Avaliação da influência do pré-condicionamento de superfície de contato na adesão a seco de *Salmonella*.

Palavras-Chave: *Salmonella*, baixa atividade de água, segurança dos alimentos, adesão a seco.

Autores/as:

Larissa Belo Tenório – [Graduação -UNICAMP]; Flávia Prestes de Souza- [Doutoranda em Tecnologia de Alimentos FEA/UNICAMP]

Prof.ª Dr.ª Maristela da Silva do Nascimento (orientadora) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO

A salmonelose, gastroenterite causada por *Salmonella*, é uma das principais doenças transmitidas por alimentos (DTA's) que afetam a população mundial. Nos Estados Unidos, a cada ano ocorrem cerca de 1,35 milhões de infecções, 26.500 hospitalizações e 420 mortes por salmonelose, a maioria de origem alimentar (CDC, 2021). Já no Brasil, a *Salmonella* causa cerca de 11,2% dos surtos envolvendo alimentos ou água (SINAN, 2022). Um surto de *Salmonella* veiculado pelo consumo de manteiga amendoim vem sendo investigado nos Estados Unidos, até o momento 16 pessoas foram acometidas (CDC, 2022).

A formação de biofilmes é um grande problema enfrentado pela indústria de alimentos, diversos estudos relatam a presença de *Salmonella* em superfícies de contato em indústrias de produtos de baixa atividade de água (a_w). Além disso, este patógeno é capaz de permanecer em ambientes com baixa atividade de água por longos períodos de tempo como cereais, amendoim, frutas secas e alimentos em pó (BEUCHAT, 2013; NASCIMENTO *et al*., 2018).

Conhecendo a importância da *Salmonella* como agente etiológico de doenças de origem alimentar e o risco que representa no setor de alimentos, incluindo os de baixa a_w é necessário compreender o processo de adesão e formação de biofilmes nestes ambientes. Assim, este estudo teve o intuito de contribuir para a avaliação de risco de *Salmonella* em indústrias processadoras de produtos de baixa a_w fornecendo dados sobre a capacidade de adesão a seco desse patógeno em aço inoxidável (AI) e polipropileno (PP) e a influência dos resíduos orgânicos nesta adesão.

METODOLOGIA

Para obter o inóculo seco, pérolas de vidro foram previamente inoculadas com um *pool* de quatro cepas de *Salmonella* (*S.* Muenster P03.2FEA, *S.* Javiana P06.1FEA, *S.* Oranienburg P07.1FEA, *S.* Miami P10.5FEA) (NASCIMENTO et al., 2018; VON HERTWIG et al., 2019). As pérolas foram transferidas para um frasco estéril com o veículo alvo (terra < 425µm) permanecendo sob agitação em *shaker* por 5 min. Cupons de AI e PP previamente condicionados através de agitação a 300 rpm por 24h com três matrizes diferentes: película de amendoim triturada (a_w 0,355), terra (a_w 0,395) e leite em pó (a_w 0,277), foram transferidos para frascos contendo terra inoculada com 10^6 UFC/g de *Salmonella*. Em seguida, foram armazenados em BOD a 25 ºC por até 7 dias. A contagem de células aderidas aos cupons foi realizada nos tempos de 0, 2, 5 e 7 dias, segundo SHARMA et al. (2005).

Após remoção das células planctônicas com lavagem em solução salina 0,85%, os cupons foram transferidos para tubos contendo solução salina 0,85% e pérolas de vidro e submetidos à agitação em vortex por 1 min para remoção das células aderidas. A contagem de *Salmonella* foi realizada através da técnica de plaqueamento em superfície em ágar TSA e o resultado expresso em log UFC/g ou cm^2. Os dados foram avaliados por meio de Análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, utilizando software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O veículo seco (terra) apresentou contagem inicial de *Salmonella* de aproximadamente 6 log UFC/g. A evolução da contagem de *Salmonella* nos cupons (PP e AI) ao longo de 7 dias é apresentada nas Figuras 1 e 2.

De modo geral, houve maior adesão de *Salmonella* em superfície de PP quando comparada a AI para todos os condicionantes utilizados, apesar disso apenas o protocolo utilizando a terra como condicionante apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre as superfícies avaliadas. As maiores contagens iniciais foram observadas para o condicionamento com película de amendoim, 3,10 e 2,25 log UFC/cm² para PP e AI, respectivamente. Já os tratamentos utilizando leite em pó e terra em superfície de AI, obtiveram as menores contagens (1,67 a 1,17 log UFC/cm²). Após 5 dias de incubação, é possível observar um leve decréscimo nas contagens de *Salmonella* nos cupons avaliados, sendo que o cupom de AI condicionado com leite em pó apresentou o maior declínio, aproximadamente 1 log UFC/cm². Ao final do protocolo (7 dias), ambos cupons condicionados com película de amendoim e o cupom de PP condicionado com terra apresentaram as maiores contagens de *Salmonella* entre 1,77 e 1,94 log UFC/cm². A menor contagem foi obtida no cupom de AI condicionado com leite em pó (0,52 log UFC/cm²). O tempo de incubação não influenciou na contagem de *Salmonella* ($p > 0,05$), com exceção dos cupons de AI e PP condicionados com leite e o cupom de PP condicionado com película de amendoim.

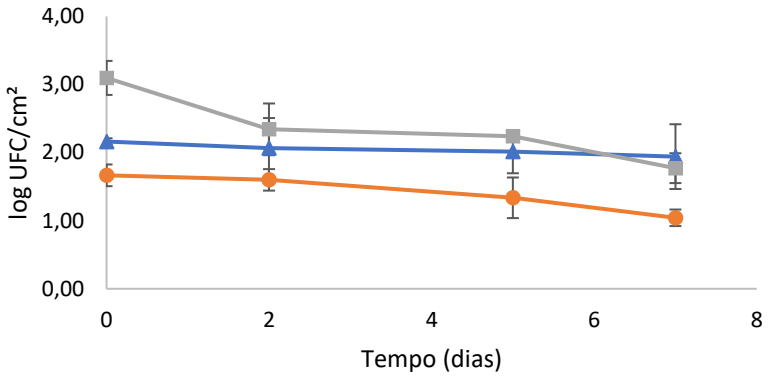

Figura 1:
Contagem de *Salmonella* em cupons de polipropileno (PP) condicionados com terra (▲), leite em pó (●) e película de amendoim (■) durante 7 dias à 25 ºC.

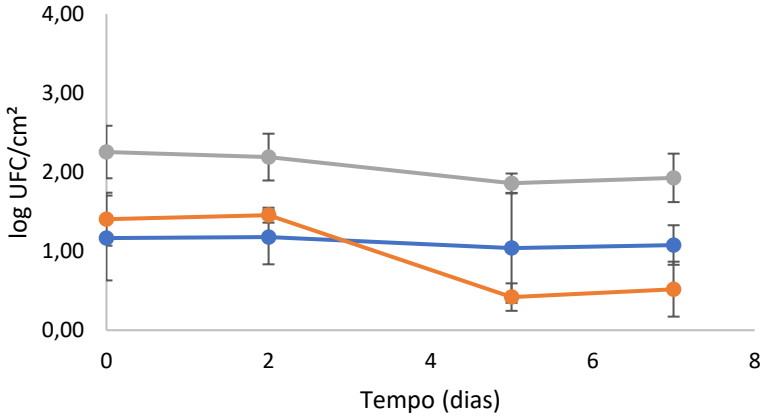

Figura 2: Contagem
de *Salmonella* em cupons de aço inoxidável (AI) condicionados com terra (▲), leite em pó (●) e película de amendoim (■) durante 7 dias à 25 ºC.

A adesão dos micro-organismos a uma superfície depende de diferentes fatores alguns microrganismos como a *Salmonella*, possuem uma maior afinidade por materiais hidrofóbicos como o polipropileno, quando comparada a materiais hidrofílicos, como o aço inox (Sinde & Carballo, 2000; Donlan, 2002), o que pode justificar a maior adesão aos cupons de PP avaliados. Entretanto, a adesão também depende de outros fatores, como tipos de força, cargas e interações eletrostáticas existentes entre as células bacterianas e a superfície (Helke e*t al*., 1993, Felicetti, 2004).

CONCLUSÃO

Embora a adesão do patógeno as superfícies avaliadas tenham sido relativamente baixas (< 2,34 log UFC/cm²), os resultados deste trabalho demonstram que o tipo de resíduo na linha de produção influencia na adesão da bactéria à superfície, sendo que a

película de amendoim foi o resíduo que mais favoreceu a adesão de *Salmonella* nas superfícies empregadas. O que sugere que a presença desse resíduo no ambiente fabril pode favorecer a adesão de *Salmonella* às superfícies dos equipamentos, ressaltando a importância de implementar protocolos de higienização eficazes na indústria alimentícia, a fim de minimizar as contaminações cruzadas. Além disso, mais pesquisas sobre a interação do veículo seco com a superfície (AI e PP) são necessárias para entender melhor os mecanismos envolvidos na adesão bacteriana a seco.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Maristela da Silva do Nascimento e à Flávia Souza Prestes, pelos ensinamentos, incentivos e dedicação, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2021/06809-2), pelo apoio financeiro, e todos que de alguma forma contribuíram para a realização do projeto.

BIBLIOGRAFIA

BEUCHAT, Larry R. *et al. Low–water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens*. **Journal of food protection,** v. 76, n. 1, p. 150-172, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Questions and Answers: Salmonella.* 2021. Disponível em: < https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>. Acesso em: 9 fev. 2022.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) *Salmonella Outbreak Linked to Peanut Butter*
Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/senftenberg-05-22/index.html Acesso em: 18 jul 2022.

DONLAN, R.M. *Biofilms: microbial life on surfaces*. 10 pág, 2002.

FELICETTI, M. A. Determinação da força de adesão entre partículas e uma superfície aplicando a técnica centrífuga. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).** Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP, 2004.

HILDEBRANDT, I. M. et al. *Dry transfer inoculation of low-moisture spices containing antimicrobial compounds***. Journal of food protection**, v. 80, n. 2, p. 338-344, 2017.

HELKE, D. M.; SOMERS, E. B.; WONG, A. C. L. *Attachment of Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components*. **Journal of Food Protection**, 56, 479–484. 1993.

NASCIMENTO, M. S., *et al. Salmonella, Escherichia coli and Enterobacteriaceae in the peanut supply chain: From farm to table*. **Food Research Internationa***l*, v.*105*, p.930-935, 2018.

SHARMA, M. *et al. Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage*. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 3, p. 449-459, 2005.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Ministério da Saúde: Surtos de doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil. Disponível em:< https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/arquivos/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-dtha/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/@@download/file/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20Surtos%20DTHA%20-%202022.pdf> Acesso em: 28 jun 2022.

SINDE, E.; CARBALLO, J. *Attachment of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers*. 2000.

VON HERTWIG, A. M., *et al. Genetic diversity, antimicrobial resistance and virulence profile of Salmonella isolated from the peanut supply chain***. International journal of food microbiology**, v. 294, p. 50-54, 2019.