gênica entre as estirpes de *S. aureus*, o que indica a necessidade de estudar várias estirpes dessa espécie antes de concluir quanto à formação de biofilme (RODE et al, 2007).

Beenken et al (2004) indicaram que a expressão do *ica*, em ambos micro-organismos, *S. epidermidis* e *S. aureus*, também está sujeita a

regulamentação ambiental. Certos nutrientes e outras substâncias químicas incluindo glicose, pH ácido, sal, ácido salicílico e concentrações sub-inibitória de antibióticos têm efeitos sobre a transcrição de genes de virulência e de outros genes acessórios em *S. aureus* (WEINRICK et al, 2004). Glicose e NaCl, em separado ou em conjunto, podem induzir a formação de biofilme pela indução do operon *icaA* em *S. epidermidis* e em *S. aureus* (MORETTO et al, 2003). O crescimento anaeróbio também está relacionado com a indução da expressão do operon *ica* e produção de PIA nesses micro-organismos (BEENKEN et al, 2004).

A constatação de que a formação de biofilme por *S. aureus* pode ser promovida em condições utilizadas na indústria de alimentos indica que os produtores de alimentos devem estar cientes da importância do controle desse processo (RODE et al, 2007).

## **2. 6. Superfícies utilizadas no processamento de alimentos**

A contaminação cruzada dos alimentos via superfícies de contato constitui uma das grandes preocupações por sua estreita associação com doenças de origem alimentar (DEVERE e PURCHASE, 2007).

As superfícies de processamento devem ser inertes sob condições normais de uso. Além disso, seus componentes não devem ser tóxicos, não podem migrar nem serem absorvidos pelos alimentos. Superfícies lisas, duras, contínuas sem fendas ou fissuras são as mais indicadas. As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado. As características macroscópicas e, particularmente microscópicas, das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana. Quanto mais lisa a superfície, mais fácil a higienização. O ideal é que nas superfícies não sejam formados poros e ranhuras e que sejam resistentes às deformações, como o abaulamento. As características das superfícies devem ser consideradas para a realização de procedimento de higienização adequado (ANDRADE et al, 2008).

Os materiais das superfícies comumente usados no processamento de alimentos, como o aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro permitem o crescimento microbiano, se esta apresentar resíduo

de alimento, que podem originar processos de adesão bacteriana e a formação de biofilmes (LEJEUNE, 2003).

Embora muitos fatores diferentes possam estar envolvidos na colonização bacteriana sobre a superfície, os tipos de matérias-primas utilizadas podem afetar a formação do biofilme bacteriano durante o processamento e manuseio dos alimentos (SILAGYI et al, 2009). Rodriguez e McLandsborough (2007) demonstraram que a eficiência da transferência de bactérias do aço inoxidável para os alimentos também foi dependente da atividade de água dos alimentos testados.

Dentre os tipos de aço inoxidável disponíveis, os que contêm 18 % de cromo e 8 % de níquel são os mais utilizados para a construção de equipamentos de processamento de alimentos. Neste grupo, estão as ligas da classe 300, por exemplo, 304 e 316, que são resistentes a corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes, além de serem facilmente higienizáveis e relativamente baratas. Essas superfícies são comumente usadas na construção de equipamentos e utensílios em geral, como: tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, mesas, pias, bancadas para manuseio, entre outras aplicações, o que atende as necessidades da indústria de alimentos (JULLIEN et al, 2002).

Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável apresenta ranhuras e fendas que propiciam a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo fluxo do alimento, detergentes e sanitizantes (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Superfícies utilizadas em ambientes de processamento de alimentos mostram características de microtopografia muito distintas (CARELI et al, 2008). Mesmo o aço inoxidável tipo 304 recomendado para fabricação de equipamentos para a indústria de alimentos devido a sua estabilidade físico-química e alta resistência a corrosão, também pode permitir a formação de biofilmes (SHI e ZHU 2009).

Os polímeros são amplamente utilizados na indústria de alimentos, em razão de suas excelentes propriedades. São capazes de retardar, prevenir mudanças e deterioração no material de embalagem devido a influências externas, como presença de oxigênio, luz e micro-organismos. Uma grande vantagem é o menor custo em relação a outros materiais usados para embalagem, por exemplo, o vidro (VERGNAUD, 1998).

Superfícies revestidas, como o PVC e o poliuretano, frequentemente utilizadas em indústria de produtos cárneos, podem apresentar protuberâncias, elevações microescavações, desgaste, ondulações e depressões, com diâmetros diferentes e ocorrência de bolhas de ar devido a defeitos de protuberância que suportam o crescimento microbiano, o que pode resultar em um elevado número de células aderidas nessas superfícies (CARELI et al, 2009).

Biofilmes formados nas superfícies de contato com os alimentos, como o aço inoxidável, o cloreto de polivinila e o poliuretano, representam uma fonte de contaminação alimentar contínua de bactérias deterioradoras e agentes patogênicos no ambiente de processamento de alimentos (SILAGYI et al, 2009).

## **2. 7. Microbiologia preditiva**

A microbiologia preditiva é uma área emergente e multidisciplinar da microbiologia de alimentos. Ela engloba disciplinas como matemática, microbiologia, engenharia e química (VALERO et al, 2007). É uma importante área da microbiologia de alimentos em que o comportamento de micro-organismos é quantitativamente descrito quanto ao crescimento celular, fase “lag” e morte celular com a ajuda de modelos matemáticos (MCMEEKIN e ROSS, 2002).

O modelo pode ser definido como "a descrição de um sistema, teoria, ou fenômeno que explica as suas propriedades conhecidas ou inferidas e podem ser utilizados para um estudo mais aprofundado das suas características". É uma descrição simplificada, muitas vezes das relações entre as observações do sistema (respostas) e os fatores que são acreditados em causar as respostas observadas. Essa descrição pode ser expressa em palavras ou expressa quantitativamente, em uma ou mais relações matemáticas ou equações. Assim, um modelo matemático pode simplesmente descrever uma coleção de dados ou pode representar uma hipótese ou uma série de hipóteses sobre relações subjacentes entre as variáveis independentes que levam à observações ou dados (MCMEEKIN et al, 2008).

A microbiologia preditiva tem recebido muita atenção no últimos 20 anos e modelos que descrevem o comportamento de micro-organismos em função

de muitos ambientes ou estresses, tornaram-se fundamentais (VALERO et al, 2007; BRUL et al, 2008).

A capacidade de modelar o comportamento microbiano em alimentos, com razoável precisão pode, em grande parte, ser devido aos fatores controláveis do ambiente no alimento (MCMEEKIN et al, 2008).

A microbiologia preditiva pode descrever o crescimento ou inativação de micro-organismos presentes nos alimentos em condições ambientais específicas, quantificar os efeitos das interações entre dois ou mais fatores e permitir a interpolação de combinações que não foram testadas de forma explícita (ESNOZ et al, 2006).

Em Microbiologia de Alimentos, métodos qualitativos para descrever respostas da população microbiana predominaram até o advento da microbiologia preditiva “moderna” que permitiu estudar de forma quantitativa a ecologia microbiana dos alimentos. Por sua vez, a descrição fenomenológica pode ser reforçada por suposições, baseadas em fatos iniciais, levando a hipóteses mais bem definidas e, talvez, a idéias mecanicistas e teorias subjacentes para caracterizar os fenômenos envolvidos (MCMEEKIN et al, 2008). Essa metodologia pode ser usada para estimar tanto o crescimento de micro-organismos patogênicos quanto de deteriorantes sob condições específicas (SUMNER e KRIST, 2002).

O objetivo final da Microbiologia Preditiva de Alimentos é auxiliar o analista de alimentos a escolher, antecipadamente, a combinação mais adequada de condições de estresse para chegar a uma formulação de produto estável (BRUL et al, 2008).

Considerando a demanda por alimentos mais saudáveis e convenientes, os cientistas reconhecem que existe uma necessidade crescente de modelos que auxiliem o estudo da inibição do crescimento microbiano (MCMEEKIN et al, 2000). Modelos que quantifiquem a probabilidade microbiana de crescimento e definam combinações de fatores que impeçam o seu crescimento. Isso ocorre porque o crescimento microbiano é limitado por uma gama de fatores, e, por vezes, o crescimento diminui acentuadamente quando o nível de cada fator é aumentado (VALERO et al, 2007).

Modelos de crescimento podem ser usados na indústria de produtos cárneos para especificar o tempo e combinações de temperatura que aumentam o conforto do trabalhador, segurança e produtividade, sem colocar

em perigo a saúde pública. Na Austrália, os principais órgãos reguladores da qualidade de produtos cárneos, reconheceram a utilidade da microbiologia preditiva na adequação do conhecimento (MEAT e LIVESTOCK AUSTRALIA, 1999). Na indústria de produtos cárneos a microbiologia preditiva vem sendo aplicada em uma variedade de setores, incluindo os de desossa a quente, retalhamento, regimes de refrigeração estendidos, fermentação, fabricação e distribuição dos produtos (SUMNER e KRIST, 2002).

Esses tipos de modelos podem ser úteis para o desenvolvimento de processos que permitem produzir produtos que visem uma alimentação mais segura e forneçam informações estimativas mais realistas dos riscos de segurança alimentar (MCKELLAR et al, 2002; VALERO et al, 2007). No entanto, a aplicação bem sucedida da microbiologia preditiva depende do desenvolvimento e validação adequada dos modelos (ESNOZ et al, 2006). Mas esse conceito de validação dos modelos preditivos não parece ser um consenso entre os pesquisadores. A literatura dispõe de estudos onde os modelos gerados não passaram por qualquer forma de validação (BEVILACQUA et al, 2010; PEÑAS et al, 2010) e de outros que foram validados utilizando diferentes metodologias, como a validação do modelo no ponto central (LIEW et al, 2005) e também por escolha aleatória de níveis dentro da região de interpolação (DONG et al, 2007; ARROYO-LÓPEZ et al, 2009).

Segundo Mcmeekin et al (2008), juntamente com o compromisso de manter a investigação estratégica, bem como desenvolver tecnologias inovadoras, o futuro da microbiologia preditiva parece destinado a superar expectativas.

## **2. 8. Metodologia de Superfície de Resposta**

Um dos métodos de modelagem de dados mais populares utilizados nas últimas duas décadas é a metodologia de superfície de resposta (MSR). A MSR reúne dados estatísticos e técnicas matemáticas úteis para desenvolver e melhorar processos em que uma resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o objetivo é otimizar essa resposta. Ela define o efeito das variáveis independentes, isoladamente ou em associação, nos processos.

Além disso, esta metodologia gera um modelo matemático, que descreve o produto ou o processo (BAS e BOYACI, 2007).

Durante os últimos anos, em microbiologia de alimentos, muitos esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de modelos que descrevem os efeitos combinados de vários fatores no crescimento de micro-organismos (GARCÍA-GIMENO et al, 2002). A MSR tem sido amplamente utilizada em microbiologia de alimentos, para explicar o efeito combinado de fatores em processos de fermentação (TANYILDIZI et al, 2005; TSAPATSARIS e KOTZEKIDOU, 2004), otimização da composição do meio para a produção de micro-organismos probióticos (LIEW et al, 2005) e predição dos parâmetros de crescimento de micro-organismos sob diferentes condições experimentais (ZURERA-COSANO et al, 2004; DONG et al, 2007; HWANG e MARMER, 2007).

Ao avaliarem a performance do modelo de MSR na predição de parâmetros de crescimento de *S. aureus* sob diferentes condições experimentais, Zurera-Cosano et al (2004) concluíram que modelos preditivos são ferramentas valiosas que permitem a rápida determinação da taxa de crescimento e fase lag de *S. aureus* e que esses dados são essenciais para assegurar a qualidade e segurança dos alimentos envolvidos em surtos relacionados com esse micro-organismo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) do Departamento de Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3. 1. Planejamento experimental**

##### **3. 1. 1. Delineamento experimental**

Utilizou-se o delineamento experimental Box-Behnken em que são planejados tratamentos oriundos de experimentos de três a sete fatores de interesse, combinados em níveis codificados pelos pontos da parte cúbica ( $\pm 1$ ) com os níveis do ponto central (0), cujos ensaios são geralmente repetidos no último ponto.

Foram estudadas as variáveis e níveis: temperatura (15, 35 e 55 °C), pH (5,5, 6,25 e 7,0) concentração de NaCl (2, 4 e 6 %), concentração de NaNO<sub>2</sub> (50, 150 e 170 mg.L<sup>-1</sup>) e tempo de contato (2, 6 e 10 h). Foram planejadas 40 combinações entre os níveis dos cinco fatores de interesse e seis repetições referentes a combinação no ponto central para estimativa da variância experimental, totalizando 46 ensaios experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Delineamento experimental Box-Behnken utilizado na avaliação da adesão de *S. aureus* em função dos fatores temperatura, pH, NaCl, NaNO<sub>2</sub> e tempo de contato

Combinções dos níveis	Fatores				
	Ensaios	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
1	55	5,50	4	110	6
2	35	6,25	6	170	6
3	35	7,00	4	110	2
4	35	6,25	2	170	6
5	35	5,50	4	110	10
6	35	6,25	4	170	2
7	35	5,50	4	170	6
8	35	5,50	4	110	2
9	15	6,25	4	110	2
10	35	6,25	6	110	10
11	15	6,25	4	50	6
12	55	6,25	4	50	6
13	35	6,25	2	110	2
14	55	7,00	4	110	6
15	35	6,25	4	110	6
16	35	6,25	4	110	6
17	35	7,00	2	110	6
18	35	6,25	4	50	10
19	55	6,25	4	170	6
20	35	6,25	4	110	6
21	15	6,25	4	170	6
22	15	6,25	4	110	10
23	35	6,25	4	170	10
24	15	6,25	2	110	6
25	35	7,00	4	110	10
26	55	6,25	6	110	6
27	35	6,25	4	50	2
28	35	6,25	6	50	6
29	35	6,25	4	110	6
30	35	7,00	4	50	6
31	15	6,25	6	110	6
32	55	6,25	2	110	6
33	35	7,00	4	170	6
34	15	5,50	4	110	6
35	35	6,25	2	50	6
36	35	5,50	2	110	6
37	35	6,25	4	110	6
38	35	6,25	2	110	10
39	15	7,00	4	110	6
40	35	6,25	4	110	6
41	35	5,50	6	110	6
42	55	6,25	4	110	10
43	55	6,25	4	110	2
44	35	5,50	4	50	6
45	35	7,00	6	110	6
46	35	6,25	6	110	2

### 3. 1. 2. Modelo estatístico

O programa MINITAB<sup>®</sup> 13 (Minitab Inc., USA) foi utilizado na construção do modelo estatístico. A equação polinomial quadrática, abaixo, foi usada para expressar a resposta em função das variáveis independentes:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j$$

em que Y representa a variável dependente a ser modelada;  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_j$  e  $b_{ij}$  representam os coeficientes do modelo; e  $X_i$  e  $X_j$  representam as variáveis independentes. A qualidade do ajuste dos modelos obtidos foi avaliada pelo  $R^2$ , coeficiente de determinação múltipla, o teste F de Fischer (derivados P valores) e pelo erro padrão da estimativa. Gráficos de superfície tridimensional foram desenhados para ilustrar os efeitos das variáveis independentes sobre a dependente (adesão de *S. aureus*).

Análises de variância foram efetuadas para a variável resposta de cada superfície em que P valores indicam os termos significativos do modelo, em nível de significância de 5 %. Uma ferramenta de cálculo foi utilizada para identificar os níveis dos fatores estudados que minimizam e maximizam a resposta.

## 3. 2. Procedimentos experimentais

### 3. 2. 1. Manutenção e ativação de *S. aureus*

Foi utilizada a estirpe de *S. aureus*, ATCC 6538, fornecida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

Cultura estoque desse isolado foi conservada a - 80 °C em caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) acrescido de 20 % de glicerol (Vetec<sup>®</sup>). O micro-organismo foi ativado em caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) por 24 h a 37 °C, em estufa (Fanem<sup>®</sup>) antes de ser utilizado nos experimentos.

### 3. 2. 2. Superfícies avaliadas

Para a avaliação da adesão bacteriana foram selecionados três tipos de superfícies comumente utilizadas no processamento de produtos cárneos: aço inoxidável 304 (AIN), PVC revestimento grosso com tecido (PVC) e poliuretano

(PU), as quais foram trabalhadas na forma de cupons. As dimensões de cada cupom são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Dimensões dos cupons utilizados para avaliar a adesão de *S. aureus*

Superfície	Dimensões (mm)		
	L	C	E
AIN	14	14	0,5
PU	14	14	2
PVC	14	14	5

L = Largura; C = Comprimento; E = Espessura.

AIN = aço inoxidável 304; PVC = cloreto de polivinila; PU = poliuretano.

### 3. 2. 3. Preparo dos cupons

Os cupons, perfurados em um dos vértices, foram esfregados com auxílio de uma escova de cerdas macias e detergente neutro líquido em água e, a seguir, enxaguados por quatro vezes, em água destilada. Resíduos de gordura foram retirados pela imersão em acetona (Dinâmica<sup>®</sup>) durante 30 min. A seguir, foram imersos em solução de NaOH (Vetec<sup>®</sup>) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> durante 1 h, e enxaguados por quatro vezes com água destilada (MACHADO, 2006). Após secagem ao ar, cada cupom foi preso na extremidade com fio de algodão (Coast<sup>®</sup>), embrulhado em papel Kraft e esterilizado a 121 °C, durante 15 min em autoclave.

### 3. 2. 4. Preparo dos meios de cultura

Concentrações de NaCl (Vetec<sup>®</sup>) de 2 a 6 % foram obtidas por adição de quantidades apropriadas de NaCl a 100 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) (Acumedia<sup>®</sup>) distribuídos em frascos que foram submetidos a esterilização a 121 °C, durante 15 min, em autoclave.

Após a esterilização, o pH foi ajustado com solução de HCl (Vetec<sup>®</sup>) (5 mol.L<sup>-1</sup>), para valores de 5,5 a 7,0. Soluções de NaNO<sub>2</sub> (Vetec<sup>®</sup>) foram preparadas em volumes de 50 mL e esterilizadas por filtração em membrana de acetato celulose com poro de 0,22 µm (Sartorius<sup>®</sup>). Alíquotas dessa solução

foram dispensadas no caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) de forma a obter concentrações finais de 50 a 170 mg.L<sup>-1</sup>.

### **3. 2. 5. Suspensão do micro-organismo**

O preparo do inóculo de *S. aureus*, ATCC 6538, foi realizado, por transferência da estirpe para um tubo com 5 mL de caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) e incubado em estufa (Fanem<sup>®</sup>) a 37 °C por 24 h. Subculturas foram realizadas em três dias sucessivos em estufa (Fanem<sup>®</sup>) a 37 °C por 24 h. A terceira subcultura foi obtida transferindo-se 1 mL do inóculo em fase logarítmica para frasco com 100 mL de caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) para obter inóculo de, aproximadamente, 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

### **3. 2. 6. Determinação da adesão de *S. aureus***

Após a esterilização, dois cupons foram depositados em frasco com 100 mL de caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) inoculado com, aproximadamente, 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. aureus*, em cada condição experimental. Nos tempos 2, 6 e 10 h, os cupons foram retirados e mergulhados em 10 mL de água peptonada tamponada (Difco<sup>®</sup>), durante 1 min, para remoção das células planctônicas. Em seguida, o cupom foi transferido para um tubo com 5 mL de água peptonada tamponada (Difco<sup>®</sup>) e homogeneizado em agitador de tubos tipo *vortex* (Scientific Industries<sup>®</sup>) na velocidade máxima, durante 2 min, para remoção das células aderidas (RIEU, 2008).

A adesão bacteriana foi avaliada pelo método de contagem em placas. O número de UFC recuperado de cada cupom foi determinado por plaqueamento de diluições apropriadas em placas com ágar BHI (Acumedia<sup>®</sup>) incubadas em estufa (Fanem<sup>®</sup>) a 37 °C por 48 h. O número de unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado (UFC.cm<sup>-2</sup>) foi determinado usando a fórmula, abaixo, onde, Y representa as unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado (UFC.cm<sup>-2</sup>); V<sub>D</sub> o volume do diluente usado na remoção das células planctônicas (mL); V<sub>A</sub> o volume da alíquota utilizada no plaqueamento (mL); M a média da contagem obtida nas placas (UFC); D a diluição realizada e A a área do cupom (cm).

$$Y = \frac{(V_D/V_A) \times M \times D}{A}$$

Após a determinação do número de células aderidas em UFC.cm<sup>-2</sup> os dados foram transformados em logaritmo UFC.cm<sup>-2</sup> (log UFC.cm<sup>-2</sup>).

### 3. 3. Validação do modelo

Após o estabelecimento dos modelos de superfície de resposta, novas condições, dentro do intervalo do modelo, foram escolhidas aleatoriamente para a validação. A mesma cultura, *S. aureus*, ATCC 6538, foi utilizada nos experimentos elaborados a partir das novas condições escolhidas (Tabela 3).

Os valores preditos da adesão de *S. aureus* foram obtidos considerando as três superfícies, AIN, PU e PVC, nas novas condições estudadas com base no modelo gerado previamente. Esses valores foram contrastados com os valores observados obtidos por meio do experimento de validação mostrado na Tabela 3. A comparação entre os valores preditos e observados foi realizada por meio do cálculo de dois índices de validação de modelos preditivos instituídos por Ross (1996), o fator bias (*fb*) e o fator exatidão (*fe*), empregando-se as fórmulas abaixo, onde, *fb* representa o fator bias; *fe* o fator exatidão; *pred* o valor observado; *obs* o valor observado e *n* o número de observações realizadas.

$$fb = 10^{\left(\frac{\sum \log(pred/obs)}{n}\right)}$$

$$fe = 10^{\left(\frac{\sum |\log(pred/obs)|}{n}\right)}$$

Tabela 3. Experimento de validação do modelo gerado para as superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila.

Superfícies		Fatores			
		Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Tempo de contato (h)
AIN	1	45	5,9	-	4
	2	25	5,9	-	8
	3	45	5,9	-	8
	4	25	6,6	-	8
	5	25	6,6	-	4
	6	25	5,9	-	4
	7	45	6,6	-	4
	8	45	6,6	-	8
PU	1	25	-	5	8
	2	25	-	3	4
	3	25	-	5	4
	4	25	-	3	8
	5	25	-	3	8
	6	25	-	5	8
	7	25	-	5	4
	8	25	-	3	4
PVC	1	25	5,9	3	4
	2	25	6,6	5	4
	3	25	6,6	3	8
	4	45	5,9	3	8
	5	45	6,6	5	8
	6	45	5,9	5	4
	7	25	5,9	5	8
	8	45	6,6	3	4

AIN = Aço inoxidável 304; PVC = Cloreto de polivinila; PU = poliuretano.

### 3. 4. Análise da expressão gênica de *S. aureus*

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada para avaliar a expressão dos genes *icaD*, *icaR* e *atl* na linhagem de *S. aureus*, ATCC 6538, em doze condições compreendidas no intervalo do estudo de adesão: temperatura (15, 35 e 42 °C), pH (5,5, 6,25 e 7,0) concentração de NaCl (2, 4 e 6 %) e concentração de NaNO<sub>2</sub> (50, 110 e 170 mg.L<sup>-1</sup>). O gene *gyrB* foi utilizado como gene de referência (Tabela 4).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a avaliação da expressão gênica de *S. aureus*

Gene	Sequência 5' → 3'	Referência
<i>icaD</i>	GGGTGGATCCTTAGTGTTACAATTTT TGACTTTTTGGTAATTCAAGGTTGTC	KOREM et al, 2010
<i>icaR</i>	TTGCGAAAAGGATGCTTTCA GATAAAGATGACAAAAGAAGACTTTTCAG	KOREM et al, 2010
<i>atl</i>	GCCTGTTGCAAAGTCAACAA CACCGACACCCCAAGATA AG	MCLAUGHLIN e HOOGWERF, 2006
<i>gyrB</i>	AGTAACGGATAACGGACGTGGTA CCAACACCATGTAAACCACAGAT	RODE et al, 2007

### 3. 4. 1. Extração do RNA total

*S. aureus* foi inoculado em, meio base, caldo BHI (Acumedia<sup>®</sup>) modificado pela adição de 2, 4 e 6 % de NaCl; 50, 110 e 170 mg.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub>; ajuste de pH 5,50, 6,25 e 7,00; e temperatura de 15, 35 e 42 °C. Cada condição foi avaliada individualmente, sendo a temperatura de incubação 35 °C em todos os tratamentos, com exceção dos tratamentos em que se desejava avaliar o efeito da temperatura. As extrações foram realizadas em triplicata, totalizando 36 extrações.

O volume de 1,5 mL da cultura foi centrifugado (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) a 6000 x g, durante 5 min quando a densidade óptica (DO) atingiu 0,9. O centrifugado foi ressuscitado em 300 µL de tampão TE (10 mM de TRIS-HCl (Sigma<sup>®</sup>) e 1mM de EDTA (Sigma<sup>®</sup>) com adição de 10 µL lisozima (50 mg.mL<sup>-1</sup>) (UBS<sup>®</sup>) e 2,5 µL de lisostafina (5 mg.mL<sup>-1</sup>) (Sigma<sup>®</sup>). Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C em banho-maria (Nova Ética<sup>®</sup>) por 40 min, invertendo-se os tubos periodicamente durante o período de incubação. Novamente, o material foi centrifugado (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) a 5000 x g, por 6 min, e o sobrenadante removido, sendo adicionado posteriormente ao centrifugado 500 µL de Tri-Reagent (Sigma<sup>®</sup>) e 100 µL de clorofórmio (Sigma<sup>®</sup>) refrigerado. O material foi cuidadosamente homogeneizado e em seguida submetido a centrifugação (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) a 13000 x g, por 20 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde

adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Sigma<sup>®</sup>) e 250  $\mu\text{L}$  de solução de precipitação (0,8 M citrato de sódio (Sigma<sup>®</sup>) + 1,2 M de cloreto de sódio (Fluka<sup>®</sup>). Após homogeneização o material foi mantido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por, aproximadamente, 12 h e em seguida centrifugado (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) a  $13000 \times g$ , por 10 min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % (Sigma<sup>®</sup>) e nova centrifugação (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) foi realizada a  $13000 \times g$ , por 5 min. O etanol foi cuidadosamente removido e após secagem total do centrifugado, o mesmo foi ressuspenso em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) (Amresco<sup>®</sup>), incubado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria (Hemoquímica<sup>®</sup>), por 10 min e estocado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3. 4. 2. Quantificação do RNA e tratamento com Dnase**

O RNA extraído das amostras foi quantificado em espectrofotômetro UV Evolution 60 (Thermo Scientific<sup>®</sup>). A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1 % (Uniscience<sup>®</sup>) por meio do sistema de eletroforese horizontal submersa. Em seguida o RNA foi tratado com a enzima Dnase (Promega<sup>®</sup>). A reação foi composta por 0,4  $\mu\text{L}$  de Dnase, 1  $\mu\text{L}$  de tampão que acompanha a enzima e 2  $\mu\text{g}$  de RNA. A reação foi realizada em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , sendo o volume completado com água livre de Rnase. O material foi homogeneizado e incubado à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria (Nova Ética<sup>®</sup>), por 50 min. Transcorrido o tempo de incubação foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  da solução neutralizante da enzima e as amostras foram incubadas à  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria (Hemoquímica<sup>®</sup>), por 10 min.

A eficiência da reação foi verificada por meio de reação da PCR com oligonucleotídeo do gene 16S, a fim de confirmar a ausência de contaminação por DNA total bacteriano. As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1 % (Uniscience<sup>®</sup>).

### **3. 4. 3. Síntese de cDNA**

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada por meio do kit *Improm-II Reverse Transcription System* (Promega<sup>®</sup>) conforme instruções do fabricante. Alíquotas de 1  $\mu\text{g}$  do RNA total extraído nas diferentes condições de

crescimento foram incubadas com 1 µL de oligonucleotídeo randômico, a 70 °C por 5 min e, logo após, incubadas a 4 °C, por 5 min. Em seguida foi adicionado tampão de reação *ImPromII* 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, mistura de dNTPs (0,5 mM de cada), 1 U/µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNasin* e a enzima transcriptase reversa *ImpromII* (200 U). As amostras foram incubadas a 25 °C, por 5 min, para anelamento dos oligonucleotídeos, 42 °C, por 60 min para extensão da fita de DNA e a 70 °C, por 15 min, para inativação da transcriptase. Os cDNAs obtidos foram armazenados a -20 °C.

#### 3. 4. 4. PCR quantitativo em tempo real

As reações em tempo real foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems®). Com base nos valores de Ct (*Cycle threshold*) foi realizada a quantificação relativa pelo método 2- $\Delta\Delta$ Ct descrito por Livak e Schmittgen (2001). A reação foi realizada com o kit *SYBR Green PCR-Master Mix* (Applied Biosystems®), sendo o gene *gyrB* utilizado como controle endógeno (RODE et al, 2007). As amostras foram analisadas em duas repetições biológicas, quantificadas em experimentos independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação. As análises de quantificação relativa pelo método comparativo de cada gene foram feitas em tubos individuais.

Foram realizados experimentos para determinação da concentração ótima de oligonucleotídeo e da eficiência da reação. Os componentes de cada reação foram 3,6 µL de cDNA, 6,0 µL de 2X *SYBR Green PCR-Master Mix* (Applied Biosystem) e oligonucleotídeos nas concentrações de 100, 200, 400 e 600 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> do cDNA. Para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (CAR) foi utilizada a fórmula: Eficiência PCR = (10<sup>(1/-CAR)</sup> - 1) 100. As condições de amplificação para todos os sistemas foram 50 °C, por 2 min, 95 °C, por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C, durante 30 seg e anelamento e extensão a 60 °C, durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1 °C, durante 30 seg, partindo-se de 60 °C, até 94 °C.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4. 1. Adesão de *S. aureus* em aço inoxidável

*S. aureus* aderiu à superfície de AIN nas diferentes condições de cultivo avaliadas neste estudo, mas esta adesão variou ( $p < 0,05$ ) com a modificação de pH, temperatura e tempo de contato (Figura 1). A equação de regressão do modelo ajustado, abaixo, descreve a adesão do micro-organismo em aço inoxidável em função dos fatores estudados ( $R^2$  80,5 %). Onde, y representa a adesão; A a temperatura; B o pH; e E o tempo de contato:

$$y = 4,1592 + 0,3951A - 1,7050B - 1,9835E - 0,0061A^2 - 0,0498E^2 + 0,4592BE$$

A maior adesão de *S. aureus* em superfície de AIN observada experimentalmente à 35 °C pode ser em razão da maior multiplicação celular nesta temperatura. *S. aureus* é bactéria mesofílica com ótimo de crescimento a 37 °C (NEWSOME e STEWART, 2004). Morton et al (1998) relataram que, indiferente da espécie ou superfície utilizada, a adesão ocorre em máxima intensidade quando micro-organismos crescem na temperatura ótima. Resultado semelhante ao deste estudo foi encontrado por Marques et al (2007) que avaliaram a adesão de *S. aureus* em superfície de AIN e vidro. Segundo esses autores, a temperatura de 37 °C pode ter sido um dos fatores que influenciaram o processo de adesão observado. Entretanto, na formação de biofilme por micro-organismos diferentes de *S. aureus*, outros autores verificaram que algumas espécies têm alta produção de biofilme na temperatura ótima de crescimento, enquanto outras bactérias apresentam maior formação do biofilme em temperaturas diferentes da ótima de crescimento (CARPENTIER e CERF, 1993; STEPANOVIC et al, 2003).

*S. aureus* também aderiu em temperaturas sub-ótimas de crescimento. Os mecanismos que promovem a adesão e formação de biofilmes em condições sub-ótimas de temperatura ainda não são bem compreendidos. Stepanovic et al (2003) propõem que o aumento da formação de biofilme por *Salmonella* Typhimurium a 30 °C pode ser explicado pela produção de fímbrias. Em *L. monocytogenes*, a temperatura parece afetar as propriedades hidrofílicas da superfície celular e aumentar a formação de biofilme (CHAVANT

et al, 2002). Baixas temperaturas aumentam as propriedades hidrofílicas da célula e alteram a adesão da bactéria em materiais hidrofóbicos como o AIN (RODE et al, 2007). O material padrão utilizado em indústria de alimentos (AISI 304) tem sido amplamente conhecido por ser uma superfície capaz de permitir a adesão de *S. aureus* (OULAHAL et al, 2008).

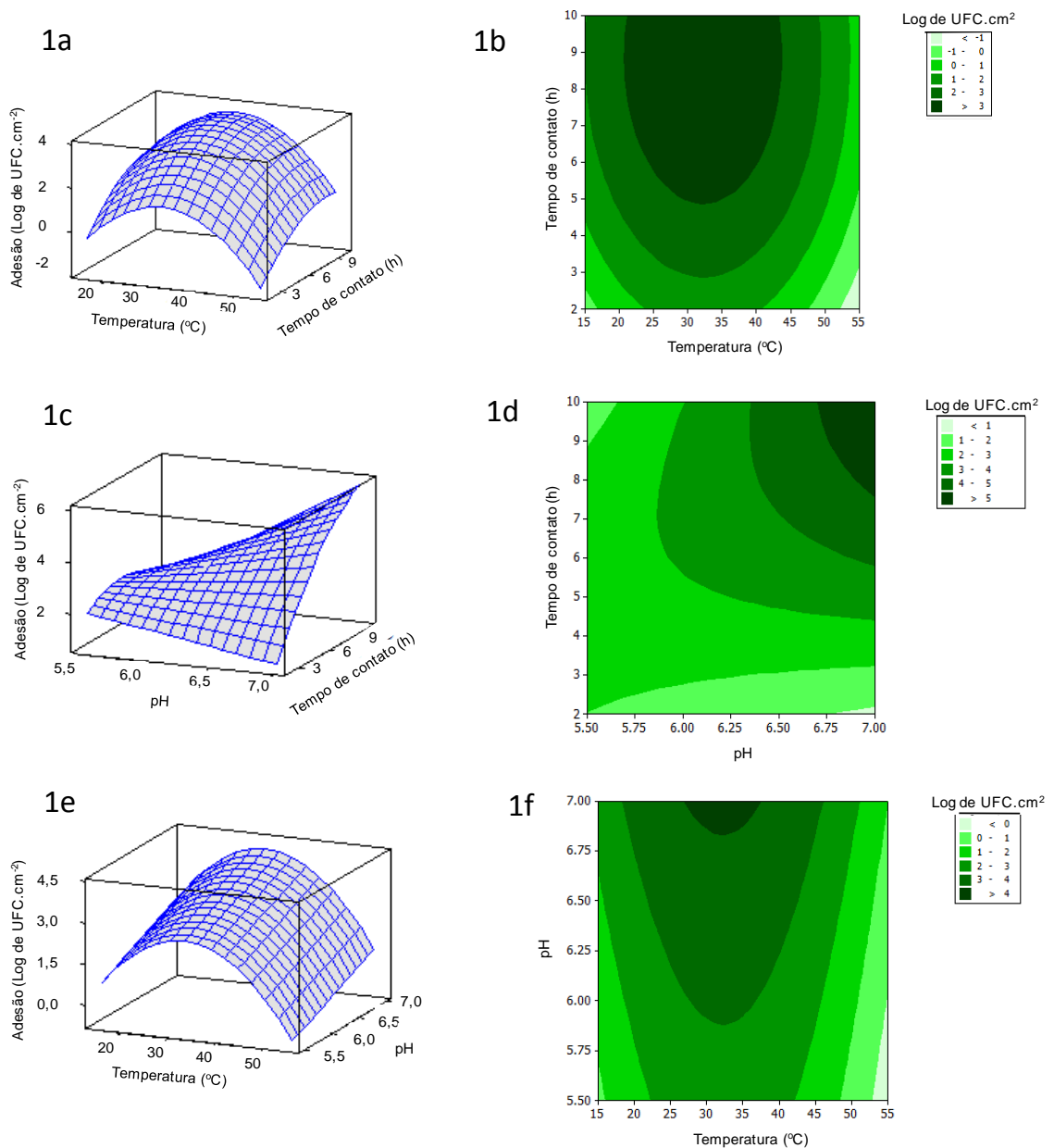


Figura 1. Gráficos de superfície de resposta (1a, 1c e 1e) e de contorno (1b, 1d e 1f) da adesão de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável 304 (AIN): 1a e 1b) temperatura em função do tempo de contato, onde o pH do tratamento foi mantido constante em 6,25; 1c e 1d) pH em função do tempo de contato, onde a temperatura do tratamento foi mantida constante à 35 °C; 1e e 1f) temperatura em função do pH, onde o tempo de contato do tramento foi mantido constante por 6h.

Há evidências de que a superfície de AIN favorece a adesão de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos tais como *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *P. fragi* e *P. fluorescens* (HOOD e ZOTTOLA, 1997).

Quando fixou-se o pH em 6,25, a maior adesão de *S. aureus* (3,05 log UFC.cm<sup>-2</sup>) foi observada após 5 h de contato com a superfície de AIN (Figuras 1a e 1b). Após este tempo de contato das células com a superfície, já atuam no processo de adesão interações fortes e irreversíveis. Quando o tempo de contato é curto, menor do que 2 h, os micro-organismos estão ligados tanto entre si quanto à superfície por interações fracas (BERESFORD et al, 2001).

Os dados também permitem observar o comportamento do micro-organismo em outros valores de pH. Em pH 7,0, que é considerado o ótimo de crescimento de *S. aureus* (NEWSOME e STEWART, 2004) e tempo de contato de 10 h, verificou-se que *S. aureus* apresentou maior adesão (5,85 log UFC.cm<sup>-2</sup>) em superfície de AIN. Os valores de pH inferiores a 7 proporcionaram uma menor adesão microbiana sobre a superfície nos tempos de contato estudados. A maior adesão ocorreu à medida que o tempo de contato e o pH aumentaram (Figuras 1c e 1d). Da mesma forma que a adesão de *S. aureus* em superfície de AIN ocorreu em curto tempo de contato, a transferência desse micro-organismo do alimento para esta superfície também pode acontecer. MALHEIROS et al (2010) verificaram que cubos de carne de frango contaminados com 7 log UFC.cm<sup>-2</sup> de *S. aureus*, foram capazes de transferir, em tempo, equivalente a 10 s e 10 min, aproximadamente, 4 log UFC.cm<sup>-2</sup> quando mantidos em contato com cupons de AIN e de polietileno.

A temperatura em torno de 35 °C também proporcionou maior adesão do micro-organismo em diferentes valores de pH. O distanciamento das condições ótimas de pH resultaram em diminuição da adesão (Figuras 1e e 1f). Isso confirma que o pH do meio de cultura pode ter influência na adesão do micro-organismo em superfícies inertes. Mozes et al (1987) demonstraram que a hidrofobicidade da superfície de vidro e polímeros variam com o pH da solução utilizada no procedimento de limpeza. Hamadi et al (2009) avaliaram seis valores diferentes de pH entre 2 e 11 e verificaram que o pH da solução tem influência no estabelecimento de cargas das superfícies de vidro e teflon. Os resultados por eles encontrados mostraram que a superfície de vidro foi hidrofílica em pH 5,0 e pH 9,0 e hidrofóbica em outros valores de pH e que a

superfície de teflon foi hidrofóbica em todos os valores de pH avaliados. Ao contrário do obtido no presente estudo, esses autores também observaram que, a adesão de *S. aureus* ao vidro pode ser máxima em pH 11 e mínima em pH 6,5 e no teflon, máxima em pH 5 e mínima em pH 3. Esses autores sugeriram que o tratamento da superfície com solução muito alcalina e solução moderadamente ácida no processo de limpeza e desinfecção pode favorecer e desfavorecer a adesão de *S. aureus* ao vidro, respectivamente. Em contraste, o tratamento com solução moderadamente ácida pode facilitar a adesão em teflon.

A alta carga elétrica do vidro foi relacionada com o favorecimento da formação de biofilmes quando comparada com o AIN (MARQUES et al, 2007). A superfície de AIN representa um modelo de formação de biofilme em material hidrofóbico (MORETRO et al, 2003). No entanto, além da hidrofobicidade e carga elétrica da superfície do material e do micro-organismo, são numerosos os fatores que podem estar envolvidos no mecanismo de adesão; microtopografia da superfície, concentração microbiana; apêndices celulares, bem como fímbrias, pili e flagelos; síntese de substância polimérica extra celular; características do alimento, bem como pH, potencial redox,  $A_w$ , tempo e temperatura de contato; e fluxo e turbulência (CARELI et al, 2009).

#### **4. 2. Adesão de *S. aureus* em poliuretano**

A concentração de  $\text{NaNO}_2$  e a temperatura não alteraram a adesão ( $p > 0,05$ ) de *S. aureus* na superfície de PU. A equação de regressão do modelo ajustado, abaixo, descreve a adesão do micro-organismo em poliuretano em função dos fatores estudados ( $R^2$  78,2 %). Onde, y representa a adesão; A a temperatura; B o pH; C a concentração de NaCl e E o tempo de contato:

$$y = 1,4200 + 0,4625A - 1,1308B - 0,3466C - 2,1013E - 0,0068A^2 + 0,3908BE$$

O efeito concomitante da redução da concentração de NaCl e o aumento do pH promoveu aumento da adesão de *S. aureus* nesta superfície (4,24 log UFC.cm<sup>-2</sup>). Em pH próximo a 7 o *S. aureus* foi capaz de aderir ao PU na presença das concentrações de NaCl de até 6 % (3,13 log UFC.cm<sup>-2</sup>) (Figuras 2a e 2b). O efeito do NaCl na formação do biofilme tem sido observado não somente na fase inicial de adesão como no presente estudo. Rachid et al

(2000) observaram que a alta osmolaridade, bem como alta concentração de NaCl estimulam a formação do biofilme.

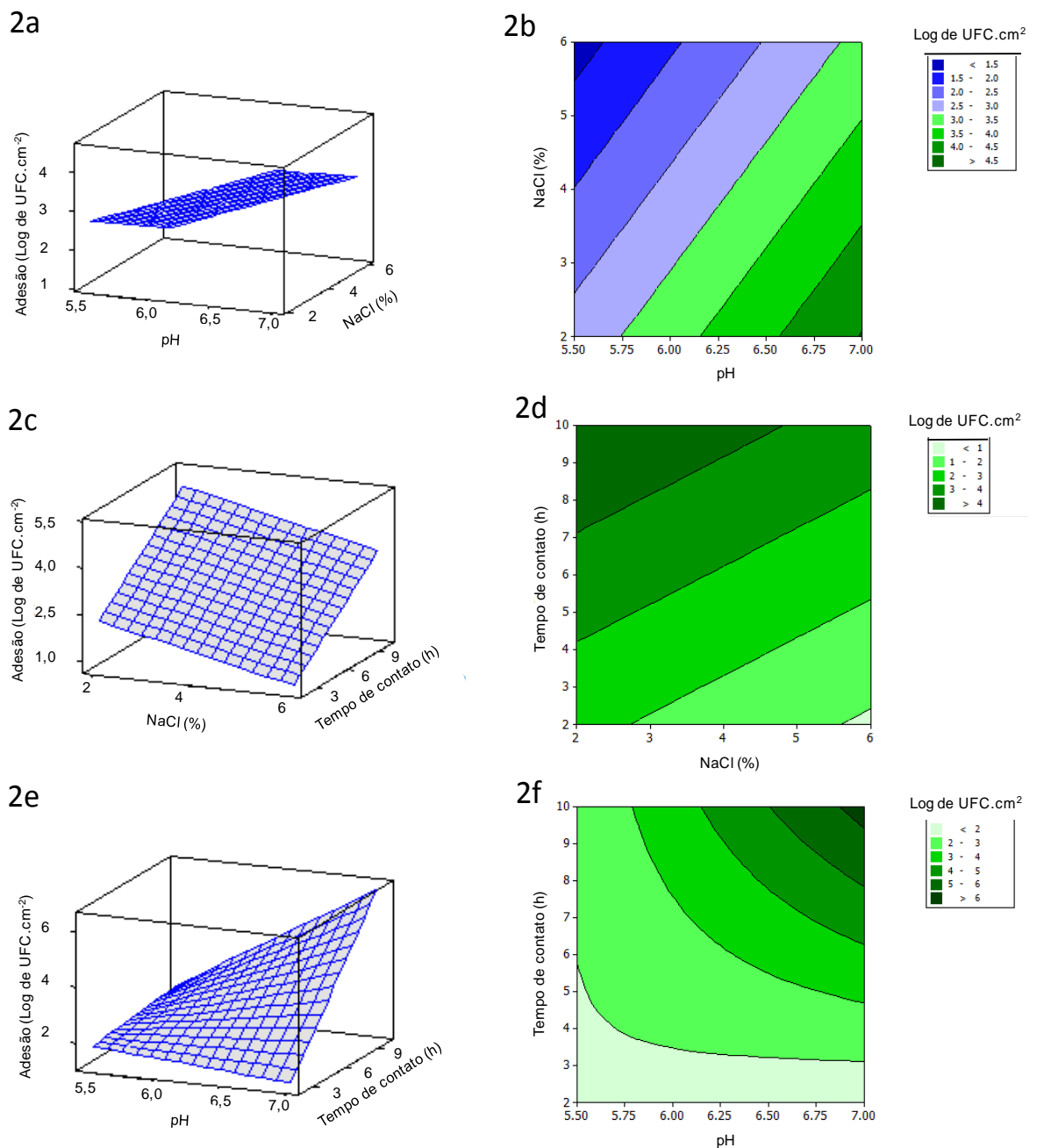


Figura 2. Gráficos de superfície de resposta (2a, 2c e 2e) e de contorno (2b, 2d e 2f) da adesão de *S. aureus* em superfície de poliuretano (PU): 2a e 2b) pH em função da concentração de NaCl, onde tempo de contato do tratamento foi mantido constante em 6 h; 2c e 2d) concentração de NaCl em função do tempo de contato, onde o pH do tratamento foi mantido constante em 6,25; 2e e 2f) pH em função do tempo de contato, onde a concentração de NaCl do tratamento foi mantida constante em 4 %.

A adesão foi maior com o aumento do tempo de contato do micro-organismo com a superfície ( $4,97 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ). A concentração de NaCl interferiu, em menor proporção, nesta resposta, pois ocorreu menor diminuição da adesão com o aumento da concentração de NaCl ( $3,59 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ) (Figuras 2c e 2d). Estudos prévios demonstraram que a adesão e formação de biofilmes por diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. pode ser afetada pela concentração de NaCl. Moretro et al (2003) encontraram que a densidade celular do biofilme foi máxima em concentrações de NaCl tão altas como  $30 \text{ g.L}^{-1}$  em *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* e *S. epidermidis*. Planchon et al (2006) não observaram aumento da adesão de *Staphylococcus xylosus* em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. Porém, foi verificado que a adição de NaCl ao meio de cultura em concentrações de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  favorece o crescimento do biofilme formado por *S. xylosus* nas superfícies de AIN e politetrafluoretileno. Herrera et al (2007) simularam a adesão de *S. aureus* em superfície de polipropileno coberta por filme de resíduos do processamento de caldo de mexilhão cozido (MCJ), produto com alta concentração de sal ( $42,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Segundo esses autores, embora *S. aureus* seja altamente resistente a baixas atividades de água, essa concentração de sal implica em um estresse adicional para as células, o que contribui para o padrão de biofilme produzido. Nesse estudo a adesão aumentou exponencialmente durante 25 h na presença de MCJ, não apresentando diminuição após 10 a 15 h como observado nos meios PBS (Tampão salina fosfato) e TSB suplementado com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose.

Quando avaliado o tempo de contato das células em substrato com diferentes valores de pH verificou-se que o aumento de ambos os fatores promovem maior adesão de *S. aureus* em superfície de PU (Figuras 2e e 2f). A maior adesão ocorreu nos maiores níveis dos fatores estudados, ou seja, 10 h de contato e pH 7 ( $6,35 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ). Embora acima do pH 6 e após 6 h de contato do micro-organismo com a superfície de PU esta resposta foi observada com maior intensidade ( $3,84 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ) (Figuras 2e e 2f). O menor número de células de *S. aureus* aderidas nesta superfície verificada em pH 5,5 (Figuras 2e e 2f) pode ser em virtude da redução da taxa de crescimento da cultura devido ao choque ácido. Em geral, as bactérias possuem uma série de mecanismos de defesa para lidar com súbita queda do pH do ambiente. A forma mais direta é a utilização de bombas de prótons, onde

os prótons são literalmente bombardeados para fora da célula e o pH interno da célula é mantido em nível aceitável. Outro mecanismo é o aumento da concentração de compostos alcalinos dentro da célula. Entretanto, na formação do biofilme, os mecanismos de resistência ao ácido podem ser afetados. Nessa condição, as vias metabólicas são alteradas devido ao direcionamento da energia de crescimento para os mecanismos de defesa (BORE et al, 2007).

Em produtos cárneos fermentados pela adição de culturas iniciadoras à formulação, é recomendado que um pH de 5,3 ou menos seja alcançado dentro de um curto intervalo de tempo. Esta medida baseia-se na afirmação que a multiplicação de *S. aureus* pode ser efetivamente controlada em pH abaixo de 5,3 (NASSU et al, 2002). Os dados obtidos no presente estudo sugeriram que esta medida pode ser também importante para inibir a adesão desse micro-organismo na superfície de PU.

A superfície de poliuretano tem sido alvo de muitos estudos de adesão de *S. aureus* na área médica, uma vez que esse material serve de matéria prima na composição de cateteres venosos que estão constantemente envolvidos em sepse causada por *S. aureus* (JOHN et al, 1996; FLEMMING et al, 2000; BALABAN et al, 2003; DONELLI, et al, 2007). Entretanto, não foram encontrados estudos na literatura envolvendo essa superfície em condições que simulem o processamento de alimentos.

#### **4. 3. Adesão de *S. aureus* em cloreto de polivinila**

A adesão de *S. aureus* à superfície de PVC foi influenciada ( $p < 0,05$ ) pela variação de temperatura, pH, concentração de NaCl e tempo de contato (Figura 3). A equação de regressão do modelo ajustado, abaixo, descreve a adesão do micro-organismo em cloreto de polivinila em função dos fatores estudados ( $R^2$  80,6 %). Onde, y representa a adesão; A a temperatura; B o pH; C a concentração de NaCl; D a concentração de  $\text{NaNO}_2$  e E o tempo de contato:

$$y = -57,6676 + 0,3862A + 14,7221B + 0,9898C + 0,0280D + 0,9600E - 0,0059A^2 - 1,1237B^2 - 0,1574C^2 - 0,0002D^2 - 0,0490E^2$$

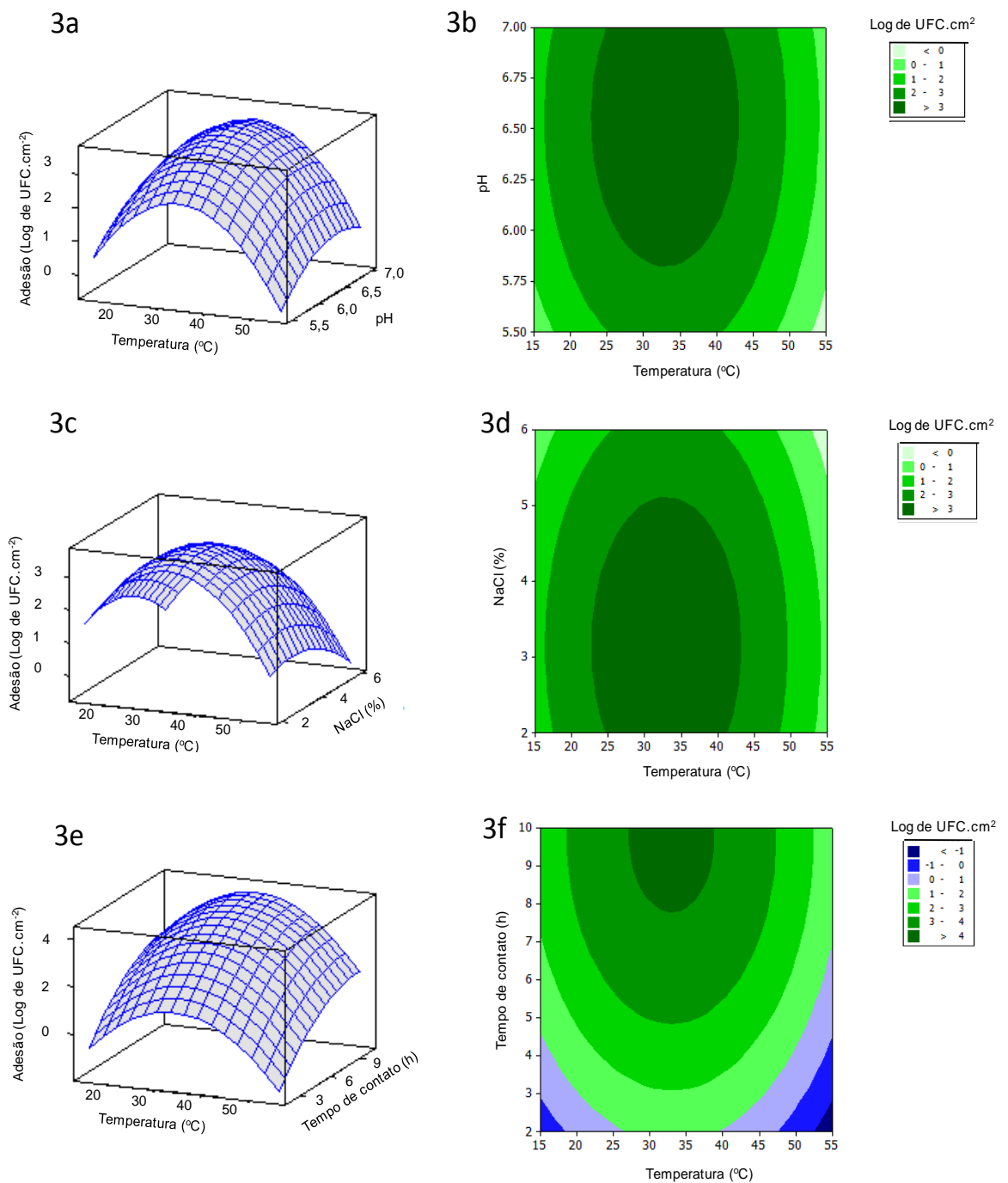


Figura 3. Gráficos de superfície de resposta (3a, 3c e 3d) e de contorno (3b, 3d e 3f) da adesão de *S. aureus* em superfície de cloreto de polivinila (PVC): 3a e 3b) temperatura em função do pH, onde a concentração de NaCl (4 %) e o tempo de contato (6 h) do tratamento foram mantidos constantes; 3c e 3d) temperatura em função da concentração de NaCl, onde o pH (6,25) e o tempo de contato (6h) do tratamento foram mantidos constantes; 3e e 3f) temperatura em função do tempo de contato, onde o pH (6,25) e a concentração de NaCl (4 %) do tratamento foram mantidos constantes.

A maior adesão do micro-organismo ( $3,57 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ) foi observada experimentalmente, em pH e temperatura em torno de 6,5 e  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (Figuras 3a e 3b). Embora *S. aureus* não tenha aderido em temperaturas acima de  $48 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figuras 3a e 3b), esta temperatura necessariamente não inativa o micro-organismo. Yang et al (2001) demonstraram que em 3 h de armazenamento de ovos cozidos à  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$  contaminados com *S. aureus*, a cultura manteve-se viável, com redução de 4 ciclos log. Cebrián et al (2010) observaram que células de *S. aureus* submetidas à 2 h de adaptação em temperatura de  $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$  aumentaram a resistência à estresses ambientais em seis vezes, em comparação ao grupo controle. Após o choque térmico as células apresentaram maior resistência ao peróxido de hidrogênio e ao pH ácido. Porém, essa resistência não foi somente atribuída à síntese de proteínas do choque térmico, segundo eles a resistência pode ser devido a modificações da permeabilidade da membrana e propriedades de superfície, o que pode também influenciar a adesão de *S. aureus* em superfícies inertes. A não determinação das células planctônicas, no presente estudo, não permitiu identificar se a associação dos outros fatores de estresse à alta temperatura influenciaram a viabilidade de *S. aureus* no período estudado.

Embora o aumento da concentração de NaCl favoreça a adesão de *S. aureus* em PVC, a maior adesão ( $3,57 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ) torna-se limitada ao máximo de 4 % de NaCl. Dados semelhantes podem ser observados com o pH, em valores entre 6,25 e 7,00, a adesão é maior ( $3,68 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ) e regride com a diminuição desses níveis (Figuras 4a e 4b).

No processo de adesão ilustrado nas Figuras 4c e 4d observa-se que o aumento do tempo de contato torna *S. aureus* menos susceptível, em relação ao pH. Após 9 h de contato, por exemplo, o micro-organismo apresenta maior número de células aderidas em todos os valores de pH estudados. No entanto, com 5 h de contato e pH acima de 6,25 a adesão ocorreu com maior intensidade ( $3,16 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ ) (Figuras 4c e 4d). De forma similar ao presente estudo, Hood e Zottola (1997) relataram que o número de células aderidas de *S. aureus* aumenta com o tempo e após 3 h de contato do micro-organismo com a superfície pode ser observada a adesão.

A adesão de *S. aureus* em PVC aumentou de forma proporcional ao aumento do tempo de contato e do pH. A maior adesão ( $4,27 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ )

ocorreu em pH 6,5 e de tempo de contato de 10 h, aproximadamente (Figuras 4c e 4d). No processamento de salame tipo italiano, um valor de pH considerado seguro deve ser alcançado em um determinado período de tempo a fim de que o crescimento de micro-organismos patogênicos no produto seja evitado. Falhas no processo, como retardo na fermentação e a obtenção de valores elevados de pH no produto final, podem permitir a proliferação de agentes patogênicos responsáveis por surto de doenças de origem alimentar envolvendo embutidos fermentados, tais como *S. aureus* (MACIEL et al, 2003). Os resultados do presente estudo indicam que tal afirmação também se torna relevante na adesão de *S. aureus* sobre a superfície de PVC, onde se constatou que pH elevado e maior tempo de contato também favorecem a adesão do micro-organismo à esta superfície.

Resultado semelhante ao anterior pode ser notado nas Figuras 5e e 5f, onde o aumento do tempo de contato também promove a adesão de *S. aureus*. Entretanto, o aumento da concentração de NaCl somente contribui para o processo de adesão até valores de 4,5 % ( $3,99 \log \text{UFC.cm}^{-2}$ ), concentrações superiores a essa resultam em redução da adesão do micro-organismo em superfície de PVC ( $3,01$ ).

O tempo de contato de 10 h e a concentração de 3 % de NaCl garantem a condição máxima da adesão ( $4,27 \log \text{UFC.cm}^{-2}$ ) de *S. aureus* em superfície de PVC (Figuras 4e e 4f).

A adesão de *S. aureus* em superfície de PVC, assim como em superfície de PU, tem ganhado maior destaque em pesquisas na área médica (ZHANG et al, 2006; ASADINEZHAD et al, 2010).

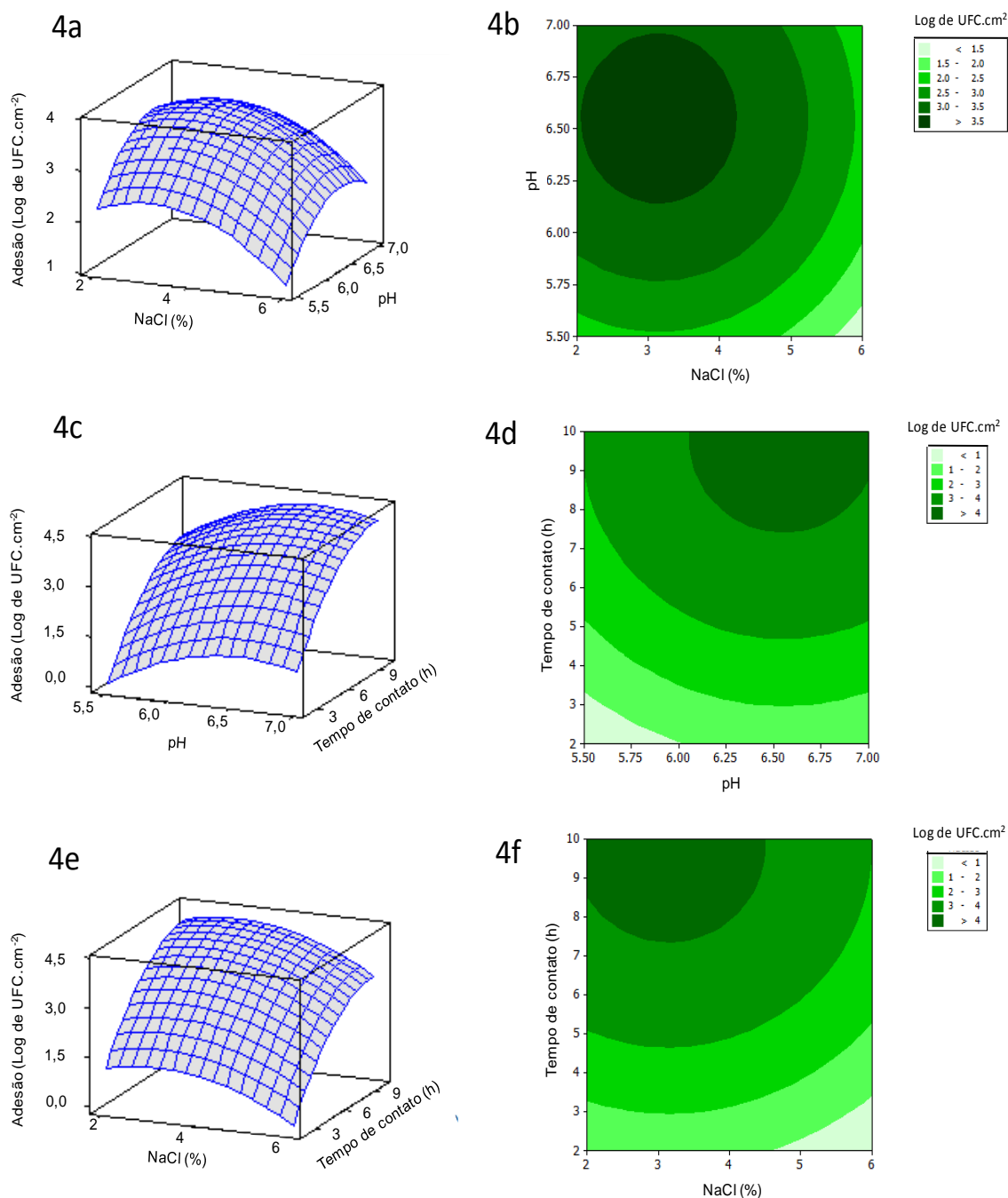


Figura 4. Gráficos de superfície de resposta (4a, 4c e 4e) e de contorno da adesão de *S. aureus* em superfície de cloreto de polivinila (PVC): 4a e 4b) concentração de NaCl em função do pH, onde a temperatura (35 °C) e o tempo de contato (6h) foram mantidos constantes; 4c e 4d) pH em função do tempo de contato, onde a temperatura (35 °C) e a concentração de NaCl (4 %) foram mantidas constantes; 4e e 4f) concentração de NaCl em função do tempo de contato, onde a temperatura (35 °C) e o pH (6,25) foram mantidos constantes.

#### 4. 4. Modelo da adesão de *S. aureus*

As variáveis utilizadas no presente estudo explicaram as respostas nas três superfícies analisadas (Tabela 5). Segundo Chauhan e Gupta (2004), em geral, valores de coeficiente de determinação  $R^2$  maiores que 75 % indicam bom ajuste do modelo quadrático aos resultados experimentais. Resultado semelhante ao encontrado nesta pesquisa foi encontrado por Morelli (2008) ao avaliar a adesão de *E. coli* O157:H7. As variáveis independentes, tempo e temperatura, incluídas no modelo de superfície de resposta construído por esse autor explicaram 77 % e 82 % da adesão desse micro-organismo em superfície de AIN e PVC, respectivamente.

Pérez-Rodríguez et al (2007) desenvolveram modelos de logaritmo linear e Weibull para descrever a transferência de *S. aureus* e *E. coli* da lâmina de AIN da máquina de corte contaminada, para fatias de carne de porco, que apresentaram ajuste adequado aos dados, sendo o coeficiente de determinação similar ao encontrado no presente estudo ( $R^2$  em torno de 73 %). Pesquisas relacionadas à construção de modelos de predição da adesão de *S. aureus* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos não estão disponíveis na literatura.

Tabela 5. Equação de regressão do modelo ajustado das superfícies: aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila

Superfícies	Modelo ajustado	$R^2$ (%)
AIN	$y = 4,1592 + 0,3951A - 1,7050B - 1,9835E - 0,0061A^2 - 0,0498E^2 + 0,4592BE$	80,5
PU	$y = 1,4200 + 0,4625A - 1,1308B - 0,3466C - 2,1013E - 0,0068A^2 + 0,3908BE$	78,2
PVC	$y = -57,6676 + 0,3862A + 14,7221B + 0,9898C + 0,0280D + 0,9600E - 0,0059A^2 - 1,1237B^2 - 0,1574C^2 - 0,0002D^2 - 0,0490E^2$	80,6

$y$  = adesão; A = Temperatura; B = pH; C = Concentração de NaCl; D = Concentração de NaNO<sub>2</sub>; E = Tempo de contato (em horas).

AIN = Aço inoxidável; PU = Poliuretano; PVC = Cloreto de polivinila

O modelo de superfície de resposta também permitiu identificar os níveis, dentro do intervalo estudado, que promovem o maior e o menor número de células aderidas, como mostrado na Tabela 6. Os resultados obtidos por meio dessa análise indicaram que os valores de temperatura e pH que

promovem a maior adesão de *S. aureus* estão próximos dos valores considerados ótimos para o crescimento do micro-organismo (NEWSOME e STEWART, 2004; JOFRÉ et al, 2008; BAEZA et al, 2009;). Além disso, a concentração de NaCl que afeta a adesão variou conforme a superfície utilizada. Outro ponto importante se diz respeito ao tempo de contato ótimo para adesão do micro-organismo que, como bem estabelecido, à medida que o tempo de contato aumenta a adesão se torna mais intensa (HOOD e ZOTTOLA, 1997). No caso do presente estudo, o tempo de contato que promoveu o maior número de células aderidas foi o maior tempo estudado, isto é 10 h. Foi possível notar que em temperaturas de 15 °C e 55 °C, empregadas neste estudo, curto tempo de contato, diferentes valores de pH e concentrações de NaCl o micro-organismo apresentou menor número de células aderidas sobre as superfícies (Tabela 6).

Tabela 6. Combinação dos fatores estudados que maximizam e minimizam a adesão de *S. aureus* sobre as superfícies de processamento de alimentos

Superfície	Efeito	Fatores					Adesão (log UFC.cm <sup>-2</sup> )
		T (°C)	pH	NaCl (%)	Tempo de contato (h)		
AIN	Máximo de adesão	32	7,0	-	10	5,95	
PU		-	7	2	10	7,02	
PVC		33	6,6	3	10	4,21	
AIN	Mínimo de adesão	55	7	-	2	AND	
		15	7	-	2	AND	
PU		-	7	6	2	AND	
		-	7	6	2	AND	
PVC		55	5,50	2	2	AND	
		15	7	6	2	AND	

T = temperatura; t = tempo; AIN: Aço inoxidável 304; PVC = Cloreto de polivinila; PU = poliuretano; AND = adesão não detectada.

As concentrações de NaNO<sub>2</sub> utilizadas no presente estudo não afetaram (p > 0,05) a adesão de *S. aureus* em nenhuma das três superfícies avaliadas. Este resultado sugere que o NaNO<sub>2</sub>, amplamente utilizado na indústria de produtos cárneos como conservante, não interfere na adesão de *S. aureus* nestas superfícies. O presente estudo foi conduzido com concentrações de NaNO<sub>2</sub> próximas às permitidas pela legislação brasileira (150 mg.Kg<sup>-1</sup>). No entanto, tem sido observado que diversos produtos no mercado não atendem a

legislação e ultrapassam esse teor de limite residual permitido (OLIVEIRA, 2005). Em *Streptococcus mutans*, AL-AHMAD et al (2008) verificaram que conservantes tipicamente utilizados em alimentos, tal como o  $\text{NaNO}_2$ , em concentrações de 0,12 % são capazes de inibir a formação de biofilme em superfície de poliestireno.

#### 4. 5. Validação do modelo

A validade do modelo em predizer os dados da adesão de *S. aureus* em superfícies de AIN, PU e PVC foi avaliada por meio de dois índices estatísticos de validação instituídos por Ross (1996), o fator bias (*fb*) e o fator exatidão (*fe*). Os dados utilizados no cálculo desses índices, valores observados (*Obs*) e preditos (*Pred*) são mostrados na Tabela 7.

Não existe um critério pelo qual possa se dizer que o modelo tem um funcionamento aceitável, ou seja, possa ser validado. Porém, desde a introdução dos *fb* e *fe*, muitos autores têm sugerido valores críticos a estes índices, o que permite a interpretação para a validação do modelo (MELLEFONT et al, 2003).

O *fb* e *fe* calculados com os dados de *S. aureus* nas superfícies estudadas estão descritos na Tabela 8. O *fb* permite avaliar tanto os valores preditos que sobreestimam como os que subestimam os valores observados. Ross (1999) propôs a seguinte interpretação do fator bias, quando utilizado para avaliações de desempenho de modelos que envolvam patógenos: 0,90 - 1,05 o modelo pode ser considerado bom; 0,70 - 0,90 e 1,06 - 1,15 o modelo pode ser considerado aceitável; < 0,70 ou > 1,15 deve ser considerada inaceitável. Conforme esta proposta, os resultados do *fb* das superfícies de AIN e PU demonstraram que os modelos obtidos podem ser considerados bons e o obtido por meio da superfície de PVC está dentro do padrão aceitável para um modelo. No entanto, além da interpretação proposta por Ross (1999) outras escalas de valores têm sido sugeridas por outros pesquisadores. Por exemplo, Dalgaard (2000) sugeriu que, para o sucesso da validação de modelos de deterioração de frutos do mar, valores de *fb* devem estar compreendidos entre 0,8 - 1,3. Entretanto, independente das escalas adotadas quando o valor desse fator é maior do que 1 indica que o modelo sobreestima as observações, sendo

as predições tendenciosas para o lado perigoso. Já quando esse valor é menor do que 1 o modelo pode ser considerado seguro (ROSS et al, 2000).

Tabela 7. Valores observados e preditos da adesão de *S. aureus* em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila sob diferentes condições utilizadas na validação do modelo de superfície de resposta

Superfícies	Fatores					Obs	Pred
	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Tempo de contato (h)			
AIN	1	45	5,9	-	4	2,3159*	2,7837
	2	25	5,9	-	8	2,6839*	2,3632
	3	45	5,9	-	8	2,2648*	2,2710
	4	25	6,6	-	8	2,0606	1,7252
	5	25	6,6	-	4	1,9637*	2,1457
	6	25	5,9	-	4	1,9637*	1,6330
	7	45	6,6	-	4	2,8932*	4,1617
	8	45	6,6		8	2,7596	3,5237
PU	1	25	-	5	8	1,8573	1,8386
	2	25	-	3	4	2,1003*	2,1413
	3	25	-	5	4	1,5563*	1,1454
	4	25	-	3	8	1,8573	1,9631
	5	25	-	3	8	2,2552*	2,6563
	6	25	-	5	8	1,5563*	1,4481
	7	25	-	5	4	2,7466*	4,0532
	8	25	-	3	4	2,8234*	3,3600
PVC	1	25	5,9	3	4	1,7403*	1,4158
	2	25	6,6	5	4	2,5118*	4,7170
	3	25	6,6	3	8	2,6702	5,7289
	4	45	5,9	3	8	1,1139	1,3501
	5	45	6,6	5	8	2,1139	1,3529
	6	45	5,9	5	4	1,4149*	0,3410
	7	25	5,9	5	8	2,5453	4,6541
	8	45	6,6	3	4	2,6937*	4,7198

AIN= Aço inoxidável 304; PU = poliuretano; PVC = Cloreto de polivinila; Obs = valor observado; Pred = valor predito; \* = número de UFC estimado

Considerando que o valor do  $fb$  não fornece indicação da precisão média das estimativas, o  $fe$  também foi calculado. Esse fator representa a média da distância entre cada ponto e a linha de equivalência como uma medida de quão próximas da média as predições estão das observações (ROSS, 1996). A estimativa média tende a ser menos precisa com o aumento do valor do  $fe$ ,

enquanto um valor de 1 indica que há perfeita coerência entre todos os valores previstos e observados (LEBERT et al, 2000). Neste estudo, os valores de  $fe$ , dos modelos das superfícies AIN e PU mostraram-se ligeiramente superiores a 1 ao contrário do modelo da superfície de PVC, que apresentou um valor de  $fe$  mais elevado (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação matemática do modelo de superfície de resposta gerado com base nos dados da adesão de *S. aureus* em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila sob diferentes condições

Superfície	$fb$	$fe$
AIN	1,05	1,18
PU	1,05	1,16
PVC	1,08	1,82

AIN = Aço inoxidável 304; PU = poliuretano; PVC = Cloreto de polivinila;  
 $fb$  = Fator Bias;  $fe$  = Fator exatidão

Modelos de superfície de resposta são amplamente utilizados na predição do crescimento de micro-organismos tanto em meios de cultura quanto em alimentos (MCMEEKIN et al, 2000; DONG et al, 2007; BEVILACQUA et al, 2010). Entretanto, modelos de predição da adesão de micro-organismos em superfícies não estão disponíveis na literatura o que torna difícil a comparação e a avaliação da eficácia desses modelos em prever esse tipo de comportamento. Morelli (2008) estudou a adesão de *E. coli* O157:H7 em superfícies de AIN e PVC, por meio de modelagem de superfície de resposta, os valores de  $fb$  foram 1,12 e 1,13 enquanto os de  $fe$  foram 1,48 e 1,34. Comparando os resultados obtidos por esse autor com os do presente estudo foi possível observar, em ambos trabalhos, que os modelos que descreveram a adesão desses micro-organismos tendem a ser menos precisos do que os modelos publicados para a predição do crescimento microbiano. Por exemplo, Dong et al, (2007) construíram um modelo para predição da formação de esporos de *Clostridium sporogenes* sob diferentes condições experimentais e a média encontrada do  $fe$  foi de 1,01. No entanto, os modelos de ambos trabalhos de adesão podem ser considerados bons ou aceitáveis de acordo com Ross (1999).

A Figura 5 ilustra a comparação entre os valores observados e preditos obtidos no presente estudo. Os pontos acima ou abaixo da reta demonstram as variações em relação aos valores preditos e os valores observados.

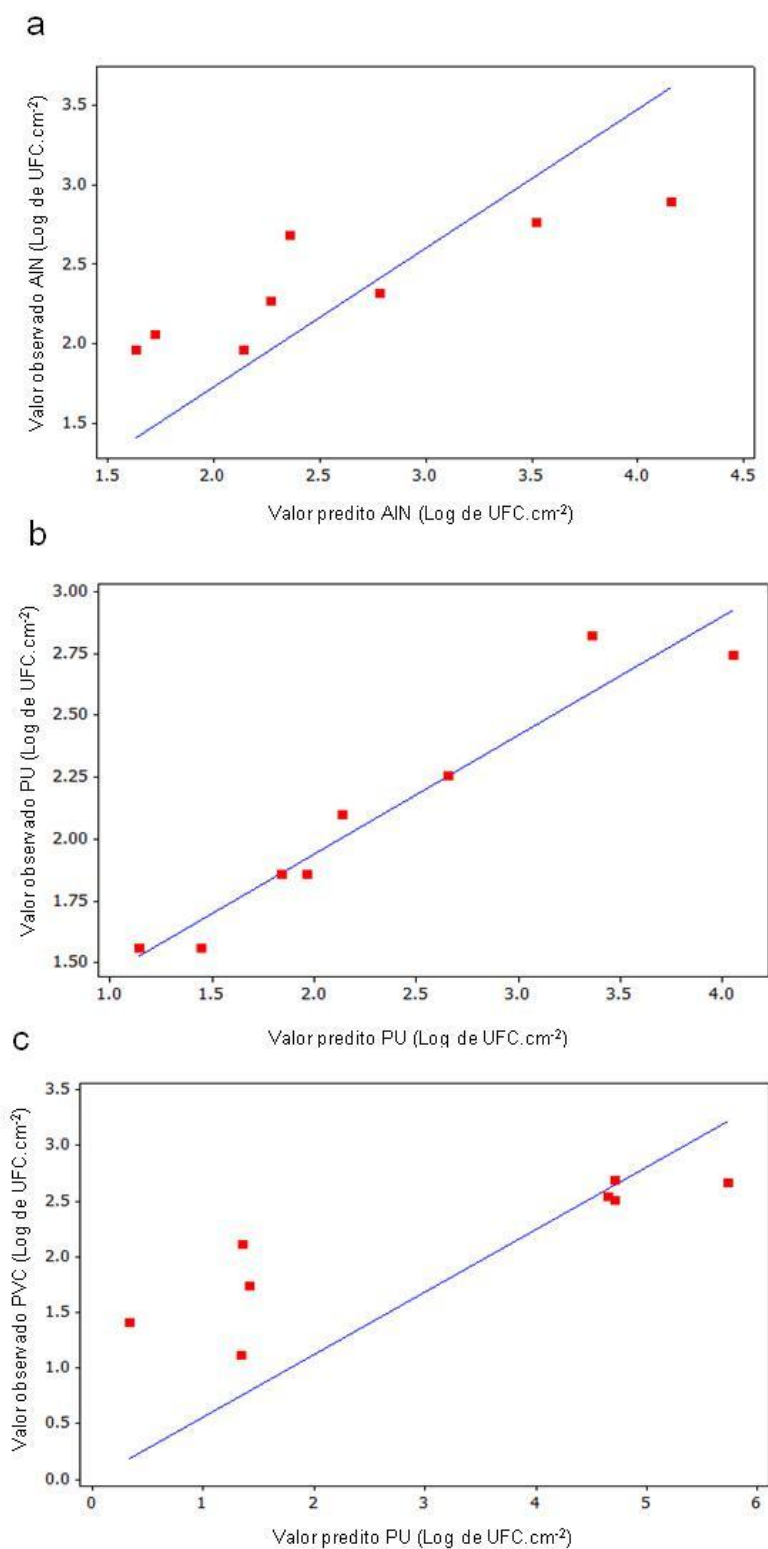


Figure 5. Comparação entre os valores observados e os valores preditos da adesão de *S. aureus* sobre as superfícies de a) aço inoxidável (AIN); b) poliuretano (PU) e c) cloreto de polivinila (PVC).

#### 4. 6. Expressão gênica em *S. aureus*

Os resultados da expressão gênica foram relativos à expressão de *gyrB*, utilizado como gene de referência por apresentar uma constante expressão, confirmada pela PCR em tempo real. O tratamento da cultura à 35 °C, foi utilizado como controle. Genes do operon *ica* são encontrados em 100 % das linhagens clínicas de *S. aureus* investigadas (CRANTOM et al, 1999; ARCIOLA et al, 2001) incluindo a linhagem utilizada no presente estudo. O oligonucleotídeo utilizado para amplificação do gene *atl* não foi específico na amplificação de um único fragmento, sendo os resultados produzidos inconclusivos (dados não mostrados).

O gene *icaD* foi mais expresso quando *S. aureus* foi submetido à concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub> e temperatura de 15 °C (Figura 6a). Esperava-se que o aumento da expressão de *icaR* (Figura 6b), repressor da expressão de *icaADBC* (KOREM et al, 2010), reduzisse a transcrição de *icaD*. Esse resultado sugere que o aumento da expressão de *icaD* foi regulada via mecanismo *icaR* independente. Apesar do efeito do NaNO<sub>2</sub> na adesão e formação de biofilmes não ser muito estudado, Schlag et al (2007) sugeriram que esse composto orienta a transcrição de *icaR*, o que resulta em repressão dos genes *icaADBC* e consequente falhas na formação do biofilme. Dados semelhantes ao do presente estudo foram encontrados por Korem et al (2010) no estudo da expressão de *icaAD* em resposta a exposição ao álcool. Esses autores sugeriram que a proteína *spx*, que interage diretamente com a subunidade da RNA polimerase na regulação do início da transcrição, também contribui para a resistência ao estresse e regulação do biofilme. Essa proteína parece ativar a transcrição *icaR*, levando à diminuição da expressão do operon *ica*, entretanto quando exposta ao álcool sua expressão é inibida.

Os mecanismos *icaR* independentes, que levam à expressão do operon *ica* em resposta a presença de NaNO<sub>2</sub>, não foram encontrados na literatura.

Ao contrário do observado na expressão induzida pelo NaNO<sub>2</sub>, a expressão de *icaD* a 15 °C parece ser regulada por *icaR* (Figura 6b). A expressão de *icaD* à 35 °C e 42 °C foi semelhante, no entanto a menor temperatura utilizada neste estudo foi a que mais contribuiu para a expressão de *icaD*. Os resultados do presente estudo concordam com os de Rode et al (2007), esses autores observaram que *icaA* foi altamente expresso na estirpe

de *S. aureus* 50583 em todas as condições de crescimento, com alta expressão à 37 °C e 46 °C e menor expressão a 25 °C.

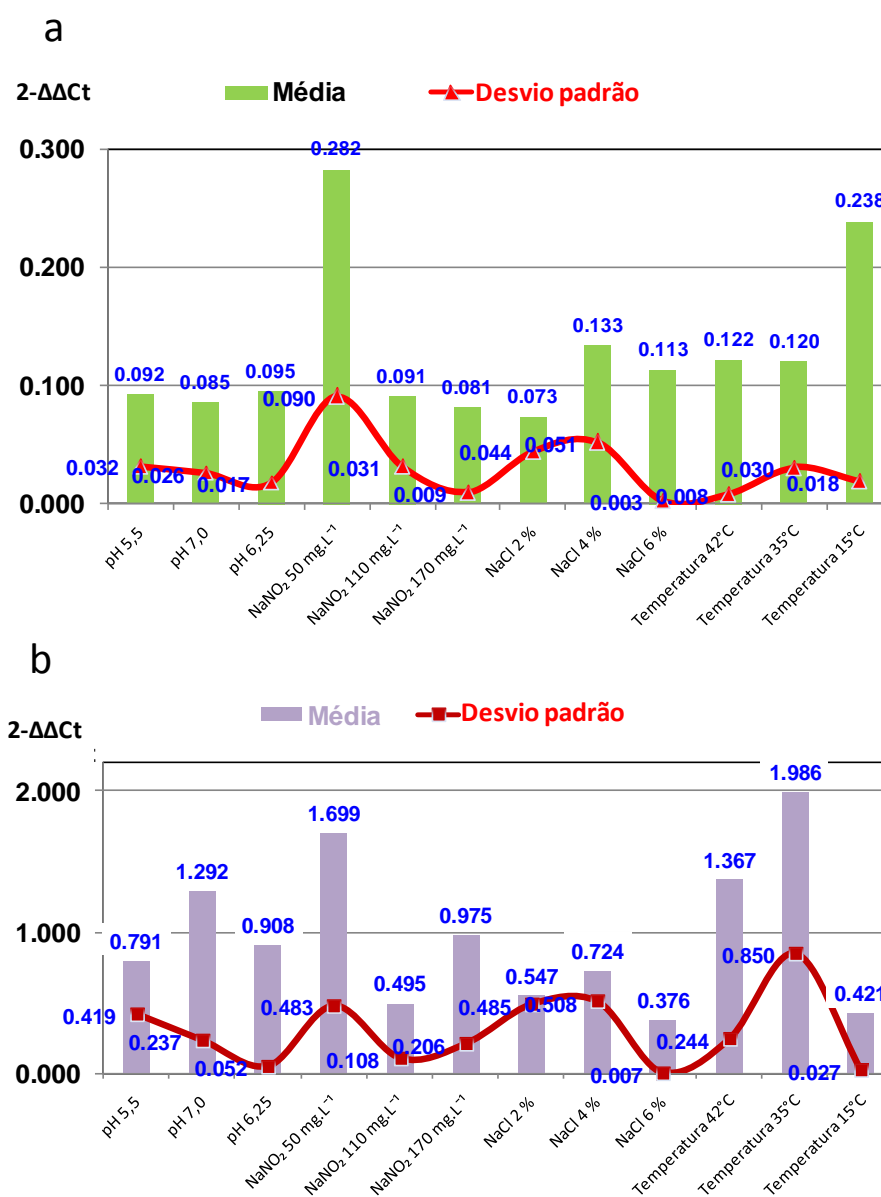


Figura 6. Expressão dos genes *icaD* (a) e *icaR* (b) em *S. aureus* quando submetidos a diferentes tratamentos. O tratamento a 35 °C foi utilizado como controle.

A maior expressão de *icaD* em 4 % de NaCl e consequente diminuição da expressão de *icaR* (Figura 6a e b), segundo Conlon et al (2002) ocorre em detrimento da repressão provocada em *icaR* na presença desse composto. Segundo esses autores, em baixas concentrações de NaCl a expressão do operon *ica* é ativada em ausência de repressão de *icaR* e em altas concentrações, o NaCl reprime a transcrição de *icaR*, como observado no

tratamento com 6 % de NaCl (Figura 6b). No estudo conduzido por esses autores o gene *icaR* foi requerido na ativação do operon *ica* em *S. epidermidis*, em resposta ao álcool, mas não em NaCl, o que sugeriu que existe mais de um caminho independente na de ativação do operon *ica* (Conlon et al, 2002). Lim et al (2004) sugeriram que outro mecanismo envolvido nesse processo abrange o gene *rbf*. Os dados obtidos por esses autores mostraram que o gene *rbf* está envolvido na regulação da etapa de agregação multicelular da formação do biofilme de *S. aureus* em resposta à glicose e o NaCl

Ao contrário do observado por Weinrick et al (2004), a expressão do gene *icaD* não variou com a alteração do pH do meio (Figura 6a). Esses autores observaram que vários genes são diferencialmente regulados em pH entre 5,5 e 7, entre eles *icaA* e *icaD*.

A expressão do operon *ica* tem sido associada com a formação do biofilme por *S. aureus*, mas não necessariamente o aumento da transcrição está relacionado com o aumento da formação do biofilme (RODE et al, 2007). Dobinsky et al (2004) reportaram que a atividade transcricional de *icaADBC* em *S. epidermidis* não está correlacionada com a quantidade de biofilme e PIA produzido. Entretanto, Crantom et al (1999) mostraram que a deleção do operon *ica* em estirpes de *S. aureus* resultaram em não formação do biofilme.

Muitos genes e mecanismos estão envolvidos na formação do biofilme e os mecanismos regulatórios ainda são pouco compreendidos. Devido a variabilidade existente, o estudo de diferentes estirpes de *S. aureus* é requerido para que conclusões gerais possam ser consideradas (RODE et al, 2007).

## 5. CONCLUSÃO

Diversas condições utilizadas no processamento de produtos cárneos podem influenciar a adesão de *S. aureus* em superfícies utilizadas na indústria de alimentos. Os modelos de superfície de resposta utilizados para explicar a adesão de *S. aureus* sobre as superfícies de aço inoxidável, poliuretano e cloreto de polivinila apresentaram bom desempenho e foram validados. Dentre os cinco fatores avaliados neste estudo, quatro, sendo eles a temperatura, o pH, a concentração de NaCl e o tempo de contato interferiram no processo de adesão.

Nenhuma das concentrações de  $\text{NaNO}_2$  influenciaram a adesão de *S. aureus* sobre as superfícies. No entanto, foi observado que em concentrações de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  e temperatura de  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  o gene *icaD* foi mais expresso do que nos demais tratamentos. Todos os tratamentos estudados reduziram a expressão do gene *icaR* em *S. aureus*.

O estudo das condições em que a adesão de *S. aureus* às superfícies é favorecida é importante para promover medidas que evitem a contaminação dos alimentos por este micro-organismo no ambiente de produção de alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AHMAD, A.; AL-AHMAD, M.W.; AUSCHILL, T.M.; FOLLO, M.; BRAUN, G.; HELLWING, E.; ARWEILER, N.B.; Effects of commonly used food preservatives on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 765-772, 2008.

ANANO, S.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. **Meat Science**, v. 71, p. 549 – 556, 2005.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. (Ed). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. p. 185 - 221.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2151 - 2156, 2001.

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; ORLIC, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E.; Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. **Food Control**, v. 131, p. 120-127, 2009.

ASADINEZHAD, A.; NOVÁK, I.; LEHOČKÝ, M.; SEDLARÍK, V.; VESEL, A.; JUNKAR, I.; SÁHA, P.; CHODÁK, I. An in vitro bacterial adhesion assessment of surface-modified medical-grade PVC. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, p. 246-256, 2010.

BAEZA, R.; ROSSLER, C.; MIELNICKI, D.; ZAMORA, M.C.; CHIRIFE, J. Theoretical modelling of *Staphylococcus aureus* growth in a cooked meat product kept at ambient temperature using temperature profiles of selected Mexican cities. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1, p. 81 - 84, 2009.

BALABAN, N.; GOV, Y.; BITLER, A.; BOELAERT, J.R. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. **Kidney International**, v. 63, p. 340-345, 2003.

- BAS, D. e BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836 – 845, 2007.
- BEALS, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p. 1 – 20, 2004
- BECKER, K.; PAGNIER, I.; SCHUCHEN, B.; WENZELBURGER, F.; FRIEDRICH, A.W.; KIPP, F.; PETERS, G.; EIFF, C.V. Does nasal colonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 229 - 231, 2006.
- BEENKEN, K.E.; DUNMAN, P.M.; MCALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S.J.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 14, p. 4665 - 4684, 2004.
- BERESFORD, M.R.; ANDREWS, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1000-1005, 2001.
- BEVILACQUA, A.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Control**, v. 21, p. 172-177, 2010.
- BISWAS, R.; VOGGU, L.; SIMON, U.K.; HENTSCHEL, P.; THUMM, G. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 260-268, 2006.
- BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719 – 730, 2004.
- BORE, E.; LANGSRUD, S.; LANGSRUD, O.; RODE, T.M.; HOLCK, A. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. **Microbiology**, v. 153, p. 2289-2303, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001.
- BRUL, S.; MENSONIDES, F.I.C.; HELLINGWERF, K.J.; MATTOS, M.J.T. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p. 16–21, 2008.

CARELI, R.T.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N.F.F.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I.; ROSADO, M.S.; LUIZ, L.M.P. ; BERNARDES, P.C. Microtopography and bacterial adherence to food contact surfaces evaluated by scanning electron microscopy and epifluorescence microscopy. **Journal of Food Process Engineering**,v.31, n.1. p. 1 - 13, 2008.

CARELI, R.T.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I.; ROSADO, M. S.;BERNARDES, P.C. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 171 - 176, 2009.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CÉBRIAN, G.; SAGARZAZU, N.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; MAÑAS, P. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 26-33, 2010.

CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14s. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2115–2122, 2004.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.N.; HEBRAUD, M. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 728-737, 2002.

CHOKR, A.; LETERME, D.; WATIER, D.; JABBOURI, S. Neither the presence of *ica* locus, nor in vitro-biofilm formation ability is a crucial parameter for some *Staphylococcus epidermidis* strains to maintain an infection in a guinea pig tissue cage model. **Microbial Pathogenesis**, v. 42, p. 94 – 97, 2007.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O’GARA, J.P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p.4400-4408, 2002.

CORNE, P.; MARCHANDIN, H.; JONQUET, O.; CAMPOS, J.; BAÑULS, A. Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3491 - 3493, 2005.

COSTA, E.L.; SILVA, J.A. Avaliação microbiológica da carne-de-sol elaborada com baixos teores de cloreto de sódio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 149 - 153, 2001.

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and

is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5427 – 5433, 1999.

DALGAARD, P., 2000. Fresh and lightly preserved seafood. In: Man, C.M.D., Jones, A.A. (Eds.), **Shelf Life Evaluation of Foods**. 2 ed. Maryland: Aspen Publishing, 2000. p. 110–139.

DEVERE, E.; PURCHASE, D. Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. **Food Microbiology**, v.24, p. 425 – 430, 2007.

DOBINSKY, S.; ROHDE, H.; KNOBLOCH, J.K.M.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Transcriptional activity of *icaA* is not correlated to the degree of biofilm formation in clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. **Biofilm I**, p. 101-106, 2004.

DONELLI, G.; FRANCOLINI, I.; ROMOLI, D.; GUAGLIANONE, E.; PIOZZI, A.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8. p. 2733-2740, 2007.

DONG, Q.; TU, K.; GUO, L.; LI, H.; ZHAO, Y. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, p. 624 – 632, 2007.

DUBAL, Z.B.; PATURKAR, A.M.; WASKAR, V.S.; ZENDE, R.J.; LATHA, C.; RAWOOL, D.B.; KADAM, M.M. Effect of food grade organic acids on inoculated *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. **Meat Science**, v. 66, p. 817 – 821, 2004.

ESNOZ, A.; PERIAGO, P.M., CONESA, R.; PALOP, A. Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH and NaCl on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.153 – 158, 2006.

FIGUEROA, G.G.; NAVARRETE, P.; CARO, M.; TRONCOSO, M.; FAÚNDEZ, G. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. **Revista Médica de Chile**, v. 130, n. 8, p. 859 - 864, 2002.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P.; Evidence for *icaA*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1973 – 1976, 2005.

FLEMMING, R.G.; CAPELLI, C.C.; COOPER, S.L.; PROCTOR, R.A. Bacterial colonization of functionalized polyurethanes. **Biomaterials**, v. 21, p.273-281, 2000.

FOSCHINO, R.; PICOZZI, C.; CIVARDI, A.; BANDINI, M.; FAROLDI, P.

Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. **Journal of Food Engineering**, v. 60, p. 375 – 381, 2003.

FURSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DEMATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, p. 308 - 314, 2008.

GARCÍA-GIMENO, R.M.; HERVÁS-MARTÍNEZ, C.; SILÓNIZ, M.I. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 9 – 30, 2002.

GOTTERUP, J.; OLSEN, K.; KNÖCHEL, S.; TJENER, K.; STAHNKE, L.H.; MOLLER, J.K.S.; Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 303 – 310, 2007.

GRINHOLC, M.; WEGRZYN, G.; KURLEND, J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, p. 375 – 379, 2007.

GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Science**, v. 69, p. 807 – 810, 2005.

GUTIERREZ, C.; ABEE, T.; BOOTH, I.R. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 233 - 244, 1995.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HAMADI, F.; LATRACHE, H.; ZEKRAOUI, M.; ELLOUALI, M.; BENGOURRAM, J. Effect of pH on surface energy of glass and teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. **Material Science and Engineering**, v. 29, p. 1302-1305, 2009.

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GÖTZ, F.; Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 1013-1024, 1997.

HERRERA, J.J.R.; CABO, M.L.; GONZÁLES, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, p. 585 – 591, 2007.

HOOD, S. K; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.

HUANG, S.; WEI, H.; LEE, Y. One-step immunochromatographic assay for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 18, p. 893 – 897, 2007.

HUDSON, J.A. Encyclopedia of meat sciences. In: HUDSON, J. A. (Ed). **Staphylococcus aureus**. Christchurch, New Zealand: Elsevier Ltd, 2004. p.820 – 825.

HWANG, C.; MARMER, B.S. Growth of *Listeria monocytogenes* in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abuse temperatures. **Food Microbiology**, v. 24, p.211 – 218, 2007.

JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos**. Trad. Por TONDO, E.C.; RECH, R.; GEIMBA, M.P.; FLÔRES, S.H.; FRAZZON, J.; CARVALHO, A.L.O.; FRAZZON, A.P.G.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, F.C.; BIANCHINI, A.; SILVA, A.C.A.; 6 ed. Porto Alegre: Artmed,. p. 471 - 490, 2005.

JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Inhibition of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. **Meat Science**, v. 78, p. 53 – 59, 2008.

JOHN, S.F.; DERRICK, M.R.; JACOB, A.E.; HANDLEY, P.S. The combined effects of plasma and hydrogel coating on adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* to polyurethane catheters. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 241-247, 1996.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; RORVIK, L.M.; Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p.158 – 166, 2005.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 77 – 87, 2002.

KABAN, G.; KAYA, M. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. **Food Control**, v. 17, p. 797-801, 2006.

KIEM, S.; OH, W.S.; PECK, K.R.; LEE, N.Y.; LEE, J.; SONG, J.; HWANG, E.S.; KIM, E.; CHA, C.Y.; CHOE, K. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. **Journal of Korean Medical Science**, v. 19, p. 779 - 782, 2004.

KLEIN, C.S.; ZOTTI, T.R.; GAVA, A.; PELISSER, M.R. Qualidade microbiológica de salames tipo colonial comercializados na cidade de

Concórdia – SC: análise de *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii*. **Comunicado Técnico – Embrapa**, 2006.

KOREM, M.; GOV, Y.; ROSENBERG, M. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. **Microbial Pathogenesis**, v.48, p. 74-84, 2010.

LARA, J.A.F.; SENIGALIA, S.W.B.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; DUTRA, I.S.; PINTO, M.F.; SHIMOKOMAKI, M. Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meats. **Meat Science**, v. 65, p. 609 – 613, 2003.

LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99 – 107, 2006.

LEBERT, I., ROBLES-OLVERA, V., LEBERT, A. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 27–39, 2000.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 179 - 184, 2003.

LIEW, S.L.; ARIFF, A.B.; RAHA, A.R.; HO, Y.W. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 137 – 142, 2005.

LIM, Y.; JANA, M.; LUONG, T.T.; LEE, C.Y. Control of glucose and NaCl induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 722-729, 2004.

LINDQVIST, R.; SYLVÉN, S.; VAGSHOLM, I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 155–170, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUZ, I.S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

MACHADO, A.D.S. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal**. 2006. 74 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MACIEL, J.F.; TEIXEIRA, M.A.; MORAES, C.A.; GOMIDE, L.A.M. Antibacterial activity of lactic cultures isolated of italian salami. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n.1, p. 121-122, 2003.

MALHEIROS, P.S.; PASSOS, C.T.; CASARIN, L.S.; SERRAGLIO, L.; TONDO, E.C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, p. 298-301, 2010.

MARQUES, S.C.; BOARI, C.A.; BRCKO, C.C.; NASCIMENTO, A.R.; PICCOLI, R.H. Avaliação higiênico-sanitária de linguças tipo frescal comercializadas nos municípios de três corações e lavras MG. **Ciência e agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, 2006.

MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O.S.; ALVES, L.A.F.; SILVA, B.C.; ALVES, E. ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, Barking, v. 67, n. 1, p. 149-158, 2004.

MCKELLAR, R.C.; LU, X.; DELAQUIS, P.J. A probability model describing the interface between survival and death of *Escherichia coli* O157:H7 in a mayonnaise model system. **Food Microbiology**, v. 19, p. 235–247, 2002.

MCLAUGHLIN, R.A.; HOOGEWERF, A.J. Interleukin-1  $\beta$ -induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. **Microbial Pathogenesis**, v.41, p. 67-69, 2006.

MCMEEKIN, T.A.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D.; ROSS, T.; SALTER, M.; TIENUNGOON, S. Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 93–98, 2000.

MCMEEKIN, T.A. e ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p. 133– 153, 2002.

MCMEEKIN, T.; BOWMAN, J.; MCQUESTIN, O.; MELLEFONT, L.; ROSS, T.; TAMPLIN, M. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p. 2–9, 2008.

MEAT AND LIVESTOCK AUSTRALIA. Monitoring of the microbiological quality of Australian meat. **Project MSHE**. 002B, 1999.

MELLEFONT, L.A; MCMEEKIN, T.A; ROSS, T.; Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH, and lactic acid

concentration on the growth of *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p. 45– 58, 2003.

MELLES, D.C.; GORKINK, R.F.; BOELENS, H.A.; SNIJDERS, S.V.; PEETERS, J.K.; MOORHOUSE, M.J.; VAN DER SPECK, P.J.; VAN LEEUWEN, W.B.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H.A.; VAN BELKUM, A. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1732-1740, 2004.

MORELLI, A.M.F. ***Escherichia coli* O157:H7: Ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitantes**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A.L.; SIDHU, M.S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648–5655, 2003.

MORTON, L.H.G.; GREENWAY, D.L.A.; GAYLARDE, C.C.; SURMAN, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 41, p. 247-259, 1998.

MOZES, N.; MARCHAL, F.; HERMESSE, M.P.; VAN HAECHE, J.L.; REULIAUX, L.; LEONARD, A.J.; ROUXHET, P.G. Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 439-450, 1987.

NASSU, R.T.; GONÇALVES, L.A.G.; BESERRA, F.J. Use of different starter cultures in processing of goat meat fermented sausages. **Ciência Rural**, v. 32, n.6, p. 1051-1055, 2002.

NEL, S.; LUES, J.F.R.; BUYS, E.M.; VENTER, P. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Meat Science**, v. 66, p. 667–674, 2004.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D.V.; GOEL, A.K.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 29–35, 2007.

NEWSOME, R.L.; STEWART, C.M. Bacteria Associated with Foodborne Diseases. **Institute of Food Technologists**. 2004.

OLIVEIRA, M.J.; ARAÚJO, W.M.C.; BORGIO, L.A. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p.736-742, 2005.

OSHIDA, T.; SUGAI, M.; KOMATSUZAWA, H.; HONG, Y.; SUGINAKA, H.; TOMASZ, A.A. *Staphylococcus aureus* autolysin that has an *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase domain:

Cloning, sequence analysis, and characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 285-289, 1995.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, v.19, p. 178–185, 2008.

OULAHAL, N.; MARTIAL-GROSS, A.; BONNEAU, M.; BLUM, L.J. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 192–196, 2007.

PALAVECINO, R.E. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativa y *Staphylococcus saprophyticus*: Nuevos puntos de corte e interpretación de resultados. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, n.2, p. 119-124, 2002.

PEÑAS, E.; GÓMEZ, R.; FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Effects of combined treatments of high pressure, temperature and antimicrobial products on germination of mung bean seeds and microbial quality of sprouts. **Food Control**, v.21, p.82-88, 2010.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A.; TODD, E.C.D.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. **Meat Science**, v. 76, 692-699, 2007.

PLANCHON, S.; GAILLARD-MARTINIE, B.; DORDET-FRISONI, E.; BELON-FONTAINE, M.N.; LEROY, S.; LABADIE, J.; HÉBRAUD, M.; TALON, R.; Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 88-96, 2006.

PORTOCARRERO, S.M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, v. 62, p. 267–273, 2002.

PRESI, P.; STÄRK, K.D.C.; STEPHAN, R.; BREIDENBACH, E.; FREY, J.; REGULA, G. Risk scoring for setting priorities in a monitoring of antimicrobial resistance in meat and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 94 - 100, 2009.

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W.; Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3357-3363, 2000.

RAYNER, J.; VEEH, R.; FLOOD, J. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 29 – 39, 2004.

RIEU, A.; LEMAÎTRE, J.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 76 – 82, 2008.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372 – 383, 2007.

ROHDE, H.; KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* Genotype and Biofilm Expression Phenotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p.4595 - 4596, 2001.

RODRIGUEZ, A.; MCLANDBOROUGH, L.A. Evaluation of the transfer of *Listeria monocytogenes* from stainless steel and high-density polyethylene to Bologna and American cheese. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 600–606, 2007.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, v.81, p.501-508, 1996.

Ross, T. Predictive food microbiology models in the meat industry. **Meat and Livestock**, Australia, 1999.

ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S.; Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 231 – 245, 2000.

SAKHARE, P.Z.; RAO, D.N. Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. **Food Control**, v. 14, p. 1–5, 2003.

SANT'ANA, A.S.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA<sup>®</sup> e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 25, n. 3, p. 531-535, 2005.

SCHLAG, S.; NERZ, C.; BIRKENSTOCK, T.A.; ALTENBEREND, F.; GOTZ, F. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7911–7919, 2007.

SHALE, K.; LUES, J.F.R.; VENTER, P.; BUYS, E.M.; The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**, v. 22, p. 433–438, 2005.

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

SILAGYI, K.; KIM, S.; LO, Y.M.; WEI, C. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. **Food Microbiology**, v. 26, p. 514–519, 2009.

SILVA, C.H.P.M; LINS, A.P.; CRUZ, C.S.O.; GREENBERG, W.; STEWART, T. Caracterização de biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 243-253, 2006.

## ANEXO I

Quadro 1 - Dados utilizados e análise estatística da adesão de *S. aureus* em superfície de aço inoxidável (AIN)

Ordem	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	t contato (h)	Observado	Predito
1	15	5.5	4	110	6	1.06	0.78662
2	55	5.5	4	110	6	0	-0.58838
3	15	7	4	110	6	1.83	2.36162
4	55	7	4	110	6	0	0.98662
5	35	6.25	2	50	6	4.14	3.34059
6	35	6.25	6	50	6	2.82	3.34059
7	35	6.25	2	170	6	4.14	3.34059
8	35	6.25	6	170	6	2.72	3.34059
9	35	5.5	4	110	2	1.36	1.97849
10	35	7	4	110	2	1.06	0.79849
11	35	5.5	4	110	10	1.06	1.53474
12	35	7	4	110	10	6.27	5.86474
13	15	6.25	2	110	6	1.36	1.57412
14	55	6.25	2	110	6	0	0.19912
15	15	6.25	6	110	6	1.83	1.57412
16	55	6.25	6	110	6	0	0.19912
17	35	6.25	4	50	2	0	1.38849
18	35	6.25	4	170	2	1.36	1.38849
19	35	6.25	4	50	10	4.67	3.69974
20	35	6.25	4	170	10	3.41	3.69974
21	35	5.5	2	110	6	1.9	2.55309
22	35	7	2	110	6	4.19	4.12809
23	35	5.5	6	110	6	1.96	2.55309
24	35	7	6	110	6	3.46	4.12809
25	15	6.25	4	50	6	1.96	1.57412
26	55	6.25	4	50	6	0	0.19912
27	15	6.25	4	170	6	1.9	1.57412
28	55	6.25	4	170	6	0	0.19912
29	35	6.25	2	110	2	0	1.38849
30	35	6.25	6	110	2	1.36	1.38849
31	35	6.25	2	110	10	4.95	3.69974
32	35	6.25	6	110	10	4.33	3.69974
33	15	6.25	4	110	2	1.06	-0.37798
34	55	6.25	4	110	2	0	-1.75298
35	15	6.25	4	110	10	0	1.93327
36	55	6.25	4	110	10	0	0.55827
37	35	5.5	4	50	6	3.23	2.55309
38	35	7	4	50	6	3.77	4.12809
39	35	5.5	4	170	6	1.53	2.55309
40	35	7	4	170	6	4.12	4.12809
41	35	6.25	4	110	6	4.7	3.34059
42	35	6.25	4	110	6	4.05	3.34059
43	35	6.25	4	110	6	3.18	3.34059
44	35	6.25	4	110	6	3.36	3.34059
45	35	6.25	4	110	6	3.74	3.34059
46	35	6.25	4	110	6	3.82	3.34059

Quadro 2 - Coeficiente de Regressão estimado para adesão em AIN

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3,3406	0,1830	18.256	0,000
Temperatura	-0,6875	0,2066	-3,327	0,002
pH	0,7875	0,2066	3,811	0,000
Tcontato	1,1556	0,2066	5,593	0,000
Temperatura*Temperatura	-2,4540	0,2588	-9,483	0,000
Tcontato*Tcontato	-0,7965	0,2588	-3,078	0,004
pH*Tcontato	1.3775	0,4132	3,334	0,002

S = 0,8265	R – Sq = 80,5 %	R – Sq (adj) = 77,5%
------------	-----------------	----------------------

Quadro 3 - Análise de variância da adesão em AIN

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	109,781	109,781	18,2969	26,79	0,000
Linear	3	38,853	38,853	12,9508	18,96	0,000
Square	2	63,339	63,339	31,6695	46,37	0,000
Interaction	1	7,590	7,590	7,5900	11,11	0,002
Residual error	39	26,638	26,638	0,6830		
Lack-of-fit	34	25,184	25,184	0,7407	2,54	0,150
Pure Error	5	1454	1454	0,2908		
Total	45	136,420				

Quadro 4 - Dados utilizados e análise estatística da adesão de *S. aureus* em superfície de poliuretano (PU)

Ordem	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO <sub>2</sub> (mg.L-1)	t contato (h)	Observado	Predito
1	15	5.5	4	110	6	0.95	-0.47937
2	55	5.5	4	110	6	0	-0.91062
3	15	7	4	110	6	0	1.34188
4	55	7	4	110	6	0	0.91063
5	35	6.25	2	50	6	4.92	3.61346
6	35	6.25	6	50	6	2.63	2.22721
7	35	6.25	2	170	6	4.07	3.61346
8	35	6.25	6	170	6	1.25	2.22721
9	35	5.5	4	110	2	0.95	1.81658
10	35	7	4	110	2	1.43	1.29283
11	35	5.5	4	110	10	0.95	2.20283
12	35	7	4	110	10	6.12	6.36908
13	15	6.25	2	110	6	1.25	1.12438
14	55	6.25	2	110	6	0	0.69313
15	15	6.25	6	110	6	0	-0.26187
16	55	6.25	6	110	6	0	-0.69312
17	35	6.25	4	50	2	1.25	1.55471
18	35	6.25	4	170	2	0	1.55471
19	35	6.25	4	50	10	5.87	4.28596
20	35	6.25	4	170	10	3.84	4.28596
21	35	5.5	2	110	6	2.33	2.70283
22	35	7	2	110	6	4.24	4.52408
23	35	5.5	6	110	6	0	1.31658
24	35	7	6	110	6	3.72	3.13783
25	15	6.25	4	50	6	0	0.43125
26	55	6.25	4	50	6	0	0
27	15	6.25	4	170	6	1.25	0.43125
28	55	6.25	4	170	6	0	0
29	35	6.25	2	110	2	1.25	2.24783
30	35	6.25	6	110	2	0	0.86158
31	35	6.25	2	110	10	5.29	4.97908
32	35	6.25	6	110	10	4.66	3.59283
33	15	6.25	4	110	2	0	-0.93437
34	55	6.25	4	110	2	0	-1.36562
35	15	6.25	4	110	10	0	1.79688
36	55	6.25	4	110	10	0	1.36563
37	35	5.5	4	50	6	2.65	2.00971
38	35	7	4	50	6	4.15	3.83096
39	35	5.5	4	170	6	0.95	2.00971
40	35	7	4	170	6	3.69	3.83096
41	35	6.25	4	110	6	4.34	2.92033
42	35	6.25	4	110	6	4.38	2.92033
43	35	6.25	4	110	6	3.31	2.92033
44	35	6.25	4	110	6	3.31	2.92033
45	35	6.25	4	110	6	3.09	2.92033
46	35	6.25	4	110	6	2.97	2.92033

Quadro 5 - Coeficiente de Regressão estimado para adesão em PU

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	2,9203	0,1785	16,358	0,000
Temperatura	-0,2156	0,2445	-0,882	0,383
pH	0,9106	0,2445	3,725	0,001
NaCl	-0,6931	0,2445	-2,835	0,007
Tcontato	1,3656	0,2445	5,586	0,000
Temperatura*Temperatura	-2,7047	0,3027	-8,935	0,000
pH*Tcontato	1,1725	0,4889	2,398	0,021

S = 0,9778	R – Sq = 78,2 %	R – Sq (adj) = 74,8 %
------------	-----------------	-----------------------

Quadro 6 - Análise de variância da adesão em PU

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	133,372	133,372	22,2286	23,25	0,000
Linear	4	51,537	51,537	12,8843	13,48	0,000
Square	1	76,335	76,335	76,3351	79,84	0,000
Interaction	1	5,499	5,499	5,4990	5,75	0,021
Residual error	39	37,289	37,289	0,9561	2,63	0,141
Lack-of-fit	34	35,314	35,314	1,0386		
Pure Error	5	1,975	1,975	0,3949		
Total	45	170,660				

Quadro 7 - Dados utilizados e análise estatística da adesão de *S. aureus* em superfície de cloreto de polivinila (PVC)

Ordem	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	t contato (h)	Observado	Predito
1	15	5.5	4	110	6	1.41	0.46542
2	55	5.5	4	110	6	0	-0.49083
3	15	7	4	110	6	1.11	1.47917
4	55	7	4	110	6	0	0.52292
5	35	6.25	2	50	6	3.27	3.15667
6	35	6.25	6	50	6	2.67	2.07917
7	35	6.25	2	170	6	3.27	2.50917
8	35	6.25	6	170	6	0	1.43167
9	35	5.5	4	110	2	0	0.06021
10	35	7	4	110	2	0	1.07396
11	35	5.5	4	110	10	2.95	3.03271
12	35	7	4	110	10	5.01	4.04646
13	15	6.25	2	110	6	0.81	1.51354
14	55	6.25	2	110	6	0	0.55729
15	15	6.25	6	110	6	1.29	0.43604
16	55	6.25	6	110	6	0	-0.52021
17	35	6.25	4	50	2	1.29	0.97667
18	35	6.25	4	170	2	0	0.32917
19	35	6.25	4	50	10	4.32	3.94917
20	35	6.25	4	170	10	3.41	3.30167
21	35	5.5	2	110	6	2.98	2.24021
22	35	7	2	110	6	3	3.25396
23	35	5.5	6	110	6	0	1.16271
24	35	7	6	110	6	2.66	2.17646
25	15	6.25	4	50	6	0.81	1.38188
26	55	6.25	4	50	6	0	0.42563
27	15	6.25	4	170	6	1.11	0.73438
28	55	6.25	4	170	6	0	-0.22187
29	35	6.25	2	110	2	0	1.10833
30	35	6.25	6	110	2	0	0.03083
31	35	6.25	2	110	10	5.09	4.08083
32	35	6.25	6	110	10	3.18	3.00333
33	15	6.25	4	110	2	0	-0.66646
34	55	6.25	4	110	2	0	-1.62271
35	15	6.25	4	110	10	1.11	2.30604
36	55	6.25	4	110	10	0	1.34979
37	35	5.5	4	50	6	1.29	2.10854
38	35	7	4	50	6	3.55	3.12229
39	35	5.5	4	170	6	1.41	1.46104
40	35	7	4	170	6	2.82	2.47479
41	35	6.25	4	110	6	3.56	3.47
42	35	6.25	4	110	6	3.57	3.47
43	35	6.25	4	110	6	2.88	3.47
44	35	6.25	4	110	6	3.62	3.47
45	35	6.25	4	110	6	4.56	3.47
46	35	6.25	4	110	6	2.63	3.47

Quadro 8 - Coeficiente de Regressão estimado para adesão em PVC

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3,4700	0,3349	10,362	0,000
Temperatura	-0,4781	0,2051	-2,332	0,026
pH	0,5069	0,2051	2,472	0,018
NaCl	-0,5388	0,2051	-2,627	0,013
NaNO <sub>2</sub>	-0,3238	0,2051	-1,579	0,123
Tcontato	1,4863	0,2051	7,248	0,000
Temperatura*Temperatura	-2,3437	0,2777	-8,441	0,000
pH*pH	-0,6321	0,2777	-2,276	0,029
NaCl*NaCl	-0,6296	0,2777	-2,267	0,030
NaNO <sub>2</sub> *NaNO <sub>2</sub>	0,5463	0,2777	-1,967	0,057
Tcontato*Tcontato	0,7846	0,2777	-2,826	0,008

S = 0,8203	R – Sq = 80,6 %	R – Sq (adj) = 75,0 %
------------	-----------------	-----------------------

Quadro 9 - Análise de variância da adesão em PVC

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	10	97,730	97,7299	9,77299	14,53	0,000
Linear	5	49,432	49,4325	0,88650	14,69	0,000
Square	5	48,297	48,2974	9,65947	14,36	0,000
Residual error	35	23,549	23,5487	0,67282		
Lack-of-fit	30	21,266	21,2663	0,70888	1,55	0,332
Pure Error	5	2,282	2,2824	0,45648		
Total	45	121,279				