

## ***Avaliação da eficácia antimicrobiana de um PHMB sobre cepas de Salmonella spp***

O Brasil tem ocupado papel de destaque no mercado mundial como importante produtor de alimentos, demonstrando significativo potencial de produção e exportação de alimentos de origem animal, dentre eles a carne suína. A carne suína é a fonte de proteína animal mais importante no mundo, com a produção de 100 milhões de toneladas. O Brasil é o quarto produtor e exportador mundial de carne suína com 3% da produção e 11% das exportações mundiais, ficando atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos. Carne suína, assim como as outras carnes, apresenta alta atividade de água, associada à sua composição química complexa (água 75%, proteínas 19%, carboidratos 1,2%, compostos nitrogenados solúveis 1,6%, compostos inorgânicos 0,6% e vitaminas) sendo suscetível à proliferação de microrganismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos. Assim, os produtos de origem animal possuem uma variedade de microrganismos presentes naturalmente ou adquiridos durante o abate. Alguns podem se multiplicar na carne causando deterioração e redução da vida de prateleira. Outros representam um perigo à saúde dos consumidores por serem causas de intoxicações, doenças infecciosas ou toxinfeciosas. Estudos revelaram presença de agentes patogênicos como *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* na carne suína e em produtos derivados. As doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* spp são conhecidas genericamente por salmoneloses, doença de maior incidência causada pelo consumo de alimentos infectados por salmonelas. Cloridrato polihexametileno biguanida, popularmente conhecido como PHMB, é um agente antibacteriano catiônico, polimérico, solúvel em água, atóxico e inócuo aos sistemas vivos multicelulares e que tem sido amplamente utilizado em diversas indústrias alimentícias ao redor do Mundo com vistas a inibir o crescimento microbiano. No Brasil existem poucos estudos relacionados à aplicação ou eficácia desinfetante daquele composto em carcaças de suínos de sistemas de abate. Com base nestas considerações, o presente projeto propôs a avaliação da eficácia antimicrobiana de um PHMB sobre *Salmonella* spp encontrada em carcaças de suínos provenientes de granjas da região.

**Palavras-chave:** Carne suína; *Salmonella* spp; PHMB.

## ***Evaluation of the antimicrobial efficacy of a PHMB on Salmonella spp strains***

Brazil has played a prominent role in the world market as an important food producer, demonstrating significant potential for production and export of food of animal origin, among them pork. Pork is the most important source of animal protein in the world, producing 100 million tones. Brazil is the fourth largest producer and exporter of pork in the world with 3% of production and 11% of world exports, behind only China, the European Union and the United States. Pork meat, like other meats, presents high water activity, associated with its complex chemical composition (water 75%, proteins 19%, carbohydrates 1.2%, soluble nitrogen compounds 1.6%, inorganic compounds 0.6% and vitamins) being susceptible to the proliferation of microorganisms, both deteriorating and pathogenic. Thus, products of animal origin have a variety of microorganisms present naturally or acquired during slaughter. Some can multiply in the flesh causing deterioration and reduced shelf life. Others pose a danger to the health of consumers because they are causes of poisoning, infectious or toxic-infectious diseases. Studies have revealed the presence of pathogens such as *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* in pork and pork products. The diseases caused by the consumption of food contaminated by *Salmonella* spp are generally known as salmonellosis, a disease of higher incidence caused by the consumption of salmonella-infected foods. Polyhexamethylene biguanide hydrochloride, popularly known as PHMB, is a cationic, water-soluble, non-toxic, non-toxic polymeric antibacterial agent for living multicellular systems and has been widely used in a variety of food industries around the world to inhibit microbial growth. In Brazil, there are few studies related to the application or disinfecting efficacy of that compound in pig carcasses of slaughter systems. Based on these considerations, the present project proposed the evaluation of the antimicrobial efficacy of a PHMB on *Salmonella* spp found in pig carcasses from farms of region.

**Keywords:** Pig meat; *Salmonella* spp; PHMB.

Topic: **Microbiologia Agrícola e Ambiental**

Received: **11/01/2021**

Approved: **25/04/2021**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

**Adriano Guimarães Parreira**

Universidade Federal de São João Del-Rei, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/1803178442452988>  
[aguiparreira@ufsj.edu.br](mailto:aguiparreira@ufsj.edu.br)

**Claudio Marcio Cardoso Rocha**

Universidade Federal de São João Del-Rei, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/8293342351932635>  
[claudiocasl@gmail.com](mailto:claudiocasl@gmail.com)

**Eduardo Jose Azevedo Correa**

Universidade Federal de São João Del-Rei, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/9757902774724431>  
[eduardo@epamig.br](mailto:eduardo@epamig.br)



DOI: 10.6008/CBPC2674-645X.2021.001.0002

### **Referencing this:**

PARREIRA, A. G.; ROCHA, C. M. C.; CORREA, E. J. A.. Avaliação da eficácia antimicrobiana de um PHMB sobre cepas de *Salmonella* spp. *Agriculturae*, v.3, n.1, p.16-28, 2021. DOI:

<http://doi.org/10.6008/CBPC2674-645X.2021.001.0002>

## INTRODUÇÃO

O Brasil tem ocupado papel de destaque no mercado mundial como importante produtor de alimentos, demonstrando significativo potencial de produção e exportação de alimentos de origem animal, dentre eles a carne suína. A carne suína é a fonte de proteína animal mais importante no mundo, com a produção de 100 milhões de toneladas. O Brasil é o quarto produtor e exportador mundial de carne suína com 3% da produção e 11% das exportações mundiais, ficando atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos (ABIPECS, 2015).

Carne suína, assim como as outras carnes, apresenta alta atividade de água, associada a sua composição química complexa (água 75%, proteínas 19%, carboidratos 1,2%, compostos nitrogenados solúveis 1,6%, compostos inorgânicos 0,6% e vitaminas) sendo suscetível à proliferação de microrganismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos (FRAZIER et al., 1993). Assim, os produtos de origem animal possuem uma variedade de microrganismos presentes naturalmente ou adquiridos durante o abate. Alguns podem se multiplicar na carne causando deterioração e redução da vida de prateleira. Outros representam um perigo à saúde dos consumidores por serem causas de intoxicações, doenças infecciosas ou toxinfeciosas (ICMSF, 1997; CORTEZ, 2003). Estudos revelaram presença de agentes patogênicos como *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolítica*, *Campylo bacterjejuni* e *Listeria monocytogenes* na carne suína e em produtos derivados (BORCH et al., 1996; MULLEN, 2000; SANTOS et al., 2006; FORSYTHE, 2005).

Nesse estudo, em especial, será dado enfoque ao microrganismo patogênico *Salmonella* spp. *Salmonella* spp. é um dos patógenos com maior envolvimento com doenças de origem alimentar (WHO, 2002). De acordo com Franco et al. (2010), essa bactéria possui pH ótimo para sua multiplicação em torno de 7,0, com valores inibidores superiores a 9,0 e inferiores a 4,5, e temperatura ideal entre 35°C e 37°C. As salmonelas também não toleram concentração de sal superior a 9%. As doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por esse patógeno se subdividem em três grupos: febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*; as febres entéricas causadas por *Salmonella para typhi* e as enterocolites também conhecidas por salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas (FRANCO et al., 2010). A salmonelose é a doença de maior incidência causada pelo consumo de alimentos infectados por salmonelas. Os sintomas da salmonelose surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado e podem persistir por dois a três dias, sendo os mesmos: náuseas, vômito, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia (JAY, 2005).

Cloridrato polihexametileno biguanida, popularmente conhecido como PHMB, é um agente antibacteriano catiônico, polimérico, solúvel em água, atóxico e inócuo aos sistemas vivos multicelulares e que tem sido amplamente utilizado em diversas indústrias alimentícias ao redor do Mundo com vistas a inibir o crescimento microbiano, sendo aplicado ainda em processos de tratamento de água, como solução antisséptica em diferentes ramos de atividade, no tratamento de ovos fertilizados a fim de se prevenir o contágio por *Salmonella* spp (MILLER et al., 2013) dentre outras aplicações. No Brasil existem poucos estudos relacionados à aplicação ou eficácia desinfetante daquele composto em carcaças de suínos de sistemas de

abate. Com base nestas considerações, o presente projeto propôs avaliar a eficácia antimicrobiana de um PHMB, Nippolat IB®, sobre *Salmonella* spp encontrada em carcaças de suínos provenientes de granjas da região.

A carne suína é a fonte de proteína animal mais importante no mundo, com a produção aproximada de 120 milhões de toneladas anuais, sendo o Brasil o quarto produtor e exportador mundial daquela fonte. Dados recentes demonstram que, de dezembro a janeiro de 2014, o Brasil exportou aproximadamente 495.000 toneladas de carne suína para diversos países do mundo, com destaque para a Rússia, totalizando aproximadamente US\$ 1.600.000.000 em recursos financeiros representando, assim um importante ramo de atividade contribuinte para a balança comercial brasileira. Por outro lado, o aumento da produção de alimentos tem gerado uma preocupação inevitável com a segurança alimentar, uma vez que os alimentos podem ser veiculadores de doenças, representando um risco à saúde pública.

Segundo a WHO (2002), dentre os produtos de origem animal, as carnes ocupam o segundo lugar dos alimentos mais frequentemente envolvidos em (DTAs). Isso ocorre devido a muitos agentes patogênicos pertencerem a microbiota natural dos animais de corte (trato digestório, faringe, tonsilas, narinas, tecido linfático) contaminando as carcaças durante o abate (MATSUBARA, 2005). Dentro desta realidade, certos países como Estados Unidos e União Europeia passaram a exigir medidas mais rigorosas de controle de inocuidade de alimentos para garantir a segurança alimentar dos produtos por eles importados nos últimos anos. Com o crescimento das exportações, existe uma maior preocupação das empresas em fornecer carne com qualidade microbiológica compatível com as exigências do mercado externo, aumentando assim sua competitividade (SAMULAK, 2013).

Para Lima et al. (2002), a microbiota de um alimento é composta por microrganismos associados à matéria prima e por contaminantes adquiridos durante etapas de processamento, através da água, das instalações ou equipamentos. Um alimento está sujeito à contaminação de diversas origens. Porém, é possível realizar um controle para manter a microbiota em um número aceitável que não cause problemas de saúde pública. Para Marra (2009), a carne serve como substrato para a multiplicação de microrganismos, devido seu alto valor biológico e sua composição química. As etapas anteriores à sua comercialização, quando realizadas inadequadamente, podem se transformar em fontes de contaminação, comprometendo a qualidade do produto.

Assim, os produtos de origem animal possuem uma variedade de microrganismos, presentes naturalmente, ou adquiridos durante o abate. Alguns podem se multiplicar na carne causando deterioração e redução da vida de prateleira. Outros representam um perigo à saúde dos consumidores por serem causas de intoxicações ou doenças infecciosas (ICMSF, 1997; CORTEZ, 2003). Os animais são os principais geradores de carga microbiana a partir do conteúdo gastrointestinal, pele, pelos, região orofaríngea. Como esses microrganismos sobrevivem bastante tempo no ambiente, os suínos portadores constituem uma fonte de infecção, tanto para animais quanto para o homem (MARTINS et al., 2004; BORCH et al., 1996).

Diferentes estudos desenvolvidos para verificar as condições sanitárias de carcaças suínas, bem como, de embutidos derivados de carne suína, têm identificado a presença de salmonelas em diversas

amostras (MÜRMAN et al, 2009; VAN DER GAAG et al., 2004; LIMA et al., 2004; DIAS et al., 2008; SPRICIGO et al., 2008; SEIXAS, et al., 2009). Para Jay (2005), a contaminação da carne suína por essa bactéria pode ser originada tanto pela contaminação pelo conteúdo fecal presente no trato intestinal desses animais quanto pelos manipuladores de alimentos que não possuem boas práticas de higiene durante as operações de abate e processamento. Seixas et al. (2009) reforça que para controlar o crescimento de *Salmonella* spp em suínos é imprescindível identificar os períodos em que o animal é contaminado, os fatores que levam à multiplicação desse patógeno e as condições em que se pode ocorrer contaminação da carne durante o procedimento de abate.

Durante as diversas etapas do abate de suínos podem ocorrer contaminação, oriundas dos próprios animais, ou por meio de contaminação cruzada pelo ambiente, superfície, equipamentos ou pelo operador. Matsubara (2005) destaca que a carne e seus derivados estão envolvidos na veiculação de DTAs, pois, os micro-organismos patogênicos estão presentes na microbiota natural dos animais de corte (trato digestório, narinas, faringe, cavidade bucal, tonsilas e tecido linfático) e contaminam as carcaças durante o abate, ou acabam sendo transportados do ambiente contaminado para elas, pelo manipulador, utensílios, equipamentos ou mesmo pela água.

Segundo Borchet et al. (1996), o trato digestório dos suínos abriga naturalmente diversos tipos de patógenos e durante o processo de abate podem contaminar partes internas expostas, incluindo-se os músculos, anteriormente considerados estéreis. *Salmonella* spp merece atenção especial, pois, uma vez dentro da cadeia fornecedora de granjas de abate, quando contaminada e processada, pode se tornar um problema que acarreta prejuízos consideráveis sendo as unidades produtoras passíveis de interdições pontuais por órgãos de fiscalização, gerando insegurança alimentar para consumidores e perda da capacidade produtiva da cadeia.

A aplicação do cloridrato de polihexametileno biguanida em baixas concentrações mostra-se altamente eficazes na redução da carga bacteriana patogênica e deteriorante de carcaças de frangos tratadas com essas soluções o que pode viabilizar o uso dos mesmos como sanitizantes em outros setores da indústria alimentícia, a exemplo da suinocultura (MESQUITA et al., 1997). O efeito biocida de um tipo de PHMB (Nippolat IB®) foi demonstrado no tratamento de salmoura quando a contagem global de microrganismos foi reduzida de um total de 5000 UFC/mL para 2000 UFC/ml após sua aplicação (FURTADO et al., 2005). Confirmando-se a eficácia de sanitizantes, em conjunto com a aplicação de um PHMB em diferentes dosagens sobre carcaças contaminadas com *Salmonella* spp, antes de sua entrada para processamento dentro da indústria processadora de carnes suínas, espera-se reduzir os custos com interdições por contaminações de *Salmonella* spp pelo órgão fiscalizador oferecendo segurança alimentar do produto final para o consumo.

O presente projeto de pesquisa visa, portanto, avaliar a sensibilidade de 21 (vinte e uma) cepas de *Salmonella* de diferentes origens, submetidas à sorotipagem, empregando-se o soro-kit para *Salmonella* Probac do Brasil, frente ao composto PHMB avaliado, determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do PHMB sobre cepas de *Salmonella* spp de referência e determinar o valor residual do PHMB Nippo lat IB nas diferentes concentrações testadas sobre carcaças de

suínos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM é considerada a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em Agar ou Caldo (Macro ou Microdiluição). A CIM obtida usando o teste de diluição poderá mostrar ao médico qual a concentração do agente antimicrobiano necessária para inibir o organismo infectante. CIM, entretanto, não representa um valor absoluto. A verdadeira CIM está em um ponto situado entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo e a próxima menor concentração do teste. A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo conforme descrito pelo *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003)*, com modificações. A execução desta etapa do experimento visa, sobretudo, determinar a concentração bacteriostática e a concentração bactericida do PHMB em estudo frente a uma cepa de *Salmonella entericade* referência ATCC 10708. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia da UEMG – Unidade Divinópolis MG e no Laboratório de Química de Proteínas da UFSJ-Campus CCO.

### Padrão de turbidez para preparação do inóculo

A bactéria congelada foi reativada em Caldo Nutriente por 24h a 35°C. A partir do caldo foi semeada, por meio de estria composta, em placas de Petri contendo Agar Nutriente, incubada por 24h à 35°C. Colônias isoladas foram coletadas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 10mL de solução salina estéril de 0,145mol/L (8,5g/L de NaCl; salina a 0,85%) até atingir turvação equivalente a escala 0,5 de Mc Farland (no caso de bactérias corresponde a  $10^8$  UFC/mL). A densidade correta foi verificada por meio da leitura em espectrofotômetro a 625nm, na qual a absorvância deverá variar entre 0,08 a 0,10.

### Armazenamento das cepas

As cepas foram armazenadas de maneira a reduzir a possibilidade de mutação. O estoque deve ser confeccionado segundo protocolo do laboratório e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para armazenamento, em curto prazo, o estoque de trabalho foi cultivado em tubos contendo Agar Nutriente inclinado, por 24h, sendo posteriormente armazenado à temperatura de 2 a 8°C.

### Meio de cultura e suspensão de trabalho

Para os ensaios de MIC com as bactérias foi utilizado o meio Mueller Hinton (MHB). O pH do meio foi ajustado para permanecer entre 7,2 a 7,4 a temperatura ambiente de 25°C. Uma alíquota de 50µL do pré-inóculo foi adicionada a 10mL de Caldo Mueller Hinton (MHB) para confecção do inóculo, resultando na concentração final de  $10^5$  UFC/mL nos poços.

## Diluição do agente microbiano e inoculação nas placas de microdiluição

O agente antimicrobiano foi diluído em água. Extratos de plantas e compostos sintéticos são normalmente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% e, posteriormente, diluídos numa solução aquosa de DMSO 20% (v/v). A solução estoque do agente antimicrobiano foi preparada a 20.000µg/mL. A partir desta concentração, a diluição foi realizada diretamente nos poços. Realizou-se uma diluição de 1:10 no primeiro poço e, a partir do segundo, uma diluição em série de 1:20.

Com a diluição seriada do agente antimicrobiano concluída, adicionou-se 100µL do inóculo nos poços resultando numa nova diluição de 1:2 e num volume final de 200µL nos poços. Ao confeccionarmos uma solução estoque na concentração de 20.000µg/mL teremos no primeiro poço, a concentração de 1000µg/mL. Nos demais poços, concentrações de 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, 31,25µg/mL, 15,63µg/mL e 7,81µg/mL.

## Leitura dos resultados

Realizada visualmente após 18 horas de incubação a 35°C. A CIM foi considerada a menor concentração do agente testado capaz de impedir 100% do crescimento microbiano visível, sendo o mesmo confirmado por leitura em espectrofotômetro a 625nm. As Figuras 1 (placa amostra) e 2 (placa controle), abaixo, descrevem o conteúdo dos poços e as etapas de diluição das amostras aplicadas nas Placas de Elisa, devendo-se ressaltar que foram executadas três repetições para cada tratamento. A atividade antimicrobiana foi determinada a partir dos resultados de CBM a partir da inoculação de alíquotas de 10µL das mesmas em placas de petri contendo meio ágar-nutriente sendo a mesma referente a menor concentração do PHMB em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Como controle positivo, foram utilizados poços contendo apenas bactérias e meio de cultura e como controle negativo poços contendo apenas meio de cultura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	180µL meio + 20µL composto X (Branco da amostra)	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio			BM	BM	BM
B	180µL meio + 20µL composto X 100µL inóculo (1) 1000µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 500µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 250µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 125µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 62,5µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 31,25µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 15,63µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 7,81µg/mL			CC	CC	CC
C	180µL meio + 20µL composto X 100µL inóculo (1) 1000µg/mL	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					
D	180µL meio + 20µL composto X 100µL inóculo (1) 1000µg/mL	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					
E	180µL meio + 20µL composto y (Branco da amostra)	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio					
F	180µL meio + 20µL composto y 100µL inóculo (1) 1000µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 500µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 250µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 125µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 62,5µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 31,25µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 15,63µg/mL	100µL meio 100µL inóculo (1) 7,81µg/mL					
G	180µL meio + 20µL composto y 100µL inóculo (1) 1000µg/mL	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					
H	180µL meio + 20µL composto y 100µL inóculo (1) 1000µg/mL	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					

Figura 1: Descrição do conteúdo dos poços da placa de Elisa contendo a amostra de PHMB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	180µL meio + 20µL DMSO (Controle Negativo)	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio		BM	BM	BM	
B	180µL meio + 20µL DMSO 20% 100µL inóculo { } 1%	100µL meio 100µL inóculo { } 1%	100µL meio 100µL inóculo { } 0,5%	100µL meio 100µL inóculo { } 0,25%	100µL meio 100µL inóculo { } 0,125%	100µL meio 100µL inóculo { } 0,0625%	100µL meio 100µL inóculo { } 0,03125%	100µL meio 100µL inóculo { } 0,015625%			CC	CC	CC
C	180µL meio + 20µL DMSO { } 2%	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					
D	180µL meio + 20µL DMSO { } 2%	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					
E	180µL meio + 20µL Antibiótico (Controle Positivo)	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio	100µL meio					
F	180µL meio + 20µL Antibiótico { } 1000µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 500µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 250µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 125µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 62,5µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 31,25µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 15,63µg/mL	100µL meio 100µL inóculo { } 7,81µg/mL					
G	180µL meio + 20µL Antibiótico { } 1000µg/mL	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					
H	180µL meio + 20µL Antibiótico { } 1000µg/mL	idem	idem	idem	idem	idem	idem	idem					

Figura 2: Descrição do conteúdo dos poços da placa de Elisa contendo os controles do experimento.

### Sensibilidade de diferentes isolados de *Salmonella* spp frente ao agente PHMB avaliado

Vinte e uma bactérias foram submetidas à sorotipagem utilizando Sorokit para *Salmonella* Probac do Brasil® e o perfil de sensibilidade ao agente PHMB estudado foi desenvolvido utilizando a metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1993). Após reativação das bactérias em ágar BHI uma colônia isolada foi inoculada em caldo BHI e deixada a 37°C por 24 horas. O composto foi diluído seguindo a concentração recomendada pelo fabricante, ou seja, 1% (v/v) e 9mL distribuído em tubos que continham 1 mL de extrato de levedura. Foram feitas diluições seriadas das culturas e então o plaqueamento em duplicata para verificação do número de células que iniciáramos o experimento. A partir da diluição  $10^{-2}$  foi retirado 0,1mL, o qual foi adicionado nos tubos contendo o composto. Nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos, em que a cepa foi mantida em contato com a solução clorada, 10µL desta solução foi transferida para caldo BHI e em seguida, incubada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas a 37°C. Dos tubos que apresentaram turvação, 10 µL foram plaqueados em ágar BHI e as placas incubadas a 37°C por 24 horas para confirmar a presença de colônias viáveis. Segundo o fabricante do produto, 10 minutos de exposição seriam suficientes para eliminar cepas de *Salmonella* contaminantes. Para verificação da porcentagem de morte, concomitante a transferência para o caldo BHI, 100µL foram plaqueados em duplicata após diluição para verificação da porcentagem de morte.

### Análise residual do PHMB nas carcaças

A determinação do residual do PHMB encontra-se em execução, sendo realizada por espectrofotometria na região do UV (237nm) empregando-se espectrofotômetro NOVA®, a partir das amostras coletadas após lavagem das carcaças alvo dos testes, seguindo-se metodologia descrita por Menegon (2009).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação da CIM e CBM

A Tabela 1, apresentada abaixo, lista os valores de absorbância obtidos a partir das amostras

aplicadas em placas de Elisa de 96 poços com a leitura realizada em espectrofotômetro a 625nm. O conteúdo do material aplicado em cada poço encontra-se descrito no tópico Materiais e Métodos.

**Tabela 1:** Valores de absorbância a 625nm das amostras de PHMB aplicadas aos poços inoculados com cepa de *Salmonella enterica* ATCC 10708

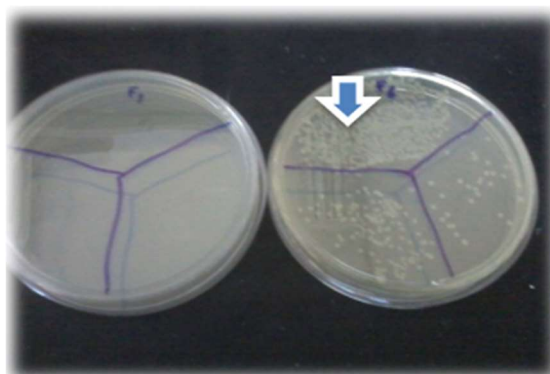
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,039	0,038	0,04	0,039	0,038	0,039	0,04	0,047	0,041	0,042	0,041
B	0,04	0,038	0,038	0,038	0,039	0,039	0,038	0,038	0,045	0,356	0,327	0,406
C	0,04	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	0,039	0,038	0,048	0,046	0,05	0,045
D	0,039	0,039	0,038	0,039	0,038	0,039	0,038	0,039	0,047	0,046	0,044	0,046
E	0,118	0,092	0,071	0,057	0,047	0,042	0,039	0,04	0,046	0,045	0,045	0,046
F	0,118	0,085	0,071	0,057	0,05	0,046	0,044	0,375	0,045	0,046	0,049	0,044
G	0,116	0,089	0,067	0,06	0,052	0,046	0,152	0,347	0,047	0,046	0,045	0,045
H	0,103	0,085	0,073	0,061	0,052	0,047	0,307	0,368	0,046	0,045	0,044	0,046

A Figura 3 a seguir ilustra o aspecto da placa de Elisa, objeto da leitura em espectrofotômetro a 625nm, após incubação em estufa a 37°C. Destaque para os poços apontados na figura (*Linhas F, G e H, colunas 7 e 8*) que indicam aqueles com crescimento microbiano detectado macroscopicamente por visão direta. A CIM encontrada, portanto, foi de 31,25µg/mL, conforme mapa de diluição apresentado no tópico Material e Métodos, frente à cepa de referência *Salmonella entérica* ATCC 10708.



**Figura 3:** Fotografia da placa de Elisa inoculada com cepa de referência de *Salmonella* ATCC 10708 contendo composto PHMB em alguns dos poços.

A Figura 4, apresentada abaixo, ilustra por sua vez os resultados referentes a CBM, indicando, a esquerda, uma placa-controle com visível crescimento bacteriano na superfície da placa contendo meio de cultivo ágar nutriente e, a direita, placa inoculada com alíquotas do poço F5, indicando inibição do crescimento bacteriano pela ausência do surgimento de colônias visíveis. Neste caso a concentração bactericida encontrada foi de 125,0 µg/mL.



**Figura 4:** Fotografia de placas de petri contendo meio ágar nutriente com vistas à determinação da CBM.



Muitos pesquisadores têm buscado compostos com potencial ação antimicrobiana sobre isolados de *Salmonella* spp a partir de extratos vegetais diversos, especialmente óleos essenciais. De Bona et al. (2012) avaliaram o efeito inibitório de extrato de açafraão frente a 14 sorovares de *Salmonella* spp isolados de frango, sendo que a CIM encontrada para *S. Bandaka*, *S. Heidelberg* e *S. Lexington* foi de 100, 150 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente, entretanto, a determinação de composição química destes extratos não foi totalmente elucidada. Por outro lado, para óleo essencial de gengibre, Majolo et al. (2014) encontraram uma variação da CIM de 2500 a 5000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e da CBM de 5000 a 10000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para extrato de malte, De Bona et al. (2010) concluiu que *S. Lexington* demonstrou maior sensibilidade ao extrato, sendo que as concentrações de 50 e 100 mg/mL apresentaram efeito bacteriostático e a partir de 150 mg/mL o efeito foi bactericida. Foi encontrada atividade bacteriostática na concentração de 150 mg/mL para *S. Mbandaka*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Derby* e a 200 mg/mL para *S. Infantis* e *S. Orion*. A atividade bactericida pode ser verificada na concentração de 150 mg/mL para *S. Lexington* e a 200 mg/mL para *S. Derby*, *S. Kentucky*, *S. Enterica* e *S. Enteritidis*. Os dados que coincidem com Girolometto et al. (2009) para alguns dos isolados testados. Considerando-se os valores encontrados no presente trabalho, CIM (31,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e CBM (125,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para o PHMB testado, percebe-se claramente a necessidade de uso de concentrações bem abaixo daquelas necessárias a obtenção de efeitos bacteriostáticos ou bactericidas para os compostos provenientes dos extratos vegetais apresentados, embora não sejam sanitizantes químicos. Deve-se considerar também que ainda existe certa falta de padronização das técnicas empregadas resultando em determinadas variações nas CIM's e CBM's, mesmo quando da utilização de compostos de composição similar.

Desta forma, os valores de CIM e CBM encontrados revelam potenciais efeitos promissores do PHMB testado neste trabalho, sobretudo em um contexto em que isolados de *Salmonella* spp mostram-se resistentes a uma série de antimicrobianos e até mesmo multirresistentes como os relatados no trabalho de Azevedo (2012) que, ao estudar a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* spp. em caprinos e ovinos clinicamente saudáveis no sub médio São Francisco, identificou 18 (46%) dos isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes, especialmente na espécie ovina onde 16 isolados apresentar a mesma característica. A multirresistência é uma grande preocupação em *Salmonella* spp. Especialmente ao se considerar seu potencial zoonótico e de transmissão via alimentos (MOLLA et al., 2007). *Salmonella* spp. multiresistentes tem sido descritas em vários trabalhos tanto em isolados obtidos a partir de animais em abatedouro (MOLLA et al., 2007), como em alimentos prontos (CHANDRA et al., 2006). O potencial de transmissão de genes de resistência entre isolados de *Salmonella* spp. é bem conhecida (HELMUTH, 2000).

#### **Perfil de sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp provenientes de fontes diversas ao PHMB avaliado**

A Tabela 2 apresenta os resultados de porcentagem de morte dos 21 (vinte e uma) isolados de *Salmonella* spp provenientes de alimentos diversos frente ao PHMB testado. A partir dos resultados listados da Tabela 2 percebe-se que, a partir de 5 minutos de exposição ao PHMB a 1% (v/v), valores superiores a 99,9990% de eliminação dos isolados já são observados, embora o fornecedor do produto indique a necessidade de 10 minutos de exposição para a obtenção de resultados efetivos.

**Tabela 2:** Porcentagem de morte de 21 isolados de *Salmonella* spp obtidos de fontes diversas submetidas à exposição ao PHMB a 1,0% (v/v).

Bactéria	Entrada (UFC/mL)	5 minutos		10 minutos		15 minutos		20 minutos	
		UFC/mL	%morte	UFC/mL	%morte	UFC/mL	%morte	UFC/mL	%morte
R1-Frango	2,00x10 <sup>8</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	99,9989%	1,00x10 <sup>2</sup>	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R2-Farofa	5,00x10 <sup>8</sup>	0,00E+00	100,0000%	0,00E+00	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R2-Mac	1,65x10 <sup>8</sup>	1,00x10 <sup>3</sup>	99,9994%	2,50x10 <sup>2</sup>	99,998%	0	100,00%	0	100,00%
R2-Mac'	7,00x10 <sup>8</sup>	4,40x10 <sup>2</sup>	99,9999%	2,20x10 <sup>2</sup>	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R3-Maio	2,00x10 <sup>8</sup>	2,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	4,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R4-Lrc	8,0x10 <sup>8</sup>	7,80x10 <sup>2</sup>	99,9999%	6,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R4-Maio'	5,4x10 <sup>7</sup>	4,80x10 <sup>1</sup>	99,9999%	2,10x10 <sup>2</sup>	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R4-Maio	3,20x10 <sup>7</sup>	0,00E+00	100,0000%	0,00E+00	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R4-Sf	1,32x10 <sup>8</sup>	1,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	9,80x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R4-Sf'	1,03x10 <sup>8</sup>	1,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	9,70x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R4-Slc	8,00x10 <sup>7</sup>	2,00x10 <sup>2</sup>	99,9998%	9,8x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R6-Sf	8,10x10 <sup>7</sup>	3,10x10 <sup>2</sup>	99,9996%	1,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R7-Feijão	1,00x10 <sup>8</sup>	8,00x10 <sup>2</sup>	99,9992%	9,70x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R7-Frango	9,8x10 <sup>8</sup>	7,90x10 <sup>2</sup>	99,9999%	3,00x10 <sup>2</sup>	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R7-Lrc	5,00x10 <sup>7</sup>	4,00x10 <sup>2</sup>	99,9992%	0,00E+00	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R7-Mac	1,22x10 <sup>8</sup>	4,20x10 <sup>2</sup>	99,9997%	1,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R7-Sf	1,03x10 <sup>7</sup>	1,00x10 <sup>2</sup>	99,9990%	2,00x10 <sup>2</sup>	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R9-Mac	2,0x10 <sup>8</sup>	5,00x10 <sup>2</sup>	99,9998%	1,80x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%	0	100,00%
R9-Maio	1,07x10 <sup>8</sup>	5,00x10 <sup>2</sup>	99,9995%	4,80x10 <sup>2</sup>	99,9955%	0	100,00%	0	100,00%
R9-Sf	1,02x10 <sup>8</sup>	8,00x10 <sup>2</sup>	99,9992%	4,80x10 <sup>2</sup>	100,0000%	0	100,00%	0	100,00%
R10-Slc	1,00x10 <sup>8</sup>	9,00x10 <sup>2</sup>	99,9991%	8,00x10 <sup>2</sup>	99,9992%	1,00x10 <sup>2</sup>	99,9999%	0	100,00%

Outros pesquisadores, por sua vez, ao testarem o efeito da exposição de isolados de *Salmonella* spp a diversos sanitizantes, em diferentes concentrações e tempos de exposição, chegaram a resultados menos efetivos que aqueles encontrados no presente trabalho sob o ponto de vista de tempo de exposição e porcentagem de eliminação. Em trabalhos desenvolvidos por Colla et al. (2014) observou-se melhor ação dentre três sanitizantes testados para o ácido peracético a 0.5%, efetivo a partir de 10 minutos (94,6%) e 15 minutos (97,3%) de contato; amônia quaternária a 1% por 10 minutos (89,2%) e 15 minutos (97,3%) e clorexidina a 0.5% por 10 minutos (70,3%) e 15 minutos de contato (72,8%). Todas as amostras testadas apresentaram multirresistência e seis (15,3%) apresentando resistência à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina (denominado grupo ACSSuT), indicando a necessidade de monitorar a propagação da resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* spp. oriundas de suínos. Os sanitizantes rotineiramente utilizados em frigoríficos como amônia quaternária, ácido peracético e clorexidina têm um desempenho reduzido ou nulo em presença de matéria orgânica (SANTOS et al. 2007) e sua ação seria mais relacionada com as condições de utilização dos produtos, sobretudo a presença de matéria orgânica e o tempo de exposição, do que com um eventual perfil de resistência de *Salmonella* spp. presente nas granjas (KICH et al. 2004). A clorexidina, componente do PHMB avaliado, é um agente catiônico do grupo das biguanidas com mecanismo de ação com alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, precipitação de proteínas, alteração do balanço osmótico, interferência no metabolismo, crescimento e divisão celular e inibição da enzima ATPase, sendo desde os anos 50 utilizada em áreas como odontologia, medicina humana e veterinária (SANTOS et al. 2007).

Outros estudiosos (ZIECHET al., 2016), por sua vez, recentemente relataram ineficiência de ácido peracético como sanitizante aplicado sobre isolados de *Salmonella* spp formadoras de biofilme a 0,2% (v/v), embora tradicionalmente empregado na indústria de alimentos com a finalidade de combater biofilmes de bactérias diversas, a exemplo de *Salmonella*. Tal fato revela a importância de se buscar novos compostos

com ação sanitizante efetiva sobre cepas de *Salmonella*, tendo em vista o desenvolvimento de resistência por parte de um grande número de contaminantes de alimentos.

## CONCLUSÕES

O composto PHMB avaliado no presente estudo mostrou-se bastante efetivo e promissor, tendo em vista a concentração reduzida necessária à obtenção de resultados bacteriostáticos e bactericidas satisfatórios, frente a uma cepa de *Salmonella* de referência, e comparativamente aos relatos encontrados na literatura. No que se refere à sensibilidade ao composto por 21 isolados de *Salmonella* de diferentes fontes, pode-se concluir que os resultados foram bastante animadores quando comparados àqueles apresentados por outros pesquisadores testando sanitizantes diversos, tanto considerando a necessidade de menor tempo de exposição ao PHMB quanto à porcentagem de morte obtida após 5 minutos de contato com o composto. Encontra-se ainda em fase de execução os testes relacionados a análise residual do PHMB a partir de sua aplicação sobre carcaças provenientes de frigoríficos, partindo-se dos melhores valores de concentrações obtidas para o composto nos experimentos aqui desenvolvidos.

## REFERÊNCIAS

ABIPEC. Associação Brasileira da Indústria Produtora Exportadora de Carne Suína. **Principais destinos da carne suína Brasileira**. Brasília, 2011.

BORCH, E.; NESBASKKEN, T.; CHRISTEN, H.. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, n.1-2, p.9-25, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00988-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00988-9)

BRASIL. **Portaria no 101, de 17 de agosto de 1993**. Brasília: DOU, p.11937-11945, 1993.

CHANDRA, M.; SINGH, B. R.; SHANKAR, H.; AGARWAL, M.; KANT, R. K.; SHARMA, G.; BABU, N.. Study on prevalence of Salmonella infection in goats. **Small Ruminant Research**. v.65, p.24-30, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.030>

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6 ed. Wayne, 2003.

COLLA, F. L.; MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia desanitizantes frente aos isolados de *Salmonella* spp. Oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, p.320-324, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400003>

CORTEZ, A. L. L.. **Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em linguiça fresca comercializada no Município de Jaboticabal-SP**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DE BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; CHAVES, A. M.; SCUR, M.; FRUET, T. K.; WEBER, L. D.; ALVES, L. F. A.; MOURA, A. C.. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.1, p.41-6, 2012.

DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; COELHO, F. J. O.; TEJADA, T. S.; SEGATTO, M.; TIMM, C. D.. Qualidade Higiênico-sanitária de carne bovina moída e embutidos frescos comercializados no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.75, n.3, p.359-363, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v75p3592008>

FORSYTHE, S. J.. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2010.

FRAZIER, W. C.; WESTOFF, D. C.. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

FURTADO, M. M.. **Principais problemas dos queijos**: Causas e prevenção. São Paulo: Fonte comunicações e editora, 2005.

GIROLOMETTO G.; AVANCINI C. A. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M.. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.49-55, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000100009>

HELMUTH, R.. Antibiotic Resistance in *Salmonella*. In: MONROY, S. E. A.. **Salmonella in Domestic Animals**. London: CABI, 2000.

- ICMSF. International Commission Microbiologica Specifications for Foods. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.
- JAY, J. M.. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KICH, J. D.; BOROWSKY, L. M.; SILVA, V. S.; RAMENZONI, M., TRIQUES, N.; KOOLER, F. L.; CARDOSO, M. R. I.. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.33-39, 2004. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16792>
- LIMA, A.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P.. Infecções e intoxicações alimentares. In: **Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos**. João Pessoa: Nova Ideia, 2002. p.175-199
- LIMA, E. S. C.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; ALMEIDA, L. P.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S.. Isolamento de *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* no processo de abate de suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.185-190, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2004000400003>
- MAJOLO, C.; NASCIMENTO, V. P.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.505-512, 2014. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_109](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_109)
- MARRA, K. N.. **Dinâmica da carga microbiana da sala de desossa em um matadouro - frigorífico de Goiânia-GO, durante a Jornada de trabalho**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- MARTINS, A. D.; MENDONÇA, R. C.; SODRÉ, A. F.. Principais patógenos associados à carne suína. **Revista Nacional da Carne**, v.332, p.16-24, 2004.
- MATSUBARA, E. N.. **Condição higiênico- sanitária de meias carcaças de suínos após o abate e depois do término do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas de abate de suínos**. Dissertação (Mestrado Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MCMULLEN, L. M.. Intervention strategies to improve the safety of pork. **Advances of Pork Production**, v.11, p.165-173, 2000.
- MENEGON, R. F.. **Estudo biológico e desenvolvimento de formulação do sal tetrapalmitato de clorexidina para uso em doenças bucais**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2009.
- MESQUITA, L. M., ALBENONES, O., PRADO, C. G.; OLIVEIRA, G.. Atividade antibacteriana e quantificação do cloridrato polihexametileno biguanida (P.H.M.B.) em tecidos musculares e vísceras de frangos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.27, n.1, p.65-78, 1997.
- MOLLA, B., MIKO, A., PRIES, K., HILDEBRANDT, G., KLEER, J., SCHROETER, A., HELMUTH, R.. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. **Acta Tropica**, v.103, n.2, p.142-149, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.018>
- MILLER, G.; KOBURGER, T.; KRAMER, A.. Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. **Chemico Biological Interaction**, v.201, n.1-3, p.58-64, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.01.001>
- MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; CARDOSO, M.. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v.20, n. 3, p.191-195, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.04.007>
- SAMULAK, R. L.. **Monitoramento via pcr de *Salmonella* spp. no processamento de carne suína**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2013.
- SANTOS, L. A. G., PINTO, P. S. A., MORAES, M. P., VANETTI, M. C. D., BEVILACQUA, P. D., MAYARA, S. P. DIAS, F.S.. Pesquisa molecular e convencional de *Listeria monocytogenes* para controle de qualidade da carne suína. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 481-486, 2006.
- SANTOS, A. M.; MOURA, A. C.. **Perfil de resistência microbiana aos principais sanitizantes utilizados em frigoríficos da cidade de Cascavel no Paraná**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, 2007.
- SEIXAS, F. N.; TOCHETTO, R.; FERRAZ, S. M.. Presença de *Salmonella* spp. Em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.634-640, 2009
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 Ed. São Paulo: Varela, 1997.
- SOUZA, L. H. L. A.. Manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Revista Higiene Alimentar**, v.20, n.146, p.32-39, 2006.
- SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, S. R.; ESPINDOLA, M. L.; FERRAZ, S. M.. Prevalência, quantificação e resistência de antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados em linguça frescal suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p.779-785, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400003>
- VAN DER GAAG, M. A.; SAATKAMP, H. W.; BACKU, G. B. C.; VAN BEEK, P.; HUIRNE, R. B. M.. Cost-effectiveness of controlling *Salmonella* in the pork chain. **Food Control**, v.15, n.3, p.173-180, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00029-X)

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOOSER, R. D. F.. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 15 ed.; Washington: APHA, 1992.

ZIECH, R. E.; PERIN, A. P.; LAMPUGNANI, C.; SERENO, M. J.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; PINTO, P. A. N.; BERSOT, L. S.. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. Isolated from

Brazilian poultry processing plants. **Food Science and Technology**, v.68, p.85-90, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.021>

WHO. World Health Organization. **Food safety: A revolution of the executive board of the world health organization**. Resolution EB 105, 2002.

A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detém os direitos materiais desta publicação. Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas sob coordenação da **Cognitionis Publishing**, da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.