UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de
sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes*
em superfície abiótica**

Fernanda Barbosa dos Reis Teixeira

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de
sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes*
em superfície abiótica**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientada: Fernanda Barbosa dos Reis
Teixeira

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina
Pereira De Martinis

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Reis-Teixeira, Fernanda Barbosa

Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica. Ribeirão Preto, 2014.

131p. : il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: De Martinis, Elaine Cristina Pereira

1. *Listeria monocytogenes*, 2. Biofilme, 3. Dispersão
4. Óxido nítrico, 5. Óleos essenciais, 6. Sanitizantes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Fernanda Barbosa dos Reis Teixeira

Título do trabalho: **Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica.**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina
Pereira De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha família e amigos pelo apoio. Em especial aos meus pais Armando (in memoriam) e Rita e ao meu marido pela dedicação, incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Elaine C. P. De Martinis pela orientação, apoio e suporte durante todo o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 2010/10051-3) e pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa (Proc. 2011/07062-6).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado durante um mês (agosto de 2010).

À especialista de laboratório Elizabete Rosa do laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo auxílio com a aquisição de imagens e treinamento no microscópio SP5.

À especialista de laboratório Roberta Ribeiro Costa Rosales do laboratório Multiusuário Imagem Biofotônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela ajuda com o software imageJ.

À especialista de laboratório Ana Cristina Morseli Polizello do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela ajuda com a leitura de microplacas.

À Profa. Dra. Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela doação dos óleos essenciais utilizados em uma parte do trabalho e também pelo suporte.

À mestrande Ingrid Pontes de Souza (aluna da Profa. Niede), pela extração dos óleos essenciais e pela ajuda com as análises cromatográficas.

Aos alunos do laboratório do Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, pelas análise cromatográficas preliminares das amostras dos óleos essenciais.

À técnica de laboratório, Isabel Cristina Casanova Turatti no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos – NPPNS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob responsabilidade do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pela realização da cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas das amostras dos óleos essenciais

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique de Almeida Teixeira da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), pela doação dos sanitizantes comerciais para realização dos experimentos.

À Pós-Doutoranda Caroline Biojone do laboratório da Profa. Sâmia Regiane Lourenço Joca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), pela ajuda com o método de Griess.

A todos os colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP, pela ajuda, pela troca de experiências e pelo agradável convívio.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP Vanessa Maciel de Souza, Luís e Lucas, pela amizade e pelo auxílio durante os experimentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela atenção durante o doutorado.

RESUMO

REIS-TEIXEIRA, F. B. **Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica.** 2014. 131f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Biofilmes de *Listeria monocytogenes* são fontes potenciais de contaminação de alimentos processados e podem diminuir a efetividade de procedimentos de higienização e sanitização nas indústrias. No presente estudo foi avaliada a estrutura e a dispersão de biofilmes formados por duas cepas de *L. monocytogenes* em diferentes superfícies, como aço inoxidável, vidro e poliestireno. Foram utilizados diferentes sistemas de cultivo como microplacas de 96 poços de poliestireno e de aço inoxidável, microplacas de 24 poços contendo lâminas circulares de aço inoxidável ou de vidro e, câmaras de poliestireno contendo 8 poços com fundo de borossilicato (vidro). Os experimentos foram realizados com incubação por 1, 4 e 8 dias a 25°C. A formação de biofilme foi verificada em microplacas de 96 de poliestireno e de aço inoxidável através do método de quantificação de biomassa do biofilme por coloração com cristal violeta, e também em sistema de microplaca de 24 poços contendo lâminas circulares de aço inoxidável ou de vidro, através de enumeração em placa das células aderidas nas superfícies. As estruturas dos biofilmes foram observadas por meio de microscopia de fluorescência (para o sistema de microplaca de 24 poços contendo lâminas circulares de aço inoxidável) e através de microscopia confocal a laser (para o sistema com câmaras com fundo de vidro). Para isso, os biofilmes foram corados com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD®, a fim de diferenciar as células viáveis (coradas com Syto 9) das células mortas (coradas com iodeto de propídeo), sendo feitas estimativas do número de células aderidas à superfície de vidro através de quantificação por fluorescência. Foram realizados testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais de plantas de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e de *Zingiber officinale* (gengibre) e de dois sanitizantes comerciais (um à base de óleo de coco babaçu e outro à base de dióxido de cloro) frente a *L. monocytogenes*. Posteriormente, foi testada a eficácia desses antimicrobianos na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* formados por 4 e 8 dias a 25°C, em superfície de aço inoxidável e de vidro, através da enumeração em placas de células aderidas e de observações microscópicas. Foi também avaliada a presença de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo em biofilmes maduros de duas cepas de *L. monocytogenes* formados em superfícies de aço inoxidável e de vidro, para o estudo do possível efeito do óxido nítrico (NO) exógeno e de inibidores de NO na dispersão de células do biofilme e na alteração dos níveis de expressão de genes de *L. monocytogenes* relacionados ao estresse oxidativo e nitrosativo (*Lmo0990*, *Lmo0807* e *Lmo1485*), bem como à regulação do gene de virulência e formação de biofilme (*PrfA*). Foi verificada a presença de intermediários de oxigênio reativo (ROI – *reactive oxygen intermediates*) e de intermediários de nitrogênio reativo (RNI – *reactive nitrogen intermediates*) nos biofilmes de *L. monocytogenes* com 4 e 8 dias de incubação a 25°C formados em superfícies de aço inoxidável e de vidro, por meio de marcadores

fluorescentes específicos e visualizações microscópicas. A fim de confirmar indiretamente a presença de óxido nítrico (NO) em cultivos de *L. monocytogenes* incubados por 4 e 8 dias a 25°C, foi realizada a dosagem de nitrito com o emprego do reagente Griess. Foram realizados testes de concentração inibitória mínima (CIM) do doador de óxido nítrico como nitroprussiato de sódio (SNP) e dos inibidores de NO como N^ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (Carboxi-PTIO sal de potássio, C-PTIO) frente a *L. monocytogenes*. Foi testada a eficácia do SNP e dos inibidores de NO na remoção de biofilmes pré-formados por 4 e 8 dias de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável. Os resultados deste trabalho demonstraram que o biofilme de *L. monocytogenes* formado em vidro e em aço inoxidável apresentou uma arquitetura microscópica semelhante a um “favo de mel”, com presença de canais de água, bem como cavidades de tamanhos variados devido à dispersão de grupos de células planctônicas ou morte celular. A utilização de óleos essenciais e/ou sanitizantes comerciais por 1h em biofilmes de *L. monocytogenes* formados por 4 e 8 dias, foi eficaz na redução do número de células aderidas na superfície de aço inoxidável e de vidro. No biofilme de *L. monocytogenes* foram detectadas moléculas relacionadas ao estresse oxidativo como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais superóxidos, bem como moléculas de estresse nitrosativo como óxido nítrico (NO) e peroxinitrito. A adição de NO exógeno (por meio do doador SNP) e a adição de inibidores de NO no meio de cultivo não alteraram o crescimento planctônico de *L. monocytogenes*. Foi observado que a exposição a SNP e a inibidores de NO por 1h em biofilmes de *L. monocytogenes* pré-formados por 4 e 8 dias, não induziu a dispersão celular. A adição de NO exógeno bem como a remoção de NO do meio de cultura por moléculas inibidoras não alteraram o nível de expressão dos genes *Lmo1485*, *Lmo0990*, *Lmo0807* e *PrfA*, em culturas de *L. monocytogenes* de 8 dias. A utilização de óleos essenciais de plantas e/ou sanitizantes comerciais em biofilmes pré-formados pode ser uma alternativa eficaz na eliminação de *L. monocytogenes* em superfícies de manipulação de alimentos, mas a melhor estratégia de controle é impedir a formação de biofilme pelo emprego de tratamentos combinados nos estágios iniciais de contaminação. Em conclusão, *L. monocytogenes* formou biofilme com estruturas bem definidas que podem contribuir para a sobrevivência e disseminação da bactéria no ambiente de processamento de alimentos. Apesar de *L. monocytogenes* não formar um biofilme espesso com multicamadas, as células aderidas apresentam geralmente maior resistência à ação dos antimicrobianos em comparação com as células planctônicas, conseguindo sobreviver e persistir na superfície, com mecanismos regulatórios bastante eficientes frente a diferentes tipos de estresse.

Palavras-chave: Listeria monocytogenes, biofilme, dispersão, óxido nítrico, óleos essenciais, sanitizantes.

ABSTRACT

REIS-TEIXEIRA, F. B. **Evaluation of the role of nitric oxide, essential oils and sanitizers in biofilm dispersion of *Listeria monocytogenes* on abiotic surface.** 2014. 131f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (Brazil), 2014.

Biofilms of *Listeria monocytogenes* are potential sources of contamination of processed foods, and may interfere in the effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in food industry. In the present study the structures and dispersion of biofilms formed by two strains of *L. monocytogenes* on different abiotic surfaces, such as stainless steel, glass and polystyrene were evaluated. Different cultivation systems such as polystyrene and stainless steel 96-wells microplates, 24-wells microplates containing round stainless steel or glass slides, and 8-wells polystyrene chambers with borosilicate bottom were used. The experiments were done for 1, 4 and 8 days of incubation at 25°C. Biofilm formation was observed in 96-wells microplates of polystyrene and stainless steel by the quantification of biofilm biomass by staining with crystal violet, and also in 24-wells microplates system with circular slides of stainless steel or glass, with enumeration of adhered cells on agar plates. The structure of biofilms were observed by fluorescence microscopy (for the system of 24-wells microplates containing circular slides of stainless steel) and by confocal laser scanning microscopy (for the system of glass bottom chambers). For this, biofilms were stained with the LIVE/DEAD® bacterial viability kit, in order to differentiate viable cells (stained with Syto 9) from dead cells (stained with propidium iodide). The estimative of the number of viable cells was done by measurement of fluorescence. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oils plants of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) and *Zingiber officinale* (ginger) and two commercial sanitizers (babassu coconut oil-based sanitizer and chlorine dioxide-based sanitizer) against *L. monocytogenes* were also determined. Subsequently, the antimicrobials were evaluated against *L. monocytogenes* biofilms formed by 4 and 8 days at 25°C on the stainless steel and glass surfaces by enumeration on agar plates of adhered cells and microscopic observations. The presence of molecules related to oxidative and nitrosative stresses in mature biofilms of two strains of *L. monocytogenes* formed on glass and stainless steel surfaces was also evaluated, and the possible role of exogenous nitric oxide (NO) and inhibitors of NO were studied for induction of biofilm dispersal cells and changed of genic expression levels of *L. monocytogenes* related to oxidative and nitrosative stress genes (*Lmo0990*, *Lmo0807* and *Lmo1485*), as well as the regulation of virulence and biofilm formation gene (*PrfA*). The presence of reactive nitrogen intermediates (RNI) and reactive oxygen intermediates (ROI) was investigated in biofilms of *L. monocytogenes* formed on stainless steel and glass surfaces with 4 and 8 days-old at 25°C, using specific fluorescent dyes and microscopic views. In order to indirectly confirm the presence of nitric oxide (NO) in cultures of *L. monocytogenes* incubated for 4 and 8 days at 25°C, the dosage of nitrite was carried out with Griess reagent. The minimum inhibitory concentration (MIC) of a nitric oxide donor as sodium nitroprusside (SNP) and two NO inhibitors such as N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-oxy-3-oxide (Carboxy-potassium salt, C-PTIO), were

evaluated for *L. monocytogenes*. It was also determined the effectiveness of SNP and of the two inhibitors of NO to eliminate biofilms of *L. monocytogenes* preformed for 4 and 8 days on stainless steel surfaces. The results of this work showed that *L. monocytogenes* biofilms formed on glass and on stainless steel surfaces, presented similar microscopic architectures in a "honeycomb" like structure, with water channels and hollows of different sizes, possibly due to cell dispersion or death. The exposure to essential oils and/or commercial sanitizers for 1h for *L. monocytogenes* biofilms formed for 4 and 8 days was effective in reducing the number of cells adhered on stainless steel and on glass surfaces. In biofilms of *L. monocytogenes*, molecules were detected related to oxidative stress such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide radicals, as well as molecules related to nitrosative stress as nitric oxide (NO) and peroxynitrite. The addition of exogenous NO (SNP) and inhibitors of NO in the culture medium did not inhibit planktonic growth of *L. monocytogenes*, and exposure to SNP and to inhibitors of NO for 1 h for biofilms of *L. monocytogenes* preformed by 4 and 8 days did not induce cell dispersion. The addition of exogenous NO and NO removal from the culture medium by inhibitory molecules did not alter the level of expression of *Lmo1485*, *Lmo0990*, and *PrfA Lmo0807* genes in cultures of 8-days-old of *L. monocytogenes*. The use of essential oils from plants and/or sanitizing commercial agents on pre-formed biofilms can be an effective alternative in the control of *L. monocytogenes* in food handling surfaces, but the best control strategy is avoid the biofilm formation by applying combined treatments in initial stages of contamination. In conclusion, *L. monocytogenes* formed biofilms with well defined structures that may contribute to the survival and spread of bacteria in food processing environment. Despite *L. monocytogenes* do not form a multilayer thick biofilms, adherent cells generally have greater resistance to antimicrobial activity compared to planktonic cells, surviving and persisting on the surface with regulatory mechanisms effective against different types of stress.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm, dispersion, nitric oxide, essential oils, sanitizers.

RESUMEN

REIS-TEIXEIRA, F. B. **Evaluación del papel del óxido nítrico, los aceites esenciales y los desinfectantes en la dispersión biofilms de *Listeria monocytogenes* en la superficie abiótico.** 2014. 131f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (Brasil), 2014.

Listeria monocytogenes biofilms son fuentes potenciales de contaminación de los alimentos procesados, y pueden interferir en la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria. En el presente estudio se evaluó la estructura y dispersión de biofilms formadas por dos cepas de *L. monocytogenes* en diferentes superficies abióticas, tales como el acero inoxidable, el vidrio y poliestireno. Los diferentes sistemas de cultivo tales como el poliestireno y acero inoxidable de 96 pocillos de microplacas, se utilizaron microplacas de 24 pocillos conteniendo diapositivas circulares de acero inoxidable o vidrio, y cámaras de 8 pocillos de poliestireno con fondo de borosilicato. Los experimentos se realizaron durante 1, 4 y 8 días de incubación a 25 ° C. La formación de biofilms se observó en 96 pozos de microplacas de poliestireno y acero inoxidable por la cuantificación de biomasa de biofilms por tinción con cristal violeta, y también en sistema de microplacas de 24 pocillos con diapositivas circulares de acero inoxidable o de vidrio, mediante la enumeración de placas de agar en el adheridas células. La estructura de las biofilms se observaron por microscopía de fluorescencia (para el sistema de microplacas de 24 pocillos que contienen diapositivas circulares de acero inoxidable) y por microscopía confocal de barrido láser (para el sistema de cámaras de fondo de vidrio). Para esto, las biofilms se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD®, con el fin de diferenciar las células viables (teñidas con Syto 9) a partir de células muertas (coloreadas con yoduro de propidio). La cuantificación del número de células viables estimados se realiza a través de la cuantificación de la fluorescencia. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites esenciales de las plantas de *Cymbopogon citratus* (hierba de limón) y *Zingiber officinale* (jengibre) y dos desinfectantes comerciales (desinfectante a base de aceite de coco babasú y desinfectante a base de dióxido de cloro) contra *L. monocytogenes*. Posteriormente, se ensayó para efecto anti-biofilm para eliminación de *L. monocytogenes* biofilms formadas por 4 y 8 días a 25 ° C en las superficies de acero inoxidable y de vidrio por enumeración en placas de agar de células adheridas y observaciones microscópicas. También se evaluó la presencia de moléculas relacionadas con el estrés oxidativo y nitrosativo en biofilms maduros de dos cepas de *L. monocytogenes* formados sobre superficies de vidrio y de acero inoxidable. También se estudió el posible papel del óxido nítrico exógeno (NO) y los inhibidores de NO en la inducción de dispersión de células de biofilms y cambiado de los niveles de expresión génica de *L. monocytogenes* relacionados con genes de estrés oxidativo y nitrosativo (*Lmo0990*, *Lmo0807* y *Lmo1485*), así como la regulación de gen de la virulencia y de la formación de biofilms (*PrfA*). Se observó la presencia de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y productos intermedios de oxígeno reactivo (ROI) en las biofilms de *L. monocytogenes* con 4 y 8 días de incubación a 25 ° C se forman en las superficies de acero inoxidable y vidrio, utilizando tintes

fluorescentes específicas y vistas microscópicas. Con el fin de confirmar indirectamente la presencia de óxido nítrico (NO) en cultivos de *L. monocytogenes* se incubaron durante 4 y 8 días a 25 ° C, la dosificación de nitrito se llevó a cabo por reacción con el reactivo de Griess. La CMI de donante de óxido nítrico tales como nitroprusiato de sodio (SNP) y dos inhibidores de NO tales como N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y 2-(4-carboxifenil) -4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (sal de potasio carboxi-, C-PTIO), se llevaron a cabo contra *L. monocytogenes*. Se evaluó la eficacia de los SNP y de los dos inhibidores de NO para eliminar las biofilms de *L. monocytogenes* preformados para 4 y 8 días en superficies de acero inoxidable. Los resultados presentados en este trabajo mostraron que *L. monocytogenes* biofilms formadas sobre vidrio y sobre superficies de acero inoxidable, mostraron una arquitectura microscópica similar como un "nido de abeja", la presencia de canales de agua y huecos de diferentes tamaños, debido a las células dispersión o la muerte celular. La exposición de los aceites esenciales y / o desinfectantes comerciales durante 1 hora a *L. monocytogenes* biofilms formados por 4 y 8 días fue eficaz en la reducción de lo número de células adheridas en acero inoxidable y en superficies de vidrio. En las biofilms de *L. monocytogenes* se detectaron las moléculas relacionadas con el estrés oxidativo tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los radicales superóxido, así como moléculas relacionadas con el estrés nitrosativo como óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito. La adición de NO exógeno (SNP) y los inhibidores de NO en el medio de cultivo no inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* planctónicas, y la exposición de biofilms preformas por 4 y 8 día de *L. monocytogenes* a SNP y para los inhibidores de NO durante 1 h no hubo dispersión de células. La adición exógena de NO y eliminación de NO del medio de cultivo por las moléculas inhibitorias no alteraron el nivel de expresión de *Lmo1485*, *Lmo0990*, *Lmo0807* y *PrfA* genes en culturas de ocho días de edad, de *L. monocytogenes*. El uso de aceites esenciales de plantas y / o desinfectante comerciales en las biofilms formadas previamente puede ser una alternativa eficaz en el control de *L. monocytogenes* en superficies de manipulación de alimentos, pero la mejor estrategia de control es evitar la formación de biofilms mediante la aplicación de tratamientos combinados en etapas iniciales de la contaminación. En conclusión, *L. monocytogenes* forman biofilms con estructuras bien definidas que pueden contribuir a la supervivencia y la propagación de bacterias en el ambiente de procesamiento de alimentos. A pesar de *L. monocytogenes* no forman una biofilms multicapa gruesas, las células adherentes en general, tienen mayor resistencia a la actividad antimicrobiana en comparación con las células planctónicas, sobrevivir y persistente en la superficie con mecanismos de regulación eficaces contra diferentes tipos de estrés.

Palabras clave: Listeria monocytogenes, biofilm, de dispersión, óxido nítrico, aceites esenciales, desinfectantes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Fluxograma que representa os sistemas de cultivos utilizados para a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e os métodos utilizados para análises qualitativa e quantitativa dos biofilmes 18
- Figura 2.2** Biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e IAL 633 (sorotipo 1/2a) por 1 dia, 4 dias e 8 dias a 25°C formados em microplacas de poliestireno de 96 poços (A) e em microplacas de aço inoxidável de 96 poços (B), quantificadas com cristal violeta. A condição que apresenta diferença estatística significativa em comparação com o controle (caldo BHI) está representada pelo asterisco ($P < 0,05$). Lm = *L. monocytogenes*.....23
- Figura 2.3** Populações de células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e IAL 633 (sorotipo 1/2a) aderidas em superfícies de aço inoxidável e de vidro (A) e células planctônicas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e IAL 633 (sorotipo 1/2a) remanescentes no caldo da cultura do sistema de formação do biofilme (B) por 1, 4 e 8 dias de incubação a 25°C sob agitação orbital. A enumeração das células sésseis e planctônicas foi determinada por semeadura em superfície em placa de ágar BHI. Lm = *Listeria monocytogenes*.....24
- Figura 2.4** Fotomicrografias adquiridas em microscópio de fluorescência utilizando ocular de 10x e objetiva de 40x. Biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) (B, D e F) e *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) (A, C e E) formados em superfície de aço inoxidável por 1 dia (A e B), 4 dias (C e D) e 8 dias (E e F) a 25°C sob agitação orbital. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis coradas de vermelho fluorescente (iodeto de propídeo)26
- Figura 2.5** Fotomicrografias de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) adquiridas com microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) com ocular de 10x e objetiva de 63x em óleo de imersão. (A e B) 1 dia de incubação; (C e D) 4 dias de incubação; (E e F) 8 dias de incubação; (D e F) mostram as vistas ortogonais dos biofilmes (XY, XZ e YZ); (G) quantificação de células viáveis e não viáveis por unidades de fluorescência por volume ($UF/\mu m^3$). As células foram coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente). Os asteriscos representam diferença estatística significativa, comparando células viáveis e não viáveis, por dia de incubação (** $P < 0,01$).....28
- Figura 2.6** Fotomicrografias de biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) adquiridas com microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) com ocular de 10x e objetiva de 63x em óleo de imersão. (A e B) 1 dia de incubação; (C e D) 4 dias de incubação; (E e F) 8 dias de incubação; (D e F) mostram as vistas ortogonais dos biofilmes (XY, XZ e YZ); (G) quantificação de células viáveis e não viáveis por unidades de fluorescência por volume ($UF/\mu m^3$). As células foram coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente). Os asteriscos representam diferença estatística significativa, comparando células viáveis e não viáveis, por dia de incubação (** $P < 0,01$).....29

Figura 3.1 Fluxograma que representa os sistemas de cultivos utilizados para a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e os métodos utilizados para análises qualitativa e quantitativa dos biofilmes após os tratamentos com óleos essenciais de plantas e sanitizantes comerciais.....40

Figura 3.2 Esquema da microplaca de poliestireno de 96 poços utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais e sanitizantes comerciais frente a cepas de *Listeria monocytogenes*43

Figura 3.3 Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (A e B) e de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (C e D) aderidas em superfícies de aço inoxidável (A e C) e de vidro (B e D) por (—) 4 dias e (▨) 8 dias enumeradas em placas de ágar BHI, após tratamento antimicrobiano por 1h. OE = óleo essencial.....57

Figura 3.4 Imagens adquiridas através de microscópio de fluorescência com o uso da ocular de 10x e objetiva de 20x. Células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) em superfície de aço inoxidável por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após tratamentos com (A, J) sem tratamento (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células coradas com Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Escala = 10 µm.....61

Figura 3.5 Imagens adquiridas através de microscópio de fluorescência com o uso da ocular de 10x e objetiva de 20x. Células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de aço inoxidável por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após tratamentos com (A, J) sem tratamento (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células coradas com Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Escala = 10 µm.....62

Figura 3.6 Fotomicrografias adquiridas com auxílio de microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) em ocular 10x e objetiva de 63x, sob imersão, mostrando as células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) em superfície de vidro por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após diferentes tratamentos: (A, J) água purificada esterilizada (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base de dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de

gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células viáveis coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e células mortas coradas com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente)64

Figura 3.7 Fotomicrografias adquiridas com auxílio de microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) em ocular 10x e objetiva de 63x, sob imersão, mostrando as células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de vidro por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após diferentes tratamentos: (A, J) água purificada esterilizada (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base de dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células viáveis coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e células mortas coradas com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente)66

Figura 3.8 Resultados da quantificação das células viáveis e não-viáveis de *L. monocytogenes* após os tratamentos com óleos essenciais e/ou sanitizantes comerciais através da quantificação de unidades de fluorescência por volume (UF/ μm^3). (A) *L. monocytogenes* IAL 633 e (B) *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas por 4 dias; (C) *L. monocytogenes* IAL 633 e (D) *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas por 8 dias. Os asteriscos representam diferença estatística significativa dos tratamentos em comparação com o controle. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,00170

Figura 4.1 Fluxograma que representa os sistemas de cultivos utilizados para os estudos de formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e os métodos utilizados para análises qualitativa e quantitativa dos biofilmes. SNP = nitroprussiato de sódio; L-NAME = cloridrato de N_ω-Nitro-L-arginina metil éster; C-PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-oxi-3-óxido77

Figura 4.2 Fotomicrografias que documentam as análises realizadas com marcadores fluorescentes para ROI e RNI em biofilmes de *L. monocytogenes* 1/2a (A, B, E, F, I, J, M e N) e *L. monocytogenes* 4b (C, D, G, H, K, L, O e P) na superfície de aço inoxidável após 4 dias (A, E, I, M, C, J, K, O) e 8 dias (B, F, J, N, D, H, L e P). Foram utilizados H₂DCF (A-D) para detectar peróxido de hidrogênio; DAFFM-DA (E-H) para detectar óxido nítrico; HEt (I-L) para detectar radicais superóxidos e DHR (M-P) para detectar peroxinitrito. Foram capturadas imagens em ocular de 10x e objetiva de 40x com auxílio de microscópio de fluorescência. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 μm 91

Figura 4.3 Fotomicrografias que documentam as análises realizadas com marcadores fluorescentes para moléculas intermediárias de oxigênio reativo (ROI) e para moléculas intermediárias de nitrogênio reativo (RNI) em biofilmes de *L. monocytogenes* 1/2a em superfície de borosilicato com 4 dias (A, C, E e G) e 8

dias (B, D, F e H) corados com marcadores fluorescentes. Imagens capturadas na ocular de 10x e em objetiva de 63x (sob imersão) com zoom de 2,5, por fluorescência e campo claro, com o auxílio de microscópio confocal a laser. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 μ m93

Figura 4.4 Fotomicrografias que documentam as análises realizadas com marcadores fluorescentes para moléculas intermediárias de oxigênio reativo (ROI) e para moléculas intermediárias de nitrogênio reativo (RNI) em biofilmes de *L. monocytogenes* 4b em superfície de borosilicato com 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) corados com marcadores fluorescentes. Imagens capturadas por fluorescência e campo claro com o auxílio de microscópio confocal a laser na ocular de 10x e em objetiva de 63x (sob imersão) com zoom de 2,5, por fluorescência e campo claro, com o auxílio de microscópio confocal a laser. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala= 10 μ m94

Figura 4.5 Quantificação de nitrito pelo método de Griess, nos meios de cultivo de *L. monocytogenes* IAL 633 (A e B) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (C e D) por 24h a 25°C, com adição de diferentes concentrações do doador de NO, SNP (A e C) e dos inibidores de NO, os compostos L-NAME e C-PTIO (B e D). Diferença estatística significativa quando comparado com o controle *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,00199

Figura 4.6 Resultados da quantificação de nitrito pelo método de Griess, no sobrenadante de cultivo de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) por 1, 4 e 8 dias a 25°C por método espectrofotométrico com reagente de Griess. Lm = *L. monocytogenes*. Diferença estatística significativa quando comparado com o controle (BHI) - ***P < 0,001 100

Figura 4.7 Células aderidas de (A) *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e (B) *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de aço inoxidável por 4 e 8 dias a 25°C tratadas com doador (SNP) e de inibidores de óxido nítrico (L-NAME e C-PTIO) por 1h a 25°C. Lm = *L. monocytogenes*. Diferença estatística significativa **P < 0,01 101

Figura 4.8 Células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) em aço inoxidável por 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) tratadas por 1h com SNP (C e D), L-NAME (E e F), C-PTIO (G e H), e sem tratamento (controle – A e B). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência com ocular de 10x e na objetiva de 20x. As células coradas com SYTO 9 em verde fluorescente e com iodeto de propídeo em vermelho fluorescente. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 μ m..... 104

Figura 4.9 Células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) em aço inoxidável por 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) tratadas por 1h com SNP (C e D), L-NAME (E e F), C-PTIO (G e H), e sem tratamento (controle – A e B). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência com ocular de 10x e na objetiva de 20x. As células coradas com SYTO 9 em verde fluorescente e com iodeto de propídeo em vermelho fluorescente. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 μ m..... 105

Figura 4.10 Resultados da quantificação de RNAm em culturas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) expostas a doador (SNP) e inibidores de NO (L-NAME e C-PTIO). Os genes estudados referiam-se à resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo em bactérias. Os níveis de expressão foram quantificados por PCR em tempo real pela síntese de DNA complementar (DNAC) a partir do RNA extraído das células. O RNAm quantificado foi normalizado para a quantidade de RNAr 16S da mesma cultura. As linhas pontilhadas indicam a taxa de expressão de 1 (sem alteração). Para diferença estatística significativa foram comparados os valores (SNP, L-NAME, C-PTIO) de cada gene com os valores obtidos do controle. *P<0,05 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Concentrações de óleos essenciais (OEs) e sanitizantes e suas combinações estudadas para erradicação de biofilmes maduros de <i>L. monocytogenes</i>	45
Tabela 3.2 Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	49
Tabela 3.3 Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de <i>Zingiber officinale</i> (gengibre).....	50
Tabela 3.4 Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais e sanitizantes comerciais frente a células planctônicas de <i>Listeria monocytogenes</i>	53
Tabela 4.1 Especificações dos <i>primers</i> que foram utilizados para avaliação da expressão gênica em <i>Listeria monocytogenes</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão Cérebro Coração)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme
ClO ₂	dióxido de cloro
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C-PTIO	2-(4-carboxifenil)-4, 4, 5, 5 tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido
DAFFM-DA	4-amino-5-metilamino-2', 7' difluoresceína diacetato
DHR	dihidrorodamina 123
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido deoxirribonucléico – ADN)
DNAc	DNA complementar
DNAe	DNA extracelular
DO	Densidade Ótica
EPS	<i>Extracellular Polimeric Substance</i> (substância polimérica extracelular)
FFNSC	<i>Flavor and Fragrance of Natural and Synthetic Compounds</i>
H ₂ DCF-DA	5-(6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HEt	hidroetidina
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IE	ionização eletrônica
IR	Índice de Retenção
IS	Índice de Similaridade
kHz	<i>quilohertz</i>
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>

L-NAME	N ω -Nitro-L-arginina metil éster
NaNO ₂	nitrito de sódio
ND	não determinado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NO	óxido nítrico
NOSs	óxido nítrico sintases
O ²⁻	Radicais superóxidos
OE _s e OE	óleo (s) essencial (is)
ONOO ⁻	peroxinitrito
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppm	partes por milhão
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico – ARN)
RNA _m	RNA mensageiro
RNI	<i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>
ROI	<i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
rpm	rotações por minuto
SNP	nitroprussiato de sódio
UF	Unidades de Fluorescência
UFC	Unidades Formados de Colônia

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
Capítulo 1 - Introdução	2
1.1 Biofilmes	2
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.3 Controle de biofilmes de importância para a garantia da inocuidade de alimentos.....	6
1.4 Uso de sanitizantes sintéticos e naturais no controle de biofilmes	8
1.5 O uso de óxido nítrico no controle de biofilmes	10
1.6 Expressão gênica e biofilmes	12
1.7 Objetivos gerais	14
1.7.1 Objetivos específicos	14
Capítulo 2 - Biofilmes maduros de <i>Listeria monocytogenes</i>: viabilidade celular e características estruturais.....	16
2.1 Introdução	17
2.2 Materiais e métodos	18
2.2.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo	19
2.2.2 Formação de biofilme em sistemas de microplacas de 96 poços.....	19
2.2.3 Enumeração de células sésseis e planctônicas de <i>L. monocytogenes</i>	20
2.2.4 Estruturas de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> formados em superfícies abióticas.....	21
2.2.5 Análise estatística	23
2.3 Resultados	23
2.3.1 Formação de biofilme em sistemas de microplacas de 96 poços.....	23
2.3.2 Enumeração de células sésseis e planctônicas de <i>L. monocytogenes</i>	24
2.3.3 Estrutura de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> formados em superfícies abióticas.....	25
2.4 Discussão.....	30
2.5 Conclusões.....	34

Capítulo 3 - Eficácia de óleos essenciais e de sanitizantes comerciais em biofilmes maduros de *Listeria monocytogenes*37

3.1 Introdução	38
3.2 Materiais e métodos	39
3.2.1 Bactérias e condições de cultura	41
3.2.2 Óleos essenciais	41
3.2.3 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais	41
3.2.4 Sanitizantes comerciais	42
3.2.5 Determinação da CIM e da CBM de óleos essenciais e de sanitizantes comerciais	42
3.2.6 Efeito dos óleos essenciais e dos sanitizantes comerciais em biofilmes maduros de <i>L. monocytogenes</i>	44
3.2.7 Estrutura e viabilidade do biofilme de <i>L. monocytogenes</i> formado em superfícies abióticas após desinfecção com óleos essenciais e sanitizantes comerciais	46
3.2.7.1 Superfície de aço inoxidável	46
3.2.7.2 Superfície de vidro	47
3.2.8 Análise estatística	48
3.3 Resultados e discussão	48
3.3.1 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais	48
3.3.2 Determinação da CIM e CBM dos óleos essenciais e dos sanitizantes comerciais	52
3.3.3 Efeito dos óleos essenciais e sanitizantes comerciais em biofilmes maduros de <i>L. monocytogenes</i>	54
3.3.4 Estrutura e viabilidade de células de <i>L. monocytogenes</i> em biofilme formado em superfícies abióticas e tratado com óleos essenciais e/ou sanitizantes comerciais	59
3.4 Conclusão	71

Capítulo 4 - Efeito antibiofilme de doador de óxido nítrico em biofilmes pré-formados de *Listeria monocytogenes*73

4.1 Introdução	75
4.2 Materiais e métodos	77
4.2.1 Cepas bacterianas	78
4.2.2 Detecção de intermediários de oxigênio reativo e de nitrogênio reativo em biofilmes maduros de <i>L. monocytogenes</i>	78
4.2.3 Avaliação do efeito inibitório de doador e de inibidores de óxido nítrico frente a células planctônicas de <i>L. monocytogenes</i>	81

4.2.4 Dosagem de nitrito presente nas culturas planctônicas de <i>L. monocytogenes</i>	82
4.2.5 Enumeração de células aderidas de <i>L. monocytogenes</i> em superfícies abióticas após tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico	83
4.2.6 Avaliação da arquitetura de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico	84
4.2.7 Análise de expressão gênica em biofilmes pré-formados e culturas planctônicas de <i>L. monocytogenes</i> após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico	85
4.2.8 Análise estatística	89
4.3 Resultados e discussão	90
4.3.1 Detecção de intermediários de oxigênio reativo e de nitrogênio reativo em biofilmes maduros de <i>L. monocytogenes</i>	90
4.3.2 Ação inibitória do doador e de inibidores de óxido nítrico frente a células planctônicas de <i>L. monocytogenes</i>	97
4.3.3 Dosagem de nitrito nas culturas de <i>L. monocytogenes</i>	98
4.3.4 Enumeração de células aderidas de <i>L. monocytogenes</i> em superfícies abióticas após tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico	101
4.3.5 Avaliação da arquitetura de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico	102
4.3.6 Análise de expressão gênica em biofilmes pré-formados e culturas planctônicas de <i>L. monocytogenes</i> após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico	106
4.4 Conclusões	109
Considerações Finais	112
Referências	115

Capítulo 1

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Biofilmes

As bactérias há anos têm sido estudadas como células planctônicas, no entanto, a maioria delas é encontrada na natureza, em ambientes industriais, em hospedeiros e em equipamentos médicos, vivendo em forma de comunidades multicelulares aderidas a uma superfície biótica ou abiótica envolvidas por uma matriz polimérica extracelular (EPS – *Extracellular Polymeric Surface*) secretada pelas próprias bactérias, constituindo assim biofilmes (DONLAN, 2002; HARRISON et al., 2005).

A EPS produzida pelas bactérias, consiste principalmente de polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando à formação de uma rede gelatinosa tridimensional que envolve as células no biofilme, aprisiona nutrientes e protege as células da ação de antimicrobianos (FLEMMING, WINGENDER, 2010; STEWART, FRANKLIN, 2008).

Na matriz de EPS há DNA de diferentes tipos como o DNA genômico e o DNA extracelular (DNAe). O DNAe é considerado 50% mais abundante que o DNA genômico, com composição semelhante ao mesmo (WHITCHURCH et al., 2002, STEINBERGER, HOLDEN, 2005, ALLESEN-HOLM et al., 2006). No entanto, a origem do DNAe ainda não foi totalmente esclarecida, mas existem várias suposições de que ele possa ser liberado pelas bactérias por meio da lise celular ou por transporte vesicular, sendo regulado via *quorum sensing* (PETERSEN, TAO, SCHEIE, 2005, ALLESEN-HOLM et al., 2006, SPOERING, GILMORE, 2006, QIN et al., 2007, SCHOOLING, HUBLEY, BEVERIDGE, 2009, WU, XI, 2009). O DNAe parece exercer um papel importante na comunicação intercelular e na manutenção da biomassa, arquitetura e morfologia dos biofilmes, principalmente durante a adesão e agregação inicial das bactérias a superfícies inertes (WHITCHURCH et al., 2002, PETERSEN, TAO, SCHEIE, 2005, ALLESEN-HOLM et al., 2006, ECKHART et al., 2007, QIN et al., 2007, MANN et al., 2009, TETZ, ARTEMENKO, TETZ, 2009, VILAIN et al., 2009, DAS et al., 2010, HARMSSEN et al., 2010).

A formação de biofilme compreende uma sequência de etapas: 1. pré-condicionamento da superfície de adesão por macromoléculas presentes no fluido líquido; 2. adsorção das células na superfície através de interações fracas, como

força de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas; 3. desorção de células aderidas reversivelmente; 4. adsorção irreversível de células bacterianas na superfície, mediada por adesinas microbianas específicas; 5. produção de moléculas sinalizadoras célula-célula; 6. multiplicação celular, replicação e produção de EPS; 7. dispersão de células individuais ou em grupos, favorecendo a sobrevivência microbiana (BREYERS, RATNER, 2004; FRANCOLINI, DONELLI, 2010; KARATAN, WATNICK, 2009; KUMAR, ANAND, 1998).

De acordo com Kaplan (2010), existem três modos diferentes de dispersão de biofilmes: erosão, “*sloughing*” e “*seeding dispersal*”. O processo de erosão refere-se à liberação contínua de células individuais ou de pequenos grupos de células do biofilme. A liberação de grandes porções do biofilme, geralmente durante a fase de maturação é denominada “*sloughing*”, enquanto que “*seeding dispersal*” é o processo de liberação rápida de um grande número de células individuais ou de pequenos grupos de células, levando à formação de cavidades ocas dentro do biofilme.

Algumas bactérias apresentam um processo eficiente de comunicação célula-célula, denominado *quorum sensing*, definido como um mecanismo regulatório mediado por pequenas moléculas denominadas autoindutores, que expressam uma resposta unificada e coordenada em uma densidade populacional de forma dependente para realizar certas funções que seriam difíceis, senão impossíveis de conseguir para uma única célula bacteriana (JUHAS, EBERL, TÜMMLER, 2005).

A maioria das moléculas que atuam como sinalizadoras de *quorum sensing* pode ser classificada em três grupos principais: acilhomoserina lactonas (AHLs), oligopeptídeos e LuxS/autoindutor-2 (KELLER, SURETTE, 2006). Enzimas como lactonases e acilases apresentam capacidade de hidrolisar fatores de *quorum sensing* como AHLs (*quorum sensing* de bactérias Gram-negativas), reduzindo a formação de biofilmes (DONG, WANG, ZHANG, 2007; LEADBETTER, GREENBERG, 2000; PAUL et al., 2009).

A formação de biofilme não é necessariamente um fator de virulência, pois muitos micro-organismos não patogênicos produzem biofilmes. No entanto, biofilmes formados por patógenos parecem facilitar a sobrevivência desses micro-organismos no ambiente e no hospedeiro (HALL-STOODLEY, STOODLEY, 2005).

As células planctônicas podem aderir em diversos tipos de superfícies para formar biofilme, incluindo aparelhos médicos, tecidos vivos, tubulações de água e

equipamentos industriais. Em ambientes de processamento de alimentos, os biofilmes podem formar-se em superfícies de manipulação, em equipamentos de processamento, de transporte (por exemplo, correias transportadoras) bem como em áreas de armazenamento. Na indústria alimentícia, a formação de biofilmes pode levar à contaminação de produtos, reduzir a vida de prateleira dos alimentos e transmitir patógenos aos consumidores (DONLAN, 2002, DYNES et al., 2009, WONG, 1998, KUMAR, ANAND, 1998).

Várias bactérias deteriorantes e patogênicas podem estar associadas a superfícies de manipulação e equipamentos de processamento de alimentos, tais como *Listeria* sp., *Salmonella* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Plesiomonas* sp., *Shigella* sp. e *Escherichia* sp. (GIAOURIS, NYCHAS, 2006, GRAM et al., 2007, GUNDUZ, TUNCEL, 2006, KANDHAL et al., 2004).

1.2 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* consiste de várias espécies incluindo *L. monocytogenes*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. fleischmannii*, *L. aquática*, *L. floridensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* e *L. grayi* (DEN BAKKER et al., 2014). No entanto, *L. monocytogenes* é a espécie mais comumente associada com doenças em animais e humanos (ORSI, DEN BAKKER, WIEDMANN, 2011).

L. monocytogenes é uma bactéria que vive no solo como saprófita, mas é patogênica se ingerida por seres humanos ou animais suscetíveis (FREITAG, PORT, MINER, 2009). Esta bactéria já foi isolada de diferentes alimentos como peixes, carne bovina moída crua, presunto cozido e mussarela fatiados, leite cru e pasteurizado, queijos, lingüiça frescal, salame, carne de peru, embutidos cárneos, alimentos prontos para o consumo, além de produtos de origem vegetal (ALVES et al., 2005; ARAÚJO et al., 2002; ATANASSOVA; REICH; KLEIN, 2008; CABEDO et al., 2008; MARTINS, GERMANO, 2011; PAO et al., 2008; RATTI, 2006; SAKATE et al. 2003; SILVA et al., 2004; SOUZA et al., 2008).

L. monocytogenes é bactéria gram-positiva, não formadora de esporos, móvel devido a flagelos peritríquios, anaeróbia facultativa e é capaz de sobreviver e multiplicar-se sob condições ambientais adversas, tais como temperaturas de

refrigeração (4-10°C), altas concentrações de cloreto de sódio (10,5 a 30,5%) e ampla faixa de pH de 5 a 9, além de possuir mecanismos de adaptação e resistência a antimicrobianos (BORTOLUSSI, 2008; GANDHI, CHIKINDAS, 2007; FRANCO, LANDGRAF, 2005).

L. monocytogenes pode causar a listeriose, uma doença humana grave que acomete principalmente gestantes, recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000). A maioria dos casos de listeriose leva à hospitalização e causam cerca de 20 a 30% de letalidade. As principais síndromes clínicas incluem infecções sistêmicas (com comprometimento do sistema nervoso central), infecções perinatais e aborto. Entretanto, mais recentemente foram relatados casos de gastroenterite febril causada por *L. monocytogenes* (KATHARIOU, 2002; DREVETS; BRONZE, 2008; TODD, NOTERMANS, 2011).

Segundo Orsi, den Bakker e Wiedmann (2011), há 4 linhagens evolucionárias de *L. monocytogenes* (I, II, III e IV), sendo que a maioria dos isolados pertencem às linhagens I e II, englobando os sorotipos frequentemente associados com casos clínicos humanos, como o sorotipo 1/2a (linhagem II) e os sorotipos 1/2b e 4b (linhagem I). Um fato intrigante é que a linhagem II inclui a maioria dos isolados de alimentos, enquanto que a maioria dos surtos de listeriose está relacionado com a linhagem I, o que leva a supor que o microambiente do alimento pode exercer influência importante sobre a expressão de fatores de virulência em *L. monocytogenes*.

A capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver a baixas temperaturas, colonizar superfícies, formar biofilmes e, resistir a vários fatores ambientais é crucial para sua persistência em ambientes de processamento de alimentos (RIEU et al., 2008). Esta bactéria é capaz de aderir e formar biofilmes em uma variedade de superfícies encontradas em indústrias de processamento e manipulação de alimentos (aço inoxidável, plástico, vidro, polipropileno, mármore e granito), com potencial para contaminar os produtos durante o processo (BONSAGLIA et al., 2014, KALMOKOFF et al., 2001, TEIXEIRA et al., 2008).

Tresse et al. (2007), testaram a capacidade de adesão de 101 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes com listeriose, de amostras alimentícias e de indústrias de processamento de alimentos. Todas as cepas analisadas foram capazes de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável e poliestireno, sendo

que as de origem industrial mostraram maior capacidade de adesão que as de origem clínica. Norwood e Gilmour (1999) observaram que cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2c apresentaram maior adesão na superfície de aço inoxidável que as cepas dos sorotipos 1/2a e 4b e, que o sorotipo 4b formou mais biofilme em comparação com o sorotipo 1/2a. Djordjevic, Wiedmann e McLandsborough (2002) também demonstraram variação na formação de biofilmes em superfícies abióticas como cloreto de polivinil e aço inoxidável entre as cepas de *L. monocytogenes*, sendo as cepas da linhagem I apresentando maior capacidade de formação de biofilmes do que as cepas das linhagens II e III.

Biofilmes de *L. monocytogenes* podem comprometer processos de higienização e sanitização nas indústrias (LERICHE, CARPENTIER, 2000, NORWOOD, GILMOUR, 2001, CARPENTIER, CHASSAING, 2004), sendo essa bactéria frequentemente isolada de diversos locais na indústria de alimentos, como em chão, ralos e equipamentos. Locais de difícil acesso para limpeza e sanitização são especialmente preocupantes como pontos de contaminação por *L. monocytogenes*, incluindo juntas, cantos, pontos de conexão e em locais sem saída em sistemas de tubulação (MORETRO, LANGSRUD, 2004; PAN, BREIDT, KATHARIOU, 2006).

1.3 Controle de biofilmes de importância para a garantia da inocuidade de alimentos

Existem várias estratégias para controlar a formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos, tais como higienização de instalações, uso de equipamentos com formato adequado, uso de materiais de fácil higienização e escolha correta de detergentes e desinfetantes, associados a métodos físicos para remoção (KUMAR; ANAND, 1998).

A limpeza regular de superfícies pode prevenir a contaminação de produtos alimentícios, desde que sejam removidos os resíduos de alimentos e outros componentes que possam promover a proliferação bacteriana e formação de biofilmes especialmente em estágios iniciais de contaminação (SIMÕES, SIMÕES, VIEIRA, 2010).

Meyer (2003) sugeriu três diferentes estratégias para prevenir a formação de biofilmes em superfícies: a) higienização imediata, antes do desenvolvimento do

biofilme; b) uso de sanitizantes para eliminar células aderidas; e, c) inibição da adesão de micro-organismos pela escolha de materiais de superfícies que não permitam facilmente a adesão ou agregação de nutrientes.

Uma alternativa na prevenção de formação de biofilmes é o uso de biosurfactantes, que são moléculas sintetizadas por micro-organismos e que são ativas na superfície microbiana. Os surfactantes de origem microbiana mais conhecidos são os ramnolípidios de *Pseudomonas aeruginosa*, surfactina de *Bacillus subtilis*, emulsana de *Acinetobacter calcoaceticus* e soforolípidios de *Candida bombicola* (NITSCHKE; COSTA, 2007).

Meylheuc et al. (2006), revelaram que o uso de biosurfactantes obtidos de *Pseudomonas fluorescens* e de *Lactobacillus helveticus* impregnados em superfícies de aço inoxidável inibiram a adesão de cepas de *L. monocytogenes*. Araújo et al. (2011), sugeriram que o ramnolípido de *P. aeruginosa* PA1, tem potencial para o controle de biofilmes de *L. monocytogenes*.

O uso de superfícies quimicamente modificadas no controle da formação de biofilmes é também uma alternativa promissora. Dong et al. (2005) e Wang et al. (2006), demonstraram que o uso de superfície de aço inoxidável tratada com polietileno glicol reduziu a adesão de *L. monocytogenes* em cerca de 90% em comparação com superfícies não tratadas.

A limpeza eficaz de uma superfície pode remover 90% ou mais dos micro-organismos aderidos, mas geralmente não tem a mesma eficácia bactericida, sendo necessária a utilização de desinfetantes, pois as bactérias podem se redepositar e voltar a formar biofilme, dependendo da disponibilidade de água e nutrientes (GRAM et al., 2007).

Yang et al. (2012) demonstraram que é vantajoso o uso de estratégias combinadas para combater biofilmes, com a inibição da adesão inicial de micro-organismos à superfície pelo uso de métodos químicos, físico e biológicos. Durante a formação e maturação do biofilme, são necessárias medidas como rompimento da matriz exopolissacarídica, bem como interferência no metabolismo dos micro-organismos. Em biofilmes estabelecidos, é necessário matar as células presentes com o uso de agentes que aumentem a penetração de antimicrobianos e facilitem a atividade de fagos. No estágio final em biofilmes maduros, é de interesse aplicar estratégias para aumentar o desprendimento de células, com o uso de moléculas que induzam à dispersão.

A remoção de biofilmes bem estabelecidos é mais difícil. Além da proteção conferida pela EPS observa-se grande heterogeneidade fenotípica, com populações de células que expressam diferentes níveis de resistência, sendo necessária a utilização de substâncias combinadas que rompam a estrutura da EPS e facilitem a entrada de desinfetantes para matarem os micro-organismos ou de substâncias que induzam a dispersão de células do biofilme (STEWART, FRANKLIN, 2008).

1.4 Uso de sanitizantes sintéticos e naturais no controle de biofilmes

Os processos de limpeza e desinfecção são grandes fatores de estresse para as bactérias no ambiente de processamento de alimentos (PAN, BREIDT, KATHARIOU, 2006). Diversos desinfetantes químicos são utilizados na indústria, sendo divididos em grupos de acordo com seu modo de ação: a) agentes oxidantes, como por exemplo compostos a base de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio e ácido peroxiacético; b) compostos que atuam na superfície, que incluem compostos de amônio quaternário e aniônicos; e, c) iodóforos, que podem penetrar na parede celular, resultando no rompimento da estrutura protéica e de ácidos nucleicos (VAN HOUDT, MICHIELS, 2010).

No entanto, Chorianopoulos et al. (2008) testaram o efeito antibiofilme de três sanitizantes (ácido hidrolórico, ácido láctico e hidróxido de sódio) frente a células de *L. monocytogenes* aderidas em aço inoxidável e, demonstraram que foi necessário um aumento no período de exposição (de 60 para 180 minutos) dos sanitizantes para ocorrer redução do número de células aderidas.

De acordo com Cruz e Fletcher (2012), células sésseis de *L. monocytogenes* podem apresentar resistência à ação de certos sanitizantes. Chavant, Gaillard-Martinie e Hébraud (2004), também demonstraram que biofilmes de *L. monocytogenes* não foram eliminados após exposição à sanitizantes, principalmente em biofilmes maduros.

Pan, Breidt e Kathariou (2006) identificaram que um agente sanitizante comercial à base de peróxido de hidrogênio (Matrixx®), e também outros desinfetantes comumente utilizados (cloro e composto de amônio quaternário) foram ineficazes na eliminação de biofilmes de *L. monocytogenes* de superfícies de aço inoxidável e Teflon®.

A utilização de concentrações recomendadas pelo fabricante dos sanitizantes mais comuns não foram eficazes na erradicação de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfície de aço inoxidável, segundo trabalhos de Bae, Baek e Lee (2012) e Cruz e Fletcher (2012).

De acordo com Von Houdt e Michiels (2010), a maior resistência a biocidas observada para células em biofilmes pode ser resultando da interferência da EPS, indicando que os desinfetantes efetivos frente a células planctônicas não são necessariamente eficazes frente a células de biofilmes.

Bridier et al. (2011), sugeriram que a resistência de biofilmes a desinfetantes está relacionada com a estrutura tridimensional, com a heterogeneidade dentro da estrutura de biofilmes e, também pode ser multifatorial.

Há evidências que a aplicação de “biossoluções” em complementação e/ou em substituição a métodos convencionais pode ser eficiente para controle e remoção de micro-organismos em biofilmes. Estas biossoluções podem conter enzimas, fagos e moléculas antimicrobianas de origem microbiana como biosurfactantes e bacteriocinas (SIMÕES, SIMÕES, VIEIRA, 2010).

A aplicação de peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas, foi estudado por Minei et al. (2008) para o controle de biofilme. Aqueles autores demonstraram que o uso de cultura bacteriocinogênica de *Enterococcus faecium* inibiu a adesão e formação de biofilme por *L. monocytogenes* por até 48h em lâminas de aço inoxidável.

Nostro et al. (2010) avaliaram o efeito da incorporação da bacteriocina nisina em filmes de polietileno-co-acetato de vinila sobre a habilidade de formação de biofilmes, sendo demonstrado que na presença de nisina houve inibição de *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Em uma abordagem atual para o controle de biofilmes, muitos compostos químicos e enzimas têm sido identificados como inibidores de *quorum sensing* bacterianos, os quais podem atenuar a virulência, reduzir a formação de biofilmes e aumentar a sensibilidade bacteriana a antimicrobianos (NI et al., 2009).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o uso de enzimas produzidas por micro-organismos e liberadas em biofilmes pode aumentar a dispersão celular. Kaplan et al. (2004), observaram que a enzima dispersina B produzida pelo patógeno periodontal *Actinobacillus actinomycescomitans* removeu eficientemente o biofilme de *Staphylococcus epidermidis* de superfícies plásticas.

Ainda, vários autores têm demonstrado que óleos essenciais (OEs) ou seus componentes majoritários são potenciais candidatos para o controle de biofilmes bacterianos. Jadhav et al. (2013) revelaram que o óleo essencial de milefólio (*Achillea millefolium*) foi efetivo na inibição da adesão inicial de células de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável, poliestireno e polietileno. Adukwu, Allen e Phillips (2012), encontraram valores próximos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) para o óleo essencial de capim-limão frente a cepas de *Staphylococcus aureus* planctônicas e sésseis. No entanto, aqueles autores relataram que as concentrações para erradicação completa de biofilmes foram bem maiores.

A aplicação de óleos essenciais em biofilmes pré-formados de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas têm demonstrado potencial para erradicação de células das superfícies dependendo da concentração utilizada e do tempo de exposição do agente antibiofilme (DESAI et al., 2012, LEONARD et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2012, PÉREZ-CONESA et al., 2011).

Óleos essenciais são compostos naturais voláteis, caracterizados por forte odor e são metabólitos secundários de plantas aromáticas. Esses componentes podem apresentar propriedades antisséptica e medicinal (bactericida, virucida e fungicida), sendo importantes na conservação de alimentos e como antimicrobianos (BAKKALI et al., 2008). De acordo com Burt (2004), os óleos essenciais causam danos na membrana citoplasmática, resultando em perda do conteúdo celular e depleção da força próton motriz.

1.5 O uso de óxido nítrico no controle de biofilmes

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula gasosa reativa, conhecida como sinalizadora universal em sistemas biológicos. Em bactérias, NO pode ser produzido como um subproduto do metabolismo anaeróbio ou pode ser sintetizado por atividade enzimática, envolvendo NO sintases - NOSs (MCDOUGALD et al., 2010).

Em organismos superiores, NOSs são monooxigenases contendo o grupamento heme em suas estruturas que oxidam L-arginina a NO. A ocorrência de poucos homólogos de NOSs de mamíferos foi reportada em bactérias, e eles apresentam algumas funções que os diferenciam das NOSs de mamíferos, tais

como a nitração de diferentes metabólitos e a proteção contra o estresse oxidativo (SUDHAMSU, CRANE, 2009).

Embora não seja simples atribuir em bactérias a atividade de NOS a uma proteína específica, atualmente não há dúvida que as bactérias possuam proteínas semelhante a NOS. Além disso, as bactérias podem também produzir NO por outras vias, muitas das quais não são dependentes de NOSs: a) a enzima nitrato redutase pode converter nitrito a NO na presença de pequenas concentrações de nitrato; b) no ciclo da uréia, L-arginina pode ser convertida a citrulina, pela ação da enzima arginina deiminase, em uma única etapa ou c) essa mesma conversão pode ocorrer em duas etapas, pela ação das enzimas arginase ou ornitina carbamoil transferase (JANSSON, LINDBLAD, 1998; SUDHAMSU, CRANE, 2009; VIATOR et al., 2008; WEI et al., 2007; YAMASAKI, SAKIHAMA, 2000).

Em organismos superiores, a produção de NO pode ocorrer pela enzima NO sintase em decorrência do reconhecimento de produtos microbianos pelos receptores do tipo Toll que estão na superfície de macrófagos. Os macrófagos são ativados e a produção de NO ocorre como resposta do mecanismo de defesa do hospedeiro. No hospedeiro humano, patógenos intracelulares, como é o caso de *L. monocytogenes*, não são afetados pelo NO produzido por macrófagos infectados e podem disseminar-se para outras células, por mecanismos ainda não completamente elucidados (COLE et al., 2012).

Alguns trabalhos revelaram a presença de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em biofilmes maduros de diferentes espécies de bactérias através do uso de marcadores fluorescentes específicos. Webb, Givskov e Kjelleberg (2003) demonstraram que em biofilmes de dez dias formados por *P. aeruginosa* ocorreram morte e alterações celulares em microcolônias, relacionadas com o acúmulo de espécies de oxigênio reativo, conforme reveladas com o fluoróforo dihidrorodamina 123. Barraud et al. (2006) também observaram radicais superóxidos (marcados com hidroetidina) e peroxinitrito (marcado com dihidrorodamina) em biofilmes de *P. aeruginosa* formados por sete dias, indicando que a presença de moléculas de nitrogênio reativo podem desempenhar um papel importante nos processos de morte e dispersão celular.

Miranda et al. (2011) detectaram NO (indiretamente, pela quantificação de nitrito no meio de cultura) e espécies reativas de oxigênio (extracelulares e intracelulares) em biofilmes de *S. aureus* formados por 18h, 24h e 48h em superfície

de poliestireno, e observaram maior concentração dessas moléculas no maior tempo de incubação.

O óxido nítrico parece ter efeito universal na dispersão de células de biofilmes tanto formados por bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (XIOUNG, LIU, 2010). Recentemente, vários trabalhos têm demonstrado que o uso de pequenas quantidades não-tóxicas de doadores de óxido nítrico em culturas de biofilmes favorece a etapa de dispersão (BARRAUD et al., 2006; BARRAUD et al., 2009a).

Marvasi et al. (2014) testaram diferentes doadores de NO na dispersão de biofilmes formados por diferentes sorovares de *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* O157:H7 em superfícies de plástico e de aço inoxidável em diferentes temperaturas. Esses mesmos autores reportaram que todos os doadores de NO testados induziram a dispersão de biofilmes (35 a 80%) após 6h de aplicação.

Barraud et al. (2009b) examinaram os efeitos de NO em biofilmes formados por bactérias e fungos de significância clínica e industrial, observando que doadores de NO, em baixas concentrações, induziram a dispersão e reduziram a formação de biofilmes por *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Bacillus licheniformis*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Staphylococcus epidermidis*.

O uso de doadores de NO em baixas concentrações (da ordem de nanomolar a picomolar) para induzir a dispersão de biofilmes parece ser seguro para humanos e para o meio ambiente (BARRAUD et al., 2009b). Os doadores de NO apresentam o mesmo efeito na dispersão de biofilmes em comparação com a adição direta de NO e, apresentam menor toxicidade em comparação com o gás NO (BARRAUD et al., 2009a).

1.6 Expressão gênica e biofilmes

Dados sobre mecanismos moleculares que regulam a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* são escassos. Luo et al. (2013) utilizaram técnicas de microarranjo de DNA para análise do genoma completo de *L. monocytogenes* EGDe, visando à identificação da expressão diferencial de genes supostamente associados à formação de biofilmes e expressão de fatores de virulência. A análise comparativa do transcriptoma indicou que havia cerca de 21,9% dos genes com expressão alterada nas culturas em biofilme, comparadas com células planctônicas.

A análise de genes isoladamente também pode contribuir para ampliar o conhecimento de mecanismos que atuam na formação de biofilmes. Huang et al. (2013), verificaram a expressão dos genes *gltB* e *gltC* na resposta aos estresse oxidativo em biofilmes de *L. monocytogenes* e, demonstraram que cepas mutantes apresentaram redução na adesão inicial a superfícies abióticas. Luo et al. (2013) construíram mutantes com deleção do gene *PrfA* em *L. monocytogenes* EGDe e detectaram 185 genes regulados por este ativador transcricional, e com influência na formação de biofilme. Destes, 175 genes apresentaram expressão completamente oposta entre o mutante *PrfA* e a cepa selvagem durante a formação de biofilme.

Na literatura são poucos os trabalhos que verificaram a ocorrência de modificações no nível de expressão gênica em biofilmes após o tratamento com sanitizantes comerciais ou naturais em *L. monocytogenes*. Rodrigues et al. (2011) observaram que concentrações de desinfetantes que levaram a uma redução significativa de biofilmes de *L. monocytogenes* e de *Salmonella enterica* Enteritidis, induziram a virulência das células sobreviventes e, portanto, aumentaram o potencial de infecção em caso de contato com o hospedeiro.

Van der Veen e Abee (2010a), demonstraram que o gene *sigB*, o qual codifica um dos principais reguladores transcacionais de genes em resposta a estresse, está envolvido na resistência de células planctônicas e de biofilmes de *L. monocytogenes* aos desinfetantes cloreto de benzalcônio e ácido peracético. Van der Veen e Abee (2010b), também demonstraram que os genes *HrcA* e *DnaK* são importantes para a resistência de células planctônicas e biofilmes de *L. monocytogenes* frente a cloreto de benzalcônio e ácido peracético.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a possível influência de doadores de NO na expressão gênica em biofilmes de *L. monocytogenes*. Apenas o trabalho de Mraheil et al. (2011), descreve a utilização da técnica de microarranjo do genoma completo de *L. monocytogenes*, para a análise transcricional do patógeno em macrófagos ativados por interferon- γ , a fim de entender quais genes poderiam estar envolvidos na adaptação da resposta imune inata do hospedeiro. Aqueles autores identificaram genes de *L. monocytogenes* regulados somente nos macrófagos ativados, sendo que alguns desses genes estavam relacionados com o aumento do metabolismo oxidativo e nitrosativo da bactéria.

1.7 Objetivos gerais

- Avaliar a estrutura e viabilidade de biofilmes formados por *L. monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e a presença de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo nos biofilmes.

- Estudar o efeito antibiofilme de óleos essenciais de plantas, de sanitizantes comerciais e de óxido nítrico, na erradicação de biofilmes pré-formados de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas.

1.7.1 Objetivos específicos

- Estudar a capacidade de formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas (poliestireno, aço inoxidável e vidro), por diferentes períodos a 25°C.

- Avaliar a arquitetura e a dispersão em biofilmes formados por *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável e de vidro, por meio de técnicas de cultivo e de microscopia de fluorescência e confocal a laser.

- Observar o efeito inibitório e a atividade antibiofilme de diferentes substâncias como óleos essenciais de plantas e sanitizantes comerciais, aplicados sozinhos ou em combinação, frente a células planctônicas e sésseis de *L. monocytogenes*.

- Verificar a presença de moléculas de estresse oxidativo e nitrosativo em biofilmes maduros de *L. monocytogenes* formados em aço inoxidável e vidro.

- Observar o efeito inibitório e a atividade antibiofilme de doador e inibidores de óxido nítrico frente a células planctônicas e sésseis de *L. monocytogenes*.

- Verificar a alteração da expressão de genes relacionados aos estresses oxidativo e nitrosativo e do gene regulador relacionado com virulência e formação de biofilmes, após a indução de estresse nitrosativo em culturas de *L. monocytogenes*.

Capítulo 2

Capítulo 2 - Biofilmes maduros de *Listeria monocytogenes*: viabilidade celular e características estruturais

Resumo

Biofilmes são comunidades microbianas que desempenham um papel importante na persistência de bactérias patogênicas em locais de processamento de alimentos, devido à maior tolerância a condições adversas apresentada por células sésseis em comparação com as células planctônicas. A maioria dos trabalhos dá ênfase para as etapas iniciais de formação de biofilmes e para a quantificação da biomassa total. No presente trabalho, foram estudados biofilmes maduros e foram quantificadas as células viáveis e mortas de *Listeria monocytogenes*. Para isso, foram utilizados três tipos de superfícies frequentemente encontradas em cozinhas e nas indústrias de alimentos (aço inoxidável, vidro e poliestireno) para a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* a 25°C por até 8 dias de incubação. Os experimentos foram realizados através de métodos de cultivo, quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta, e estimativa de células viáveis aderidas à superfície de vidro por quantificação por fluorescência sob microscopia com o uso de corantes de viabilidade celular. Os resultados da quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta, revelaram que ambas as cepas de *L. monocytogenes* foram classificadas como fracas formadoras de biofilme em superfícies de aço inoxidável e poliestireno. Populações de *L. monocytogenes* aderidas em superfícies de aço inoxidável e de vidro alcançaram cerca de 10^6 - 10^8 UFC/cm² durante 8 dias de incubação e, neste mesmo período, cerca de 10^{10} UFC/mL de células planctônicas estavam livres no meio de cultivo, mesmo com a substituição periódica do sobrenadante da cultura de biofilme por meio fresco. Os biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies de vidro e de aço inoxidável apresentaram estruturas semelhantes a “favo de mel” em 8 dias de incubação. O desprendimento de agregados celulares de *L. monocytogenes* e a presença de cavidades de diferentes tamanhos nos biofilmes foram observados sob microscopia de fluorescência e microscopia confocal a laser, no 4° e no 8° dia de incubação. Apesar da formação de biofilmes pouco densos, células de *L. monocytogenes* permaneceram viáveis após 8 dias de incubação, com potencial para dispersão e colonização de novos nichos.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, superfícies abióticas, adesão, biofilme maduro, dispersão

2.1 Introdução

Listeria monocytogenes pode se fixar em vários tipos de superfícies e formar biofilmes, sendo este aspecto de especial preocupação para o controle de contaminação em locais de difícil acesso em equipamentos de produção ou áreas de processamento de alimentos (PAN, BREIDT, KATHARIOU, 2006).

Os biofilmes de *L. monocytogenes* têm sido estudados de acordo com diferentes parâmetros, tais como as superfícies de adesão, meio de cultivo e temperatura de formação (BONSAGLIA et al., 2014; DI BONAVENTURA et al., 2008; SILVA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008; ZAMEER et al., 2010), diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e pH (BELESSI et al., 2011b) variação na formação de biofilmes entre diferentes isolados (BORUCKI et al., 2003; KADAM et al., 2013; NILSSON, ROSS, BOWMAN, 2011; TRESSE et al., 2007), estrutura do biofilme (BRIDIER et al., 2010) e quantificação da matriz extracelular (COMBROUSE et al., 2013). Esses estudos são importantes para entender como desenvolver estratégias para eliminar este patógeno de superfícies de contato com alimentos.

No presente trabalho foram testadas duas superfícies abióticas (poliestireno e aço inoxidável) para a formação dos biofilmes de *L. monocytogenes* através da quantificação com cristal violeta, sendo a primeira vez na literatura em que foi utilizada uma microplaca de 96 poços de aço inoxidável para esta técnica. Além disso, foi realizada a estimativa de células viáveis aderidas em superfície de vidro, através da quantificação por fluorescência, diferentemente de trabalhos publicados na literatura, em que quantificam a biomassa total do biofilme, não diferenciando células viáveis de mortas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de duas cepas de *L. monocytogenes* (sorotipos 1/2a e 4b) em formar biofilmes em superfícies abióticas através de métodos *in vitro* e ensaios em microplacas para quantificação da biomassa total, enumeração de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por cm², e observações em microscópio de fluorescência, incluindo quantificação de células viáveis em microscópio confocal a laser.

2.2 Materiais e métodos

Nesta etapa do trabalho foi utilizada microplaca de poliestireno e de aço inoxidável de 96 poços para formação e quantificação de biofilmes através da coloração com cristal violeta. Os biofilmes de *L. monocytogenes* foram também formados em superfícies de vidro e de aço inoxidável e, foram utilizadas as técnicas de enumeração de células aderidas e análises qualitativas e quantitativas por meio de microscopia para observação da estrutura e viabilidade de biofilmes maduros, conforme representado esquematicamente na figura 2.1.

Figura 2.1. Fluxograma que representa os sistemas de cultivos utilizados para a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e os métodos utilizados para análises qualitativa e quantitativa dos biofilmes.

2.2.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Em todos os experimentos foram utilizadas as cepas *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e *Listeria monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a), do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. As culturas foram mantidas congeladas em -80°C em caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid, Reino Unido) suplementado com 20% de glicerol (v/v) (Synth, Brasil). Para todos os experimentos, as bactérias foram subcultivadas em caldo BHI (Oxoid) por 24 h a 37°C.

2.2.2 Formação de biofilme em sistemas de microplacas de 96 poços

A formação de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) e de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) em microplaca de aço inoxidável (AISI 304) com 96 poços feita sob medida pela empresa Bonther (Ribeirão Preto, SP – Brasil) e em microplaca de poliestireno com 96 poços (Costar, EUA) foi avaliada por 1, 4 e 8 dias de incubação a 25°C.

A quantificação da biomassa do biofilme formado nas microplacas foi realizada pelo método de coloração com cristal violeta (CV) com modificações (DJORDJEVIC, WIEDMANN, MCLANDSBOROUGH, 2002). Para isso, 200 µL da cultura de *L. monocytogenes* reativada em caldo BHI por 24h a 37°C (cerca de 10^8 bactéria/mL) foi adicionada em cada poço, seguida de incubação por 1, 4 e 8 dias a 25°C. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados por três vezes com salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS, “*Phosphate buffered saline*”, constituída por cloreto de sódio 0,8%, cloreto de potássio 0,02%, fosfato de sódio dibásico 0,115% e fosfato de potássio monobásico 0,02%). As células aderidas na superfície das microplacas foram coradas com 150 µL de solução de cristal violeta 0,1% (v/v) por 20 minutos. Em seguida, os poços foram lavados por seis vezes com solução PBS para remoção do excesso de corante. O cristal violeta presente na membrana das células aderidas foi removido com 150 µL de etanol 95%. Os conteúdos dos poços (100 µL cada) foram transferidos para uma nova microplaca de poliestireno de 96 poços e, então foi realizada a leitura da densidade ótica a 600 nm (Varian Cary 50 Microplate Reader, EUA).

Os experimentos de quantificação da biomassa do biofilme com cristal violeta foram realizados em sextuplicata para cada condição, sendo repetidos por três vezes.

2.2.3 Enumeração de células sésseis e planctônicas de *L. monocytogenes*

Nesta etapa do trabalho, lâminas circulares de aço inoxidável AISI 304 (área de 2,45 cm²) e de vidro (área de 2,65 cm²) foram utilizadas. As lâminas circulares foram previamente tratadas de acordo com a metodologia descrita por Winkelströter et al. (2011). Para tanto, as lâminas circulares de aço inoxidável foram lavadas com solução Extran MA02 (Merck), fervidas durante 5 minutos em solução de lauril sulfato de sódio 1% (Vetec, Brasil) (v/v), enxaguadas em água corrente e em água purificada, imersas em álcool etílico 95% (Vetec) durante 5 minutos e novamente enxaguadas em água purificada. Posteriormente, as lâminas foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Biofilmes de *L. monocytogenes* formados nas lâminas circulares foram cultivados de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2008), com modificações. Para tanto, as lâminas circulares foram colocadas em poços de microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) contendo 2 mL de caldo BHI (Oxoid) inoculado com cultura de *L. monocytogenes* reativada em caldo BHI por 24h a 37°C (cerca de 10⁷-10⁸ células/mL). A incubação inicial foi realizada por 3h a 25°C sem agitação, para permitir a adesão das células às superfícies (CHAE, SCHRAFT, 2000). Em seguida, foi realizada incubação por 1, 4 e 8 dias a 25°C com agitação orbital (120 rotações por minuto, rpm). Após 3h, 1 dia e 4 dias de incubação, o meio de cultivo foi retirado e as lâminas circulares foram lavadas com solução PBS por duas vezes para remover as células planctônicas, as lâminas foram transferidas para outro poço e, foi adicionado meio de cultura fresco (2 mL de caldo BHI), prosseguida a incubação para promover um possível aumento da biomassa do biofilme.

Para enumeração das células aderidas de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas, as lâminas circulares foram lavadas por três vezes com solução PBS e, transferidas para tubo plástico contendo 10 mL da mesma solução. As células aderidas foram removidas das superfícies de aço inoxidável e de vidro, através de sonicação por 2 minutos a 50-60 kHz em um banho de ultrassom (Odontobrás,

Brasil), seguido de agitação por 1 minuto em agitador tipo vortex, de acordo com Leriche e Carpentier (1995), com modificações. Diluições decimais seriadas foram realizadas em solução PBS, e alíquotas de 10 µL foram semeadas em ágar BHI (caldo BHI suplementado com 1,5% de ágar bacteriológico, Oxoid) em triplicata pelo método de *drop plating* (HERIGSTAD, HAMILTON, HEERSINK, 2001, com modificações). A incubação foi realizada a 37°C por 24 h.

Para análise de células planctônicas presentes no meio de cultivo foi coletado 1 mL, e foram realizadas diluições decimais seriadas, sendo 10 µL semeados em ágar BHI em triplicata pelo método de *drop plating*, com incubação a 37°C por 24h.

Os experimentos de enumeração de células sésseis e planctônicas foram realizados em triplicatas independentes e os resultados expressos como unidades formadoras de colônia por cm² (UFC/cm²) para células sésseis e UFC por mL para células planctônicas.

2.2.4 Estruturas de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies abióticas

O sistema de cultivo contendo lâminas circulares de aço inoxidável (AISI 304) descrito no subitem 2.2.3, foi utilizado nesta etapa do trabalho para avaliar a estrutura de biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 e *L. monocytogenes* ATCC 19115 através de visualização em microscópio de fluorescência.

Após 1, 4 e 8 dias de incubação, as lâminas de aço inoxidável foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight ® (Molecular Probes, EUA) por 15 minutos (JOSHI et al., 2010). O kit contém dois marcadores fluorescentes, Syto 9 (verde fluorescente) e iodeto de propídeo (vermelho fluorescente), que permite a diferenciação de células viáveis (membrana intacta – Syto 9) das células não viáveis (membrana danificada – iodeto de propídeo). A estrutura do biofilme foi observada por microscopia de fluorescência (Nikon, modelo 80i, Japão), com ocular de 10x e objetivas de 20x e 40x, utilizando-se os filtros Nikon B-2A (excitação 450-490 nm) para detectar Syto 9 e Nikon G-2A (excitação 510-560 nm) para detectar iodeto de propídeo. As imagens foram capturadas através do software NIS-Elements AR 3.2 (Nikon).

Biofilmes de *L. monocytogenes* visualizados por microscópio confocal a laser foram cultivados em câmara de poliestireno com fundo de borossilicato contendo 8 poços (Lab-Tech eight-chambered nº 1 borosilicate glass coverslip system, Nunc International, EUA). Em cada poço da câmara foi adicionado 0,5 mL de caldo BHI (Oxoid) e foram inoculadas aproximadamente 10^7 - 10^8 células de *L. monocytogenes* por mL, com incubação a 25°C por 3h. Após 3h, 1 dia e 4 dias, o meio de cultivo foi removido e as superfícies dos poços foram lavadas por duas vezes com solução PBS e, foi adicionado meio de cultura fresco (0,5 mL de caldo BHI), seguido de incubação por até 8 dias a 25°C.

Decorrido o período de incubação por 1, 4 e 8 dias, cada poço foi lavado por três vezes com solução PBS, e as células aderidas *L. monocytogenes* foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular probes) por 15 minutos (JOSHI et al., 2010). A arquitetura do biofilme formado em superfície de vidro foi observada por microscópio confocal a laser (Leica, modelo TCS SP5-AOBS, Alemanha) com ocular de 10x e objetiva de 63x com óleo de imersão, com abertura numérica de 1,4, sendo utilizado o laser de argônio (488 nm) para detectar Syto 9 e o laser de hélio (543 nm) para detectar iodeto de propídeo. A análise das imagens foi realizada através do software LAS AF version: 2.6.0 build 7266 (Leica), ajustado para capturar imagens em camadas (xyz) de 0,55 µm de espessura. As vistas ortogonais (cortes transversos xy / xz / zy) do biofilme de *L. monocytogenes* foram construídas com o auxílio do software ImageJ MacBiophotonics (disponível em: <http://www.macbiophotonics.ca/imagej/installing_imagej.htm>).

Para estimar a quantidade de células viáveis e mortas presentes no biofilme de *L. monocytogenes*, as imagens foram adquiridas em camadas de 0,13 µm de espessura, e analisadas pelo software ImageJ. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência por volume (UF/µm³) e, o total de volume ocupado pelo biofilme foi calculado pela multiplicação do valor da área observada (representada pelos eixos x e y) pelo valor da profundidade do biofilme (representada pelo eixo z).

As imagens de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies de aço inoxidável e de vidro foram adquiridas em duplicatas independentes e, cerca de três a cinco imagens foram capturadas para cada sistema.

2.2.5 Análise estatística

Todos os experimentos quantitativos foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias e pelo pós teste de Bonferroni, considerando como diferença estatística significativa $P < 0.05$, a fim de comparar a formação de biofilmes entre as duas cepas de *L. monocytogenes* (IAL 633 e ATCC 19115) em diferentes períodos de incubação e diferentes superfícies de adesão (Programa Prisma Graph, versão 5.0, EUA).

2.3 Resultados

2.3.1 Formação de biofilme em sistemas de microplacas de 96 poços

Foi quantificada a biomassa dos biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 e de *L. monocytogenes* ATCC 19115 formados em microplaca de poliestireno (Figura 2.2 A) e em microplaca de aço inoxidável (Figura 2.2 B), mantidos a 25°C por 1, 4 e 8 dias. Os resultados demonstraram que ambas as cepas de *Listeria* apresentaram fraca adesão nas superfícies de poliestireno e de aço inoxidável, não sendo verificada diferença estatística significativa em comparação com o controle negativo (caldo BHI sem adição de bactéria), exceto para *L. monocytogenes* IAL 633 aderida em superfície de aço inoxidável por 4 dias ($P < 0,01$), para a qual foi detectado um pequeno aumento na biomassa.

Figura 2.2. Biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e IAL 633 (sorotipo 1/2a) por 1 dia, 4 dias e 8 dias a 25°C formados em microplacas de poliestireno de 96 poços (A) e em microplacas de aço inoxidável de 96 poços (B), quantificadas com cristal violeta. A condição que apresenta diferença estatística significante em comparação com o controle (caldo BHI) está representada pelo asterisco ($P < 0,05$). Lm = *L. monocytogenes*.

2.3.2 Enumeração de células sésseis e planctônicas de *L. monocytogenes*

Na figura 2.3 A, foi observado que as populações de células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) aumentaram cerca de 2 log UFC /cm² após 1 dia de incubação em ambas as superfícies (vidro e aço inoxidável), exceto para *L. monocytogenes* IAL 633 aderida em superfície de aço inoxidável, que aumentou apenas 1 log UFC/cm² após 1 dia de incubação.

As populações de *L. monocytogenes* aderidas em superfícies abióticas (UFC/cm²) não foram significativamente afetadas ($P>0,05$) pelo tipo de material (vidro ou aço inoxidável), ou pela cepa de *L. monocytogenes* estudada ou ainda pelo período de incubação (1, 4 e 8 dias a 25°C). Contudo, houve exceção para ambas as cepas de *L. monocytogenes* (IAL 633 e ATCC 19115) aderidas em superfície de aço inoxidável com 4 dias de incubação ($P<0,01$), como mostrado na Figura 2.3 A, com maior adesão para *L. monocytogenes* ATCC 19115 em comparação com a cepa IAL 633.

A população inicial de células planctônicas de *L. monocytogenes* foi de 10⁷-10⁸ UFC/mL. Após as trocas de meio de cultura com 3h, 1 dia e 4 dias, seguida de re-incubação, as populações de células planctônicas alcançaram cerca 10¹⁰ UFC/mL após 1, 4 e 8 dias, demonstrando que após a colonização inicial das superfícies, a população *L. monocytogenes* no caldo sobrenadante foi mantida constante pela liberação de células do biofilme para o sobrenadante (Figura 2.3 B).

Figura 2.3. Populações de células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e IAL 633 (sorotipo 1/2a) aderidas em superfícies de aço inoxidável e de vidro (A) e células planctônicas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) e IAL 633 (sorotipo 1/2a) remanescentes no caldo da cultura do sistema de formação do biofilme (B) por 1, 4 e 8 dias de incubação a 25°C, sob agitação orbital. A enumeração das células sésseis e planctônicas foi feita por semeadura em superfície em placa de ágar BHI. Lm=*Listeria monocytogenes*

2.3.3 Estrutura de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies abióticas

L. monocytogenes IAL 633 e *L. monocytogenes* ATCC 19115 formaram biofilmes a 25°C em todos os períodos analisados (1, 4 e 8 dias), apresentando estrutura similar a “favo de mel”, revelado através de microscopia de fluorescência em superfície de aço inoxidável (Figura 2.4) e de microscopia confocal a laser em superfície de vidro (Figuras 2.5 e 2.6).

A presença de EPS no biofilme de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formado em superfície de aço inoxidável foi observada como um material denso presente entre as células (Figura 2.4). A coloração amarelada ao redor das células de *L. monocytogenes* ATCC 19115 pode ser atribuída à sobreposição dos marcadores fluorescentes Syto 9 e iodeto de propídeo, indicando presença de DNA extracelular (Figura 2.4 B e 2.4 F).

As observações no microscópio de fluorescência também revelaram células individuais ou pequenos grupos de células viáveis de *L. monocytogenes* aderida em superfície de aço inoxidável com produção de EPS (Figura 2.4 A, C, D e E). Raras células não-viáveis (vermelho fluorescente) foram detectadas ao longo dos 8 dias de incubação para todas as condições, exceto para *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderida em aço inoxidável por 4 dias, que apresentou predomínio de células não-viáveis (Figura 2.4 D).

Figura 2.4. Fotomicrografias adquiridas em microscópio de fluorescência utilizando ocular de 10x e objetiva de 40x. Biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) (B, D e F) e *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) (A, C e E) formados em superfície de aço inoxidável por 1 dia (A e B), 4 dias (C e D) e 8 dias (E e F) a 25°C sob agitação orbital. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis coradas de vermelho fluorescente (iodeto de propídeo).

As imagens adquiridas por microscópio confocal a laser revelaram que após um dia de incubação, os biofilmes de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formados em superfície de vidro foram irregulares, apresentando pequenos grupos de células ou agregados celulares formando microcolônias. A estrutura do biofilme apresentou canais de água, com predomínio de células viáveis (verde fluorescentes) e raras células mortas (vermelho fluorescente), como visualizado nas Figuras 2.5 A-B, 2.5 G, 2.6 A-B e 2.6 G. Os biofilmes de ambas as cepas de *L. monocytogenes*, formados nos períodos estudados (1, 4 e 8 dias de incubação) também apresentaram cavidades de tamanhos diferentes (Figuras 2.5 C-D e 2.6 B-E).

Os biofilmes de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formados em superfície de vidro foram pouco espessos, ou seja, com poucas camadas, estimada pelo valor de z, obtido pela captura de imagens por microscópio confocal a laser, com camadas de 0,13 μm . A profundidade dos biofilmes de *L. monocytogenes* após um dia de incubação variaram de 2,4 a 4,6 μm ; enquanto que após quatro dias e 8 dias variaram de 3,5 a 5,4 μm e de 3,78 a 6,04 μm , respectivamente. Não sendo observada diferença estatística ($P>0,05$) na espessura de camadas do biofilme com o aumento do período de incubação.

As populações de células viáveis de ambas as cepas de *L. monocytogenes* aderidas em superfície de vidro apresentaram significativo aumento ao longo dos 8 dias de incubação ($P<0,01$) em comparação com as células não viáveis, exceto para *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) que não apresentou diferença no número de células viáveis e não-viáveis com 1 dia de incubação (Figuras 2.5 G e 2.6 G).

Figura 2.5. Fotomicrografias de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) adquiridas com microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) com ocular de 10x e objetiva de 63x em óleo de imersão. (A e B) 1 dia de incubação; (C e D) 4 dias de incubação; (E e F) 8 dias de incubação; (D e F) mostram as vistas ortogonais dos biofilmes (XY, XZ e YZ); (G) quantificação de células viáveis e não viáveis por unidades de fluorescência por volume (UF/ μm^3). As células foram coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente). Os asteriscos representam diferença estatística significativa, comparando células viáveis e não viáveis, por dia de incubação (***) P<0,01).

Figura 2.6. Fotomicrografias de biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) adquiridas com microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) com ocular de 10x e objetiva de 63x em óleo de imersão. (A e B) 1 dia de incubação; (C e D) 4 dias de incubação; (E e F) 8 dias de incubação; (D e F) mostram as vistas ortogonais dos biofilmes (XY, XZ e YZ); (G) quantificação de células viáveis e não viáveis por unidades de fluorescência por volume (UF/μm³). As células foram coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente). Os asteriscos representam diferença estatística significativa, comparando células viáveis e não viáveis, por dia de incubação (***) P<0,01).

2.4 Discussão

L. monocytogenes IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) formaram biofilmes em superfícies abióticas (vidro, aço inoxidável e poliestireno) durante 8 dias de incubação a 25°C, quando avaliadas em diferentes sistemas de cultivo (Figura 2.1).

Para os biofilmes de *L. monocytogenes* formados em microplacas de 96 poços de poliestireno e de aço inoxidável, não foi observado aumento da biomassa com o aumento do tempo de incubação (de 1 a 8 dias), como demonstrado na Figura 2.2.

Os resultados obtidos na quantificação da biomassa do biofilme de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formado em aço inoxidável e em poliestireno por até 8 dias, demonstraram que valor de densidade ótica (DO) foi menor ou igual a 2 vezes o valor da DO do controle (caldo BHI), sendo essas linhagens classificadas como fracas formadoras de biofilme, de acordo com a classificação proposta por Stepanovic et al. (2000).

Nossos resultados estão de acordo com Harvey, Keenan e Gilmour (2007) e com Bonsaglia et al. (2014), que demonstraram que a maioria das cepas de *L. monocytogenes* eram fracas aderentes. No entanto, Stepanovic et al. (2004), observaram predomínio de cepas de *L. monocytogenes* com forte a moderada capacidade de formação de biofilme.

O número de micro-organismos aderidos em uma superfície é um parâmetro importante para indicar se ocorre formação de biofilme ou apenas adesão bacteriana. Vários autores consideram como biofilme um número mínimo de micro-organismos aderidos por área, mas não existe um consenso sobre qual valor deve ser adotado. Para Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) este número seria de células aderidas de 10^7 UFC/cm²; enquanto que para Boari et al. (2009) deve haver no mínimo 10^5 UFC/cm² e para Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996), o número seria de 10^3 UFC/cm².

No presente estudo, a adesão inicial (com 3h de incubação) de ambas as cepas de *L. monocytogenes* tanto em aço inoxidável quanto em vidro foi cerca de 10^5 - 10^6 UFC/cm² e, cerca de 10^6 - 10^8 CFU/cm² com 1, 4 e 8 de incubação a 25°C (Figura 2.2 A). Outros trabalhos encontraram capacidade de adesão semelhante de

L. monocytogenes em superfícies de vidro e de aço inoxidável após 2h de incubação a 25°C (Silva et al., 2008, Teixeira et al., 2008).

Após um dia de incubação, as populações de células aderidas de *L. monocytogenes* foram 10^6 - 10^8 UFC/cm² e permaneceram constantes ao longo de 8 dias de incubação (Figura 2.2 A). Gram et al. (2007) também observaram um número constante de células aderidas de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável cultivadas em emulsão de salmão defumado a frio, alcançando 10^5 UFC/cm², em incubação desde 20 h até 66 h a 20°C.

Na figura 2.2 B, pode-se observar que o número de células planctônicas de *L. monocytogenes* presentes no meio de cultivo, aumentou 2 log UFC/mL após um dia de incubação e, esse nível populacional permaneceu inalterado até oito dias de incubação, mesmo após as substituições do meio de cultivo por um meio de cultura fresco após 3h, 1 dia e 4 dias. Esses resultados foram similares aos resultados publicados por Gram et al. (2007), que demonstraram uma rápida multiplicação de *L. monocytogenes* no sobrenadante de caldo de salmão defumado a frio, com um aumento de 10^7 UFC/mL para 10^9 UFC/mL após 20 h de incubação a 20°C, com população constante até 66 h.

Ambas as cepas de *L. monocytogenes* cultivadas por até 8 dias em caldo BHI e, posteriormente, semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI para enumeração de células aderidas (sésseis) e de células planctônicas, não apresentaram alterações na morfologia das colônias, mesmo com período prolongado de incubação ou com adesão das células à superfície abiótica. Controversamente, Monk et al. (2004) reportaram a ocorrência de três tipos distintos de colônias de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a crescidas em ágar, após a adesão da bactéria em bioreatores de aço inoxidável a 25°C por 72 h sob agitação.

Neste trabalho, a fim de observar a estrutura de biofilmes de *L. monocytogenes* em superfícies de vidro e de aço inoxidável com o auxílio de microscopia, os biofilmes foram formados em lâminas circulares de aço inoxidável cultivados sob agitação orbital (120 rpm) e em câmara contendo 8 poços com fundo de vidro sem agitação. A incubação ocorreu a 25°C por até 8 dias. As duas superfícies foram utilizadas, pois não foi possível utilizar a superfície de aço inoxidável para visualização de biofilmes no modelo de microscópio confocal a laser disponível para o estudo.

Foi observada uma arquitetura de biofilme irregular, com a presença de células individuais e pequenos agregados, formando uma estrutura semelhante a “favo de mel”, para ambas as cepas de *L. monocytogenes*, nas superfícies de aço inoxidável e de vidro (Figuras 2.4 A-F, 2.5 A-F e 2.6 A-F).

Segundo Marsh, Luo e Wang (2003), a estrutura de biofilme similar a “favo de mel” é constituída de células aderidas empilhadas umas sobre as outras, e circundadas por cavidades contendo EPS, que aparentemente ancora as células em suas posições. A EPS é visualizada como um fio que interliga uma célula à outra e à superfície, sendo provável que as cavidades na estrutura de “favo de mel” sirvam como canais para transporte de água e nutrientes.

Chavant et al. (2002), também observaram que haviam cavidades na estrutura do biofilme de *L. monocytogenes* LO28 formado em superfície de aço inoxidável por 2 dias a 20°C ou 37°C, sugerindo que eram canais de água que facilitavam a circulação e distribuição de nutrientes e oxigênio dentro do biofilme.

Marsh, Luo e Wang (2003), revelaram através de imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura, que *L. monocytogenes* formou biofilme em aço inoxidável a 35°C por 24h com estrutura semelhante a “favo de mel”, contendo células individuais circundadas por EPS, em concordância com o presente trabalho.

Bridier et al. (2010), demonstraram por meio imagens em microscópio confocal a laser, a formação de biofilmes irregulares por *L. monocytogenes*, com pequenos agregados celulares aderidos a superfície de poliestireno, por 24 h a 30°C.

Controversamente, Rieu et al. (2008) observaram variação de fenótipos em biofilmes de *L. monocytogenes* dependendo do tipo de sistema de cultivo utilizado. Para cultivo estático, foram observadas várias camadas de células individuais cobrindo toda a superfície uniformemente. No entanto, sob condições de fluxo contínuo, foram detectadas microcolônias esféricas em poucas áreas colonizadas, circundadas por uma “rede em malha”, consistindo de células alongadas.

Neste trabalho, biofilmes de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formados em superfície de vidro por até 8 dias a 25°C foram observados por meio de microscópio confocal a laser e, foram detectadas cavidades de tamanhos diferentes, sugerindo que ocorreu morte celular e/ou dispersão de células do biofilme (Figuras 2.5 C-D, 2.6 B e 2.6 E).

Chavant et al. (2002), visualizaram dispersão de células em biofilmes de *L. monocytogenes* formados por um dia a 20°C em aço inoxidável. No entanto, a dispersão foi transiente e a superfície foi quase totalmente recolonizada após 24h de incubação. Aqueles autores também observaram desprendimento de agregados celulares do biofilme de *L. monocytogenes* a 37°C após 7 dias de incubação em superfície de politetrafluoroetileno.

As figuras 2.5 e 2.6, ilustram biofilmes maduros contendo canais de água e, com a presença de um recobrimento vermelho no fundo, circundando as células viáveis (verde fluorescente) que indica a presença de DNA extracelular. Além disso, foi observada sobreposição dos marcadores fluorescentes Syto 9 e iodeto de propídeo, conferindo uma cor amarelada às células, o que também indica a presença de DNA extracelular (Figuras 2.5 C e E).

Qin et al. (2007), relataram a presença de células mortas (coradas com iodeto de propídeo) no centro de microcolônias de *Staphylococcus epidermidis*, sugerindo a ocorrência de lise celular, contribuindo para a presença de grandes quantidades de DNA extracelular no biofilme, indicada pela cor amarelada.

Neste trabalho, foi observado que após 4 e 8 dias de incubação, houve um aumento da biomassa de células viáveis (indicado pela coloração com Syto 9) nos biofilmes de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formados em superfície de vidro (Figuras 2.5G e 2.6 G).

L. monocytogenes não colonizou homogeneamente as superfícies de aço inoxidável e de vidro durante os períodos de incubação estudados (1, 4 e 8 dias). Nossos resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Rodriguez, Autio e McLandsborough (2008), que observaram através de imagens adquiridas por microscópio de força atômica, que *L. monocytogenes* não colonizou toda a superfície de aço inoxidável e aderiu preferencialmente em fendas da superfície, como células individuais ou formando microcolônias contendo EPS.

Controversamente, Kalmokoff et al. (2001) avaliaram a formação de biofilmes por 35 cepas de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, com incubação por 72h em temperatura ambiente. Aqueles autores observaram que a maioria das cepas de *L. monocytogenes* colonizou toda a superfície como células individuais ou como pequenos agregados celulares, mas não formou microcolônia.

L. monocytogenes aderida em aço inoxidável por até 8 dias a 25°C, formou um biofilme pouco espesso (com cerca 10^6 - 10^8 UFC por cm^2), como ilustrado na

Figura 2.2 A. Gram et al. (2007) também observaram que *L. monocytogenes* não formou biofilme espesso com multicamadas em superfície de aço inoxidável, apresentando níveis populacionais com cerca de 10^4 - 10^6 UFC/cm².

A profundidade (valor de z) do biofilme formado em superfície de vidro variou de 3,00 a 6,04 μm para *L. monocytogenes* IAL 633 e de 2,4 a 5,54 μm para *L. monocytogenes* ATCC 19115, do primeiro ao oitavo dia de incubação, indicando que mesmo com o aumento do tempo de incubação não houve grande aumento da biomassa do biofilme ($P>0,05$). Diferentemente, Amalaradjou, Norris e Venkitanarayanan (2009) observaram a formação de um denso biofilme de *L. monocytogenes* ATCC19115 em superfície de vidro após 24 h at 37°C (espessura média de 14 μm ; espessura máxima de 20 μm).

No presente trabalho foi demonstrado que o aumento do tempo de incubação (1, 4 e 8 dias) não resultou no aumento da biomassa do biofilme de *L. monocytogenes*, como corroborado pelos resultados da quantificação com cristal violeta, métodos de cultivo e também pela quantificação da biomassa de células viáveis por meio de microscopia confocal a laser. Apesar disso, destaca-se que ambas as cepas de *L. monocytogenes* foram capazes de sobreviver e persistir nas diferentes superfícies abióticas (aço inoxidável, poliestireno e vidro) por até 8 dias, apesar da fraca formação de biofilme. Em conclusão, mesmo com poucas camadas, foram observadas estruturas de biofilmes maduros, como indicado pela presença de EPS, canais de água e DNA extracelular, o que é um aspecto preocupante, pois a presença de biofilmes de *L. monocytogenes*, independentemente do pequeno número de células aderidas apresenta grande potencial de persistência em superfícies abióticas.

2.5 Conclusões

L. monocytogenes foi capaz de persistir até 8 dias aderida em diferentes superfícies abióticas, apesar da formação de um biofilme pouco espesso e irregular.

O aumento do tempo de incubação (1, 4 e 8 dias) não favoreceu o aumento da biomassa do biofilme de *L. monocytogenes*.

Biofilmes maduros de *L. monocytogenes* apresentaram uma estrutura semelhante a “favo de mel”, contendo canais de água, com indicação da presença de EPS.

Nos biofilmes de *L. monocytogenes* foram observadas cavidades e DNA extracelular, sugerindo a dispersão de células e morte celular, mesmo havendo predomínio de células viáveis ao longo dos 8 dias de incubação.

L. monocytogenes formou biofilme com estruturas bem definidas que podem contribuir para a sobrevivência e disseminação da bactéria para o ambiente de processamento de alimentos.

Capítulo 3

Capítulo 3 - Eficácia de óleos essenciais e de sanitizantes comerciais em biofilmes maduros de *Listeria monocytogenes*

Resumo

Micro-organismos deteriorantes e patogênicos podem ser introduzidos através de várias rotas na indústria alimentícia e, estabelecer-se em equipamentos de processamento de alimentos, em esteiras, pisos e ralos, como biofilmes, subsequentemente, contaminando os alimentos. Biofilmes são difíceis de erradicar e protegem os micro-organismos contra ação de limpeza e desinfecção. *Listeria monocytogenes* é um patógeno intracelular que causa uma doença severa, denominada listeriose, e pode formar biofilmes em locais de processamento de alimentos e persistir por anos. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais (OEs) de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e de *Zingiber officinale* (gengibre) e de sanitizantes comerciais como sanitizante a base de óleo de coco babaçu e sanitizante a base de dióxido de cloro, foram avaliadas através da determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima frente a duas cepas de *L. monocytogenes*. A ação antibiofilme de OEs e sanitizantes comerciais sozinhos ou combinados, foi testada em biofilmes maduros de *L. monocytogenes* formados em superfícies de vidro e de aço inoxidável por 4 e 8 dias, por meio da enumeração de células aderidas e determinação da viabilidade celular por microscopia de fluorescência e confocal a laser. Capim-limão foi o OE que apresentou maior atividade bactericida frente a células planctônicas de *L. monocytogenes*, enquanto que o sanitizante a base de dióxido de cloro demonstrou maior efeito bactericida dentre os sanitizantes comerciais. O grau de ação antibiofilme dos OEs e dos sanitizantes comerciais aplicados sozinhos ou combinados frente a *L. monocytogenes* foi variado. Os resultados revelaram que dentre os OEs e os sanitizantes comerciais, o OE de capim-limão sozinho e o sanitizante a base de óleo de coco de babaçu sozinho foram os mais eficazes no controle de *L. monocytogenes* em biofilmes formados em superfícies abióticas por 4 e 8 dias. Do mesmo modo, o uso de OE combinado com sanitizante comercial também foi eficiente, demonstrando sinergismo. Essas substâncias antimicrobianas podem ser utilizadas como antimicrobianos naturais na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* de superfícies comumente encontradas na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, biofilme maduro, óleo essencial, dióxido de cloro

3.1 Introdução

A potencial contaminação de produtos alimentícios com micro-organismos patogênicos e deteriorantes devido à presença de biofilmes é um fator de relevante risco na indústria de alimentos. Células individuais provenientes do biofilme podem ser liberadas durante o processamento, colonizar outras superfícies ou tornar-se uma fonte direta de contaminação cruzada para o produto final (CRUZ, FLETCHER, 2012; WINKELSTRÖTER et al., 2013).

L. monocytogenes pode aderir e formar biofilme em uma variedade de superfícies comumente utilizadas na cozinha e na indústria de alimentos, como aço inoxidável, plástico, vidro, polipropileno (BONSAGLIA et al., 2014, TEIXEIRA et al., 2008). A capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver a baixas temperaturas, colonizar superfícies e, resistir a várias condições de estresse é crucial para a persistência no ambiente de processamento de alimentos (RIEU et al., 2008).

Vários trabalhos demonstraram que o uso de antimicrobianos como cloridrato de octenidina, composto de amônio quaternário e ácido peroxiacético, foram efetivos para eliminar biofilmes pré-formados de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas (AMALARADJOU, NORRIS, VENKITANARAYANAN, 2009, BELESSI et al., 2011a, CHOI et al., 2012). No entanto, dependendo das concentrações de sanitizantes utilizadas ou do tempo de exposição, o tratamento pode não ser suficiente para erradicar células aderidas de *L. monocytogenes* das superfícies (CHORIANOPOULOS et al., 2008; CRUZ, FLETCHER, 2012; CHAVANT, GAILLARD-MARTINIE, HÉBRAUD, 2004; BAE et al., 2012).

O uso de óleos essenciais (OEs) ou de seus constituintes tem demonstrado ser uma alternativa para a eliminação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos de superfícies de manipulação de alimentos (DESAI et al., 2012; LEONARD et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; PÉREZ-CONESA et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de dois sanitizantes comerciais e de dois óleos essenciais de plantas aplicados sozinhos ou em combinação, para inativar biofilmes maduros de duas cepas de *L. monocytogenes* a 25°C. Foram utilizadas superfícies de aço inoxidável e de vidro para formação do biofilme, e foram enumeradas células aderidas e a viabilidade celular foi estudada por microscopia de fluorescência e confocal a laser.

3.2 Materiais e métodos

Nesta etapa do trabalho foi utilizada microplaca de poliestireno de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais e de sanitizantes comerciais frente a *L. monocytogenes*. Para a formação dos biofilmes foram utilizadas as superfícies de vidro e de aço inoxidável e, foram utilizadas as técnicas de enumeração de células aderidas e análises qualitativas e quantitativas por meio de microscopia para observação do efeito dos óleos essenciais e / ou sanitizantes comerciais em biofilmes maduros, conforme representado esquematicamente na figura 3.1.

Figura 3.1. Fluxograma que representa os sistemas de cultivos utilizados para a formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e os métodos utilizados para análises qualitativa e quantitativa dos biofilmes após os tratamentos com óleos essenciais de plantas e sanitizantes comerciais.

3.2.1 Bactérias e condições de cultura

Neste estudo, em todos os experimentos foram utilizadas duas cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 sorotipo 4b e *L. monocytogenes* IAL 633 sorotipo 1/2a (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil). Todas as culturas foram mantidas congeladas a -80°C em caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid), suplementado com 20% de glicerol (v/v) (Synth). Para os todos os experimentos, as bactérias foram subcultivadas em caldo BHI (Oxoid) por 24 h a 37°C.

3.2.2 Óleos essenciais

As folhas secas de *Cymbopogon citratus* (obtidas em 2 de abril de 2012, lote 25SDM) e de *Zingiber officinale* (obtidas em 12 de março de 2012, lote 02SDM) foram adquiridas da Oficina de Ervas Produtos Naturais, Ribeirão Preto, Brasil (CNPJ 08.898.383/0001-79), Brasil. Os OEs foram extraídos por hidrodestilação usando o aparelho de Clevenger modificado, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1996-2004).

3.2.3 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os componentes dos OEs foram identificados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GC-MS QP-2010) equipado com fonte de ionização eletrônica (IE) e analisador tipo quadrupolo. As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: coluna DB-5MS (0.25mm x 0.25um 30mx, Phenomenex), temperatura do injetor de 250°C e o hidrogênio foi utilizado como fase móvel (fluxo de gás: 1,3 mL.min⁻¹). A temperatura da coluna foi inicialmente programada para 60°C por 1 minuto, aumentando para 240°C em 10 minutos e, mantida esta temperatura por 60 minutos.

Após a eluição, as amostras foram orientadas pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização na proporção de 1:20. As seguintes condições foram utilizadas para o espectrômetro de massas: temperatura da fonte de 250°C, energia de impacto de 70eV e o analisador controlado para separar íons de 40 a 400 m/z. Uma mistura de alcanos lineares (C9 a C25) foi injetada sob condições idênticas, como descrito por Adams (1995).

Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção e do espectro de massas com os dados disponíveis nos bancos de dados do

espectrômetro e da literatura como *Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds* (FFNSC 1.3.lib), *WILEY* (WILEY 7.LIB), e *National Institute of Standards and Technology* (NIST 08s.LIB).

3.2.4 Sanitizantes comerciais

Os sanitizantes comerciais, Bioverospol IMF® e Veromax 80® foram obtidos da Veros Produtos Químicos LTDA, São Paulo, Brasil, e foram utilizados para determinação da CIM e CBM frente a duas cepas de *L. monocytogenes* e, posteriormente, para eliminar biofilmes maduros de *L. monocytogenes* formados em superfícies abióticas.

O sanitizante Bioverospol IMF® é indicado para pré-lavagem de frutas e vegetais, para remover resíduos de sujeira de qualquer superfície, consistindo de substâncias graxas altamente refinadas (óleo de coco de babaçu). O Veromax 80® consiste de dióxido de cloro (ClO₂) estabilizado em solução aquosa a 8% e, pode ser utilizado no contato direto com alimentos, não sendo necessário enxágue e, pode também ser eficaz para descontaminar e combater Micro-organismos em superfícies de processamento de alimentos (Veros Produtos Químicos LTDA, 2014).

3.2.5 Determinação da CIM e da CBM de óleos essenciais e de sanitizantes comerciais

Foi realizado o teste de CIM e CBM dos óleos essenciais (OEs) capim-limão (*C. citratus*) e gengibre (*Z. officinale*), e dos sanitizantes comerciais, Bioverospol IMF® e Veromax 80®, através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2003, com modificações) frente a células planctônicas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b).

Uma cultura de *L. monocytogenes* de 24h a 37°C em caldo BHI (Oxoid), foi diluída para 0,5 da escala de McFarland, o que correspondia a aproximadamente 10⁵-10⁶ UFC/mL. Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços (Costar, EUA) referidas neste trabalho como 8 colunas e 12 linhas. No primeiro poço de cada linha, foram adicionados 80 µL de caldo BHI e 80 µL de uma solução-estoque de OEs (solução aquosa de 4% de OE e 4% de dimetil sulfoxido – DMSO, Merck) ou dos sanitizantes comerciais puros. O DMSO foi utilizado para dissolver os OEs (Figura 3.2).

O conteúdo de cada poço foi homogeneizado, e 80 µL do primeiro foram transferidos para o segundo poço, e assim, sucessivamente até o décimo primeiro

poço. Cada poço foi inoculado com 20 μL do inóculo bacteriano ajustado e foi realizada incubação a 25°C por 24h. Foram testadas as seguintes concentrações dos OEs: 0,0125 a 1,6% (v/v) e dos sanitizantes comerciais 0,04 a 40% (v/v).

Como controles foram utilizados poços contendo 100 μL de caldo BHI sem inóculo (controle negativo) e poços com 80 μL de caldo BHI e 20 μL do inóculo bacteriano ajustado (controle positivo). Os experimentos foram realizados em triplicatas sendo repetidos por duas vezes.

Decorrido o tempo de incubação, o crescimento de *L. monocytogenes* na presença dos OEs e dos sanitizantes comerciais, detectado a olho nu, foi indicado pela turvação do meio de cultura. A CIM foi considerada como a menor concentração do OE ou do sanitizante comercial que inibiu completamente o crescimento de *L. monocytogenes*.

Figura 3.2. Esquema da microplaca de poliestireno de 96 poços utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais e sanitizantes comerciais frente a cepas de *Listeria monocytogenes*.

Para determinação da CBM, após a leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do inóculo foram removidas assepticamente de cada poço que não havia apresentado crescimento visível (turbidez) e, semeado em ágar BHI (caldo BHI adicionado de 1,5% de ágar bacteriológico, Oxoid), e incubado por 24h a 37°C. A menor concentração na qual não houve crescimento na subcultura foi determinada como a CBM (HAMMER, CARSON, RILEY, 1998). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.6 Efeito dos óleos essenciais e dos sanitizantes comerciais em biofilmes maduros de *L. monocytogenes*

Nesta etapa do trabalho, foram utilizadas lâminas circulares de aço inoxidável AISI 304 (área de 2,45 cm²) e de vidro (área de 2,65 cm²). As lâminas foram previamente tratadas de acordo com a metodologia descrita por Winkelströter et al. (2011). Biofilmes de *L. monocytogenes* foram formados nas lâminas circulares de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2008), com modificações. Para isso, as lâminas circulares de aço inoxidável e de vidro foram colocadas em microplacas de poliestireno de 24 poços (Costar, EUA) contendo 2 mL de caldo BHI (Oxoid) e cultura *L. monocytogenes* previamente reativada (1%, v/v) em caldo BHI (Oxoid) a 37°C por 24h. Foi realizada incubação por 3h a 25°C sem agitação para permitir a adesão inicial das células bacterianas à superfície (CHAE; SCHRAFT, 2000). Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as lâminas circulares foram lavadas com solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS, “*Phosphate buffered saline*”, constituída por cloreto de sódio 0,8%, cloreto de potássio 0,02%, fosfato de sódio dibásico 0,115% e fosfato de potássio monobásico 0,02%) por duas vezes para remoção das células não aderidas e, colocadas em um novo poço da microplaca com adição de meio de cultura fresco (2 mL de caldo BHI), seguida de re-incubação por 4 dias a 25°C em agitador orbital (120 rotações por minuto, rpm), visando a aumentar o crescimento séssil. Esse mesmo procedimento de troca de meio de cultura, foi realizado após 4 dias de incubação, e as lâminas foram em seguida re-incubadas por mais 4 dias (total de 8 dias de incubação).

Decorridos os períodos de incubação (4 ou 8 dias), as lâminas circulares de vidro e de aço inoxidável foram lavadas por três vezes com solução PBS e, transferidas para um novo poço e tratadas com OE e sanitizantes comerciais

sozinhos ou combinados (Tabela 3.1), por 1h a 25°C. As lâminas controles foram tratadas com água purificada esterilizada.

Tabela 3.1. Concentrações de óleos essenciais (OEs) e sanitizantes e suas combinações estudadas para erradicação de biofilmes maduros de *L. monocytogenes*.

Combinações	Concentrações % (v/v)
Controle	--
OE de capim-limão ¹	4,0
OE de gengibre ¹	0,8
Sanitizante a base de óleo de coco babaçu ²	0,625
Sanitizante a base de dióxido de cloro ²	5,0
OE de capim-limão + Sanitizante a base de óleo de coco babaçu	4,0 + 0,625
OE de capim-limão + Sanitizante a base de dióxido de cloro	4,0 + 5,0
OE de gengibre + Sanitizante a base de óleo de coco babaçu	0,8 + 0,625
OE de gengibre + Sanitizante a base de dióxido de cloro	0,8 + 5,0

¹ Óleos essenciais foram obtidos conforme descrito no item 3.2.2 e ² Sanitizantes descritos no item 3.2.4.

Para remoção das células dos biofilmes de *L. monocytogenes*, após o tratamento com OEs e sanitizantes comerciais, as lâminas foram lavadas por três vezes com solução PBS para remoção das células dispersas e remoção das substâncias antimicrobianas. As lâminas circulares de aço inoxidável e de vidro foram transferidas para um tubo contendo 10 mL de solução PBS, e as células aderidas nas superfícies, foram desprendidas por sonicação por 2 min a 50-60 kHz em banho de ultrassom (Odontobrás, Brasil) e em seguida por 1 minuto em agitador tipo vortex (LERICHE; CARPENTIER, 1995, com modificações). Foram feitas diluições decimais seriadas e 10 µL de cada diluição foram semeados pelo método *drop plating* (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001, com modificações) em placas de ágar BHI e incubadas a 37°C por 24h.

3.2.7 Estrutura e viabilidade do biofilme de *L. monocytogenes* formado em superfícies abióticas após desinfecção com óleos essenciais e sanitizantes comerciais

3.2.7.1 Superfície de aço inoxidável

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a arquitetura e a viabilidade celular de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfícies de aço inoxidável por 4 e 8 dias, sendo utilizado o mesmo sistema de lâminas circulares e os tratamentos de desinfecção descritos no subitem 3.2.6 (Tabela 3.1).

Após 4 e 8 dias de incubação a 25°C e após o tratamento com OEs e sanitizantes comerciais sozinhos ou combinados, por 1h a 25°C, as lâminas circulares de aço inoxidável foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células fracamente aderidas e, as células aderidas nas superfícies foram coradas com sondas fluorescentes Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular Probes, EUA) por 15 minutos (JOSHI et al., 2010). Estes corantes permitem a diferenciação de células bacterianas viáveis (membrana celular intacta - verdes fluorescentes) de células mortas (membrana celular danificada - vermelhas fluorescentes).

Posteriormente, as superfícies foram lavadas com solução PBS por duas vezes para remoção do excesso de corante. As lâminas foram removidas cuidadosamente de cada poço e a parte inferior da lâmina circular de aço inoxidável (que não foi corada) foi colada em uma lâmina de vidro com cola instantânea (Super Bonder, Loctite, EUA), e na parte superior corada, foi colocada uma lamínula de vidro circular.

As imagens foram adquiridas em Microscópio de fluorescência (Nikon modelo 80i), com ocular 10x e nas objetivas de 20x, usando os filtros Nikon B-2A (excitação 450-490 nm) para detectar Syto 9 e Nikon G-2A (excitação 510-560 nm) para detectar iodeto de propídeo. Três a cinco imagens por lâmina circular de aço inox foram capturadas através do software NIS-Elements AR 3.2 (Nikon). Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo repetidos independentemente por três vezes.

3.2.7.2 Superfície de vidro

A formação de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de vidro foi realizada em câmara de poliestireno contendo 8 poços com fundo de borosilicato (Nagle Nunc International, EUA). Para tanto, 0,5 mL de caldo BHI (Oxoid) foi inoculado com cerca de 10^7 - 10^8 células de *L. monocytogenes* por mL (previamente cultivada a 37°C por 24h em caldo BHI) e incubado por 3h a 25°C. Após 3h e 4 dias de incubação, foi feita a troca de meio de cultura para remoção das células não aderidas. Para isso, foi retirado o meio de cultura de cada poço e, em seguida, foi feita a lavagem dos poços com solução PBS por duas vezes e, foi adicionado 0,5 mL de caldo BHI fresco, e a incubação foi prosseguida por até 4 ou 8 dias a 25°C.

Após a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* por 4 e 8 dias, cada poço foi lavado por três vezes com solução de PBS e, as células aderidas nas superfícies foram tratadas com OEs e sanitizantes comerciais sozinhos ou em combinações (Tabela 3.1) por 1h a 25°C. Posteriormente, as células aderidas nas superfícies foram coradas com sondas fluorescentes Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular Probes, EUA) por 15 minutos (JOSHI et al., 2010). Posteriormente, as soluções contendo os marcadores fluorescentes foram removidas e as superfícies dos poços foram lavadas com solução PBS por duas vezes, para remoção do excesso de corante.

Foram feitas observações em microscópio confocal a laser (LEICA TCS-SP5 AOBs, software LAS-AF, do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP) com ocular de 10x e na objetiva de 63x com óleo de imersão. O laser de argônio (488 nm - verde fluorescente) foi utilizado para visualizar as células coradas com Syto 9, e o laser de hélio (543 nm - vermelho fluorescente) foi utilizado para visualizar as células coradas com iodeto de propídeo. As imagens foram processadas com o software LAS AF version: 2.6.0 build 7266 (Leica), ajustado para capturar camadas (xyz) de 0,13 µm de espessura.

Para estimar a quantidade de células viáveis e não viáveis presentes no biofilme de *L. monocytogenes*, as imagens adquiridas em camadas de 0,13 µm de espessura, foram analisadas pelo software ImageJ MacBiophotonics (disponível em: <http://www.macbiophotonics.ca/imagej/installing_imagej.htm>). Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência por volume (UF/µm³) e, o volume total

ocupado pelo biofilme foi calculado pela multiplicação da área observada (representada pelos eixos x e y) pela profundidade do biofilme (representada pelo eixo z).

As imagens de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies de vidro foram adquiridas em duplicatas independentes e, cerca de três imagens foram capturadas para cada sistema.

3.2.8 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram analisados pelos testes ANOVA (variância de duas vias) e Bonferroni, considerando como diferença significativa $P < 0,05$, para avaliar a diferença entre os tratamentos aplicados. Todas as análises estatísticas foram feitas com o Programa Graph versão 5.0 (EUA).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

O óleo essencial extraído de folhas secas de *C. citratus* (capim-limão) apresentou monoterpenos como constituintes majoritários ($> 5\%$), tais como geranial (42,26%), neral (32,23%) e β -mirceno (12,69%). O óleo essencial de *Z. officinale* (gengibre) apresentou monoterpenos e sesquiterpenos como componentes majoritários: α -zingibereno (13,56%), geranial (10,23%), α -curcumeno (10,06%), neral (7,37%) and β -sesquifelandreno (7,04%). Os componentes considerados majoritários, bem como aqueles minoritários ($< 5\%$) estão apresentados na tabela 3.2 para OE de *C. citratus* e na tabela 3.3 para OE de *Z. officinale*.

Tabela 3.2. Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de *Cymbopogon citratus* (capim-limão).

Componentes		<i>Cymbopogon citratus</i>			
		IR	IR (literatura)	IS	Composição (%)
1	Sulcatone	980,62	985	97	0,65
2	β -Mirceno	987,41	991	96	12,69
3	Trans- β -ocimeno	1032,58	1040	97	0,18
4	ND	1088,77	—	80	0,42
5	L-Linalool	1098,49	1098	96	1,11
6	ND	1140,55	—	90	0,35
7	ND	1145,71	—	89	0,19
8	ND	1158,76	—	96	1,60
9	Óxido rosa furano	1166,83	1169	92	0,14
10	Isogeranial	1177,85	1179	97	2,26
11	Neral	1237,83	1240	93	32,23
12	Geraniol	1248,77	1255	97	4,49
13	Geranial	1268,16	1273	95	42,26
14	2-undecanona	1291,11	1291	97	0,34
15	Geranil acetato	1376,29	1383	96	0,83
16	2-tridecanona	1493,22	1494	96	0,25

ND – não determinado; IR – índice de retenção; IS – índice de similaridade

Tabela 3.3. Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de *Zingiber officinale* (gengibre).

		<i>Zingiber officinale</i>			
Componentes		IR	IR (literatura)	IS	Composição (%)
1	Heptan-2-ona	894,57	891	97	0,06
2	2-Heptanol	899,55	900	99	0,83
3	Triciclono	921,58	926	94	0,07
4	α -pineno	931,16	937	97	1,34
5	Canfeno	947,74	953	97	4,36
6	Sabineno	970,09	976	91	0,05
7	β -pineno	976,33	980	97	0,21
8	Sulcatone	980,51	985	97	0,92
9	Mirceno	986,83	991	97	0,81
10	α -felandreno	1006,05	1005	94	0,13
11	p-cimeno	1022,49	1026	95	0,07
12	Limoneno	1027,12	1031	93	0,80
13	β -felandreno	1028,88	1031	93	3,21
14	Eucaliptol	1030,22	1033	93	4,33
15	α -terpinoleno	1083,32	1088	92	0,11
16	2-nonanona	1088,36	1091	95	0,32
17	rosafurano	1089,70	1091	89	0,37
18	ND	1096,71	—	76	0,17
19	linalool	1098,44	1098	97	0,99
20	2-nonanol	1100,38	1098	96	0,63
21	Citronela	1149,58	1153	97	0,72
22	Óxido rosafurano	1166,83	1169	92	0,72
23	borneol	1169,22	1165	98	1,59
24	4-terpineol	1177,87	1177	89	0,34
25	α -terpineol	1192,86	1189	96	1,73
26	β -citronelol	1224,81	1228	97	1,33
27	Neral	1236,14	1240	95	7,37
28	Geraniol	1248,03	1255	98	0,54
29	Geranial	1266,11	1256	96	10,23
30	2-Undecanona	1290,83	1291	98	1,22

		<i>Zingiber officinale</i>			
Componentes		IR	IR (literatura)	IS	Composição (%)
31	2-Undecanol	1301,28	1294	96	0,23
32	α -copaeno	1371,95	1376	95	0,24
33	β -elemeno	1385,98	1375	95	0,23
34	(E)- β -farneseno	1450,57	1458	93	0,38
35	Albaromadendreno	1454,71	1461	95	0,28
36	α -curcumeno	1478,34	1486	96	10,06
37	α -zingibereno	1492,27	1495	97	13,56
38	α -farneseno	1502,30	1508	97	4,23
39	β -bisabolenol	1504,84	1509	96	4,59
40	Cubebol	1510,61	1513	91	0,41
41	Selina-3,7(11)-dieno	1513,75	1527	91	0,49
42	β -Sesquifelandreno	1520,74	1524	96	7,04
43	ND	1536,52	—	81	0,36
44	Elemol	1543,67	1549	94	0,50
45	ND	1550,51	—	86	0,44
46	Germacreno B	1552,61	1556	94	0,57
47	Nerolidol	1558,16	1565	96	1,12
48	Ledol	1585,89	1580	85	1,00
49	ND	1609,93	—	87	1,43
50	ND	1615,11	—	88	0,63
51	ND	1623,26	—	84	0,71
52	ND	1627,06	—	87	0,77
53	β -Eudesmol	1648,22	1649	96	1,30
54	ND	1651,70	-	81	0,31
55	ND	1667,67	—	77	0,19
56	ND	1681,83	—	81	1,51
57	ND	1686,43	—	81	0,48
58	ND	1689,46	—	84	0,83
59	ND	1801,23	—	84	0,36
60	ND	1945,63	—	83	0,19

ND – não determinado; IR – índice de retenção; IS – índice de similaridade

Os principais componentes do OE de *C. citratus* encontrados no presente trabalho estão de acordo com os resultados publicados na literatura. Oliveira et al. (2010) demonstraram que geranial (42,91%) e neral (30,90%) foram os constituintes químicos majoritários do OE de *C. citratus* extraído de folhas frescas. Mayaud et al. (2008) também encontraram como componentes majoritários, geranial (40,04%) e neral (28,87%) no OE de *C. citratus*, e Leonard et al. (2010) também observaram geranial (42,5%) e neral (31,7%) como substâncias principais no OE de *C. citratus* essencial.

Os principais componentes encontrados no OE de *Z. officinale* no presente trabalho foram diferentes dos dados relatados na literatura por Andrade et al. (2012) e Sivasothy et al. (2011). Andrade et al. (2012) extraíram o OE de *Z. officinale* de rizomas e, detectaram geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineole (10,98%), geraniol (8,51%), geranil acetato (4,19%) e canfeno (4,30%) como constituintes principais. Sivasothy et al. (2011) identificaram 45 componentes no óleo de *Z. officinale* var. *rubrum* Theilade extraído da folha da planta e, 54 componentes do óleo extraído do rizoma da mesma planta. O óleo obtido da folha fresca foi dominado principalmente por β -cariofileno (31,7%), enquanto que óleo extraído dos rizomas foi predominantemente composto por monoterpenóides, como canfeno (14,5%), geranial (14,3%), and geranil acetato (13,7%).

De acordo com Burt (2004), a composição dos óleos essenciais de uma espécie particular de planta pode diferir entre as épocas de colheita e entre os locais geográficos e, ainda, as diferentes partes de uma mesma planta podem diferir em seus componentes.

3.3.2 Determinação da CIM e CBM dos óleos essenciais e dos sanitizantes comerciais

Ambas as cepas de *L. monocytogenes* foram sensíveis aos OEs e sanitizantes comerciais em graus variados. O DMSO a 4% (v/v) utilizado nas suspensões dos OEs não inibiu ambas as cepas de *L. monocytogenes*.

O OE de capim-limão apresentou a mesma atividade antibacteriana frente às cepas de *L. monocytogenes*, enquanto que *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) foi mais resistente do que a cepa IAL 633 (sorotipo 1/2a) à ação do OE de gengibre (Tabela 3.4).

Foi observado que os valores de CBM dos OEs de capim-limão e de gengibre frente a *L. monocytogenes* foram maiores que os valores encontrados para a CIM. A maior atividade bactericida foi observada para o OE de capim-limão (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais e sanitizantes comerciais frente a células planctônicas de *Listeria monocytogenes*.

	<i>LM 1/2a</i>	<i>LM 4b</i>
Óleo essencial de capim-limão	CIM = 0,25-0,5% CBM = 1%	CIM = 0,25-0,5% CBM = 1%
Óleo essencial de gengibre	CIM = 0,25-0,5% CBM = 2%	CIM = 1-0,5% CBM = 2%
Sanitizante a base de óleo de coco babaçu	CIM = ND* CBM = 2,5-5%	CIM = ND* CBM = 2,5-5%
Sanitizante a base de dióxido de cloro	CIM = 0,31% CBM = 1,25-2,5%	CIM = 0,31% CBM = 1,25-2,5%

*ND = Não determinado. *LM* = *Listeria monocytogenes*

Os dados encontrados na literatura estão de acordo com o que foi observado no presente trabalho, no entanto, os métodos utilizados para determinação da CIM foram diferentes. Thongson et al. (2005) encontraram valores de CIM do OE de gengibre variando de 0,2-0,6% (v/v) frente a cinco cepas de *L. monocytogenes* através de diluição em ágar. Oliveira et al. (2013) observaram valores de CIM de OE de capim-limão de 1,56% frente a *L. monocytogenes* ATCC 19117 por meio do método de difusão em ágar. Controversamente, Barbosa et al. (2009) detectaram valores mais baixos para CIM de OE de capim-limão de 0,05% (v/v) frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644 através de diluição em ágar.

De acordo com Burt (2004), considerando a diversidade de métodos existentes, os isolados bacterianos (clínicos e de referência) e as origens dos OEs utilizados, a variação dos valores de CIM parece ser limitado na maioria dos casos.

A ação dos OEs abrange um amplo número de micro-organismos e, seu modo de ação envolve vários alvos na célula bacteriana, atuando como típicos lipófilos que passam pela parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a

estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos, causando permeabilização (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

Neste trabalho, os valores de CBM do sanitizante à base de óleo de coco babaçu frente a ambas as cepas de *L. monocytogenes* foram maiores do que os valores encontrados para CBM do sanitizante à base de dióxido de cloro (Tabela 3.4).

Cruz e Fletcher (2012), observaram que a concentração mínima efetiva do dióxido de cloro comercial foi de 83 µg/mL após 5 minutos de contato, diminuindo cerca de 5-log₁₀ UFC/mL de células de *L. monocytogenes* em suspensão. Nossos resultados demonstraram que foi necessária uma concentração de 1,25 a 2,5% de sanitizante à base de dióxido de cloro e um tempo de exposição de 24h, para exercer efeito bactericida frente a células planctônicas de *L. monocytogenes*.

Não foi possível determinar o valor de CIM do sanitizante à base de óleo de coco babaçu através da técnica de microdiluição em caldo, pois este sanitizante é uma solução turva e, não foi possível comparar visualmente o teste com o controle (poço com caldo BHI e inóculo bacteriano).

Na literatura, não foram encontrados dados disponíveis sobre atividade antimicrobiana do sanitizante a base de óleo de coco babaçu ou de seu componente principal (óleo de coco babaçu).

3.3.3 Efeito dos óleos essenciais e sanitizantes comerciais em biofilmes maduros de *L. monocytogenes*

Os valores utilizados para remover biofilmes maduros de *L. monocytogenes* aderidos em superfícies abióticas, foram primeiramente baseados nos valores obtidos nos resultados de CBM. Entretanto, os resultados preliminares demonstraram que seria necessário ajustar algumas concentrações de OEs e sanitizantes comerciais, tendo em vista que o uso combinado poderia resultar em interação entre os agentes antimicrobianos.

Desse modo, foi necessário aumentar algumas concentrações para posterior utilização nos biofilmes pré-formados. Por exemplo, para o OE de capim-limão, o valor de CBM obtido foi 4 vezes maior; o CBM do sanitizante à base de dióxido de cloro foi o dobro. De maneira contrária, foi necessário diminuir as concentrações para o OE de gengibre com a utilização de um valor que estava dentro da faixa dos

valores de CIM – 0,8%; para o sanitizante à base de óleo de coco babaçu, foi utilizada uma concentração 4 vezes menor que o valor encontrado para CIM – 0,625%.

Pode ser observado na figura 3.3 A, que as células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 em aço inoxidável por 4 dias e 8 dias apresentaram diminuição no número de células após os tratamentos com um único antimicrobiano como o OE de capim-limão ou o sanitizante à base de coco babaçu. Além disso, foi observada completa redução das células aderidas após o uso combinado de OEs e de sanitizantes comerciais. As populações de células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 em superfície de vidro por 4 e 8 dias foram reduzidas cerca de 4 log UFC/cm² após a exposição ao sanitizante à base de óleo de coco babaçu (P<0,001). A aplicação de OE de gengibre e de sanitizante contendo dióxido de cloro sozinhos nos biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633, formados por 4 e 8 dias em superfícies de vidro e de aço inoxidável, não causaram diminuição das populações do patógeno (P>0,05), como pode ser observado na figura 3.3 B.

Foi demonstrada uma completa redução (aproximadamente 4-5 log UFC/cm²) das populações de *L. monocytogenes* IAL 633 em superfícies de aço inoxidável e de vidro em biofilmes de 4 e 8 dias, após a exposição do biofilme às diferentes combinações de OE e sanitizante (Figura 3.3), exceto para a combinação de OE de gengibre com sanitizante a base de dióxido de cloro, que não foi capaz de eliminar efetivamente as células de *L. monocytogenes* IAL 633 aderidas por 8 dias tanto em superfície de vidro quanto de aço inoxidável (Figura 3.3 A e B).

Na figura 3.3 C, foi demonstrada menor sobrevivência as células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 em aço inoxidável por quatro dias (P<0,001), após a desinfecção nas seguintes condições: a) OE de capim-limão combinado com sanitizante à base de óleo de coco babaçu; b) OE de capim-limão combinado com sanitizante à base de dióxido de cloro; c) OE de gengibre combinado com sanitizante à base de óleo de coco babaçu. Em biofilmes de oito dias, foram observadas menores populações após o tratamento com OE de capim-limão combinado com sanitizante à base de óleo de coco babaçu, e com OE de capim-limão combinado com sanitizante à base de dióxido de cloro (P<0,001).

Após a exposição dos biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 formados em superfície de aço inoxidável por 4 e 8 dias, ao OE de gengibre, ao sanitizante à base de óleo de coco babaçu, e ao sanitizante à base de dióxido de cloro, não foram

observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) em comparação com o controle (Figura 3.3 C).

Os tratamentos combinados de OEs e sanitizantes, foram mais eficazes na diminuição da população de células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 em superfície de vidro por 4 dias ($P < 0,01$) e por 8 dias ($P < 0,001$). Foi demonstrada uma pequena redução do número de células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 em superfície de vidro após a aplicação de OE de capim-limão em biofilmes formados por 4 ($P < 0,05$) e por 8 ($P < 0,001$) dias. Também houve redução de populações de *L. monocytogenes*, após a aplicação de OE de gengibre por 8 dias ($P < 0,001$), após a exposição ao sanitizante de óleo de coco babaçu por 4 ($P < 0,01$) e por 8 ($P < 0,001$) dias, bem como após a aplicação do sanitizante à base de dióxido de cloro por 4 dias ($P < 0,05$) e 8 dias ($P < 0,01$), como pode ser observado na figura 3.3 D.

A maior inibição de células do biofilme de ambas as cepas de *L. monocytogenes* aderidas, considerando ambas as superfícies (aço inoxidável e vidro), após exposição a um único agente antimicrobiano, foi obtida com OE de capim-limão e com o sanitizante à base de óleo de coco babaçu. No entanto, como já citado acima, para o OE de capim-limão foi necessário aumentar a concentração utilizada nos biofilmes, em relação ao valor de CBM para células planctônicas.

Figura 3.3. Populações de *L. monocytogenes* IAL 633 (A e B) e de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (C e D) aderidas em superfícies de aço inoxidável (A e C) e de vidro (B e D) por (□) 4 dias e (■) 8 dias enumeradas em placas de ágar BHI, após tratamento antimicrobiano por 1h. OE = óleo essencial

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles encontrados por Oliveira et al. (2010), que demonstraram redução de cerca de 2 log UFC.cm⁻² e de 4 log UFC.cm⁻² no número de células aderidas de *L. monocytogenes* crescida em superfície de aço inoxidável por 3h e 240h, respectivamente, após tratamento por 60 minutos com soluções desinfetantes à base de OE de *C. citratus*.

Controversamente, Leonard et al. (2010) observaram aumento na biomassa de biofilmes de *L. monocytogenes* após a aplicação com OE de capim-limão (1 mg/mL) por 18h, e relataram que o componente majoritário do OE (o citral, uma mistura de isômeros cis/trans geranial e neral) exibiu atividade antibiofilme similar ao controle ciprofloxacina.

No presente estudo, foi demonstrado que todos os tratamentos aplicados em combinação (OE e sanitizante) foram mais efetivos na eliminação de células aderidas de listeria das superfícies abióticas (aço inoxidável e vidro) e, em algumas condições o número de células foi menor que o limite de detecção do método empregado (10³ UFC/cm²).

O uso isolado de sanitizante à base de dióxido de cloro não foi eficiente na remoção de células aderidas de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável e de vidro, como pode ser observado na figura 3.2. Diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, Vaid, Linton e Morgan (2010) demonstraram que baixos níveis de dióxido de cloro aquoso ou gasoso (ClO₂) reduziram populações de *L. monocytogenes* em cerca de 3 log UFC/cm² aderidas em superfície de aço inoxidável.

Belessi et al. (2011a), observaram que em biofilmes de *L. monocytogenes* formados por 8 e 12 dias, a maioria das células aderidas sobreviveram à sanitização com cloro, sendo quase inalteradas em comparação com biofilme formado por 4 dias.

São José and Vanetti (2012), mostraram que as populações de bactérias mesófila aeróbicas e fungos aderidos em tomates foram reduzidos cerca de 2 log e 1 log UFC por área, respectivamente, após a sanitização com solução de dióxido de cloro comercial (Veromax 80[®]) a 10 mg/L.

Trinetta et al. (2010) demonstraram a potencial aplicabilidade do gás ClO₂ como um agente sanitizante em equipamentos de processamento de carne. Aqueles autores observaram completa inativação de *L. monocytogenes* (> 5 log UFC/cm²) após o tratamento com 2 mg/L por 30 minutos.

Rajkovic, Smigic e Devlieghere (2010) citaram que nos Estados Unidos, a concentração máxima de 3 ppm de ClO_2 é permitida na água que entra em contato com frutas e vegetais frescos ou com aves refrigeradas e, 200 ppm é permitido para equipamentos de processamento.

Cruz e Fletcher (2012), demonstraram que dióxido de cloro de diferentes marcas reduziram cerca de 5 log de UFC de células de *L. monocytogenes* aderidas em microplacas de cloreto de polivinila, quando usados em concentrações próximas ou recomendadas pelo fabricante (500 $\mu\text{g/mL}$).

Veromax 80[®] é uma solução estabilizada de dióxido de cloro a 8%. O dióxido de cloro é amplamente utilizado na produção e em outros sistemas de processamento de alimentos, com a finalidade de eliminar micro-organismos patogênicos e, seu efeito é decorrente de sua ação forte e rápida como oxidante, sendo usado tanto na forma gasosa como aquosa (PLEITNER et al., 2014). Os principais subprodutos da desinfecção com dióxido de cloro são clorito e íons cloratos, sem formação direta de organohalogenados que são tóxicos (WHO, 2000).

De acordo com Gómez-López et al. (2009), a membrana celular microbiana tem sido identificada com o alvo primário do dióxido de cloro. Vários estudos têm demonstrado a eficácia do dióxido de cloro como um desinfetante alternativo. Kim, Kim and Song (2009), afirmaram que tratamentos com dióxido de cloro aquoso e/ou ácido fumárico podem ser utilizados para melhorar a segurança microbiológica de brotos de brócolis, causando menor impacto ambiental, diferentemente do tratamento com cloro.

Neste trabalho, o sanitizante à base de óleo de coco babaçu foi o mais efetivo entre os sanitizantes comerciais testados para eliminar *L. monocytogenes* de superfícies abióticas. Na literatura, não foram encontrados trabalhos sobre este sanitizante ou sobre sua substância natural, óleo de coco babaçu, e sua utilização como sanitizante ou publicações indexadas sobre sua propriedade antimicrobiana.

3.3.4 Estrutura e viabilidade de células de *L. monocytogenes* em biofilme formado em superfícies abióticas e tratado com óleos essenciais e/ou sanitizantes comerciais

A estrutura e viabilidade dos biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 e de *L. monocytogenes* ATCC 19115 formados em superfície de aço inoxidável por 4 e 8

dias a 25°C e que foram tratados com OEs e/ou sanitizantes comerciais por 1h a 25°C, foi avaliada através do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight®. As preparações coradas foram visualizadas em microscópio de fluorescência e, foi observado predomínio de células individuais aderidas no aço inoxidável, para todas as condições testadas, incluindo o controle (biofilme de *L. monocytogenes* tratado com água purificada esterilizada), como observado nas Figuras 3.4 e 3.5.

Ainda, nas lâminas de aço inoxidável, sob microscopia de fluorescência, foi observado predomínio de células mortas (coradas de vermelho) nos biofilmes formados por 4 dias de ambas as cepas de *L. monocytogenes* após os tratamentos com OE de capim-limão (Figura 3.4 B), em biofilmes formados por 4 dias de *L. monocytogenes* IAL 633 após exposição ao OE de gengibre combinado com sanitizante à base de dióxido de cloro (Figura 3.4 I) e, em biofilmes formados por 4 dias de *L. monocytogenes* ATCC 19115 após aplicação de OE de capim-limão combinado com sanitizante contendo dióxido de cloro (Figuras 3.5 G). Todos os tratamentos combinados (OE e sanitizante) demonstraram alta eficácia em erradicar biofilmes de 8 dias de *L. monocytogenes* IAL 633 da superfície de aço inoxidável, revelando células aderidas esparsas com matriz extracelular remanescente (Figura 3.4 O-R).

Após alguns tratamentos, como o sanitizante contendo óleo de coco babaçu (Figura 3.4 D) e o sanitizante à base de dióxido de cloro (Figura 3.4 E), foram observados biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 formados por 4 dias contendo células com formatos indefinidos. Isso também foi demonstrado em biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 de 8 dias, expostos ao OE de capim-limão (Figura 3.4 K) e ao sanitizante à base de óleo de coco de babaçu (Figura 3.4 M). Em biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 formados por 4 e 8 dias e tratados com OE de capim-limão combinado com sanitizante à base de óleo de coco babaçu (Figura 3.5 F) e com OE de gengibre (Figura 3.5 L), células com morfologias atípicas também estavam presentes.

Figura 3.4. Imagens adquiridas através de microscópio de fluorescência com o uso da ocular de 10x e objetiva de 20x. Células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) em superfície de aço inoxidável por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após tratamentos com (A, J) sem tratamento (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células coradas com Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Escala = 10 µm.

Figura 3.5. Imagens adquiridas através de microscópio de fluorescência com o uso da ocular de 10x e objetiva de 20x. Células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de aço inoxidável por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após tratamentos com (A, J) sem tratamento (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células coradas com Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Escala = 10 µm.

Os resultados encontrados deste trabalho estão de acordo com aqueles publicados por Pan, Breidt e Kathariou (2006), que observaram a presença de células individuais de *L. monocytogenes* aderidas em superfície de aço inoxidável após o tratamento com agentes sanitizantes (peróxidos).

As alterações causadas pelos OEs e sanitizantes comerciais na estrutura e viabilidade de biofilmes de *L. monocytogenes* formados por 4 e 8 dias em superfície de vidro foram visualizadas com o auxílio de microscópio confocal a laser e estão as Figuras 3.6 e 3.7 ilustram os resultados obtidos.

Nos controles foi observada uma densa população de células viáveis (verdes fluorescentes), em uma estrutura com cavidades, demonstrando a presença de canais que facilitam a distribuição e circulação de nutrientes e oxigênio dentro do biofilme (Figuras 3.6 A, J e 3.7 A). Entretanto, no controle de *L. monocytogenes* ATCC 19115 com 8 dias, foram observadas também células mortas nas cavidades de tamanhos diferentes, indicando a ocorrência de dispersão e/ou morte de células do biofilme (Figura 3.7 J).

Biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 formados por 4 dias e, posteriormente, expostos ao OE de capim-limão ou a todos os tratamentos combinados (OEs e sanitizantes) (Figura 3.6 B e F-I) apresentaram predomínio de células mortas. Efeito semelhante foi observado para biofilmes formados por 8 dias e tratados com OE de capim-limão, ou com OE de gengibre, ou com todos os tratamentos combinados (Figura 3.6 K e O-R).

Células não-viáveis prevaleceram em biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 formados por 4 dias, após o tratamento com OE de capim-limão e após a exposição aos tratamentos combinados (Figura 3.7 B e F-H), exceto para OE de gengibre combinado com sanitizante à base de dióxido de cloro (Figura 3.7 I) em que houve predomínio de células viáveis. Em biofilmes formados por 8 dias e tratados com OE de capim-limão ou OE de gengibre combinados com sanitizante a base de óleo de coco de babaçu (Figura 3.7 K e O-P) também foi observados o predomínio de células mortas.

O sanitizante à base de óleo de coco babaçu causou grande redução na população de células aderidas de ambas as cepas de *L. monocytogenes* em biofilmes de 4 dias (Figuras 3.6 D e 3.7 D), mas em biofilmes de 8 dias, foi observado um aumento populacional tanto de bactérias mortas quanto de viáveis (Figura 3.6 M e 3.7 M). Esse dado é preocupante do ponto de vista da inocuidade de alimentos, pois demonstra que o aumento do tempo de formação do biofilme de *L. monocytogenes* pode diminuir a eficácia de agentes antimicrobianos, levando a persistência bacteriana na superfície, que pode representar uma fonte importante de contaminação.

Figura 3.6. Fotomicrografias adquiridas com auxílio de microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) em ocular 10x e objetiva de 63x, sob imersão, mostrando as células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) em superfície de vidro por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após diferentes tratamentos: (A, J) água purificada esterilizada (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base de dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células viáveis coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e células mortas coradas com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente).

Figura 3.7. Fotomicrografias adquiridas com auxílio de microscópio confocal a laser (Leica, modelo SP5) em ocular 10x e objetiva de 63x, sob imersão, mostrando as células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de vidro por 4 dias (A-I) e por 8 dias (J-R) após diferentes tratamentos: (A, J) água purificada esterilizada (controle); (B, K) óleo essencial de capim-limão; (C, L) óleo essencial de gengibre; (D, M) sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (E, N) sanitizante a base de dióxido de cloro; (F, O) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (G, P) óleo essencial de capim-limão combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro; (H, Q) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de óleo de coco babaçu; (I, R) óleo essencial de gengibre combinado com sanitizante a base de dióxido de cloro. As células foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD – células viáveis coradas com Syto 9 (verde fluorescente) e células mortas coradas com iodeto de propídeo (vermelho fluorescente).

O resultado obtido no presente trabalho em que foi observada inibição de *L. monocytogenes* nos biofilmes tratados com OE de capim-limão, não estão de acordo com os resultados encontrados por Leonard et al. (2010), que ilustraram que houve aumento na biomassa do biofilme de *L. monocytogenes* após o tratamento com óleo essencial de *C. citratus* por 18h. Contudo, aqueles autores relataram um dos componentes majoritários do óleo (nerol) inibiu o biofilme de *L. monocytogenes*. Portanto, essa diferença de resultados observada pode ser devida, parcialmente, às concentrações de constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais testados.

Desai et al. (2012) testaram a atividade antibiofilme de óleos de timol, orégano e carvacrol frente a *L. monocytogenes* e, revelaram que em biofilmes de 4 dias, foram necessárias concentrações de 0,25 a 0,5%, para erradicar as células da superfície de aço inoxidável. Esse efeito não foi observado nos biofilmes de *L. monocytogenes* formados por 4 e 8 dias e tratados por 1h com óleos essenciais e/ou sanitizantes (Figura 3.6 e 3.7), observados no presente trabalho.

Neste trabalho, após o tratamento com OE de gengibre, foi observada baixa sensibilidade em biofilmes de 4 e 8 dias de ambas as cepas de *L. monocytogenes* (Figuras 3.6 C, 3.7 C e L), exceto para o biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 formado por 8 dias que apresentou predomínio de células mortas (Figura 3.6 L).

A aplicação do sanitizante à base de dióxido de cloro em biofilmes de 4 e 8 dias de ambas as cepas de *L. monocytogenes* não demonstrou efeito antibiofilme, indicado pela prevalência de células viáveis (Figuras 3.6 E e N, 3.7 E e N). Esses resultados estão de acordo com dados obtidos pela enumeração de células aderidas em superfícies de vidro e de aço inoxidável, que indicaram que não houve inibição das células aderidas em ambas as superfícies após a exposição a esse sanitizante (Figura 3.3).

Pérez-Conesa et al. (2011), revelaram através de imagens adquiridas em microscópio confocal a laser, que houve aumento no número de células mortas, após o tratamento de biofilmes de *L. monocytogenes* com micelas impregnadas de carvacrol ou eugenol.

Upadhyay et al. (2013), investigaram a eficácia de antimicrobianos derivados de plantas como *trans*-cinamaldeído, timol, carvacrol e eugenol, na inativação de biofilmes maduros de *L. monocytogenes* e, observaram a presença de células mortas e cavidades não uniforme no biofilme tratado.

Diferentemente, Sandasi, Leonard e Viljoen (2008), confirmaram por meio de microscópio eletrônico de varredura, que houve aumento na biomassa do biofilme de *L. monocytogenes* formado em superfície de cloreto de polivinila após o tratamento

com um componente de óleo essencial (α -pineno), demonstrando predomínio de células aderidas entre si e poucas células aderidas à superfície.

Uma das explicações para a maior resistência de células sésseis à ação de sanitizantes é que ocorre um efeito protetor em biofilmes, pela presença da matriz de EPS. Desse modo, o biocida deve penetrar na EPS e para então atingir a célula microbiana. A composição química da EPS pode variar significativamente de biofilme para biofilme e, substâncias oxidantes como cloro ou ácido peroxiacético são frequentemente utilizados para romper a matriz de EPS (IBUSQUIZA et al., 2011; MEYER, 2003).

Na figura 3.8 (A e C) são mostrados dados deste trabalho referentes à análise quantitativa de células viáveis e não-viáveis em biofilmes de ambas as cepas de *L. monocytogenes* formados por 4 dias, evidenciando que houve uma diminuição estatisticamente significativa da população de células viáveis de *L. monocytogenes* IAL 633 após o tratamento com OEs e/ou sanitizantes comerciais com respectivo aumento da população de células mortas (sem diferença estatística, exceto para o tratamento com OE de capim-limão).

Em biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19115 formados por 4 dias, foi demonstrada uma redução na população de células viáveis após exposição ao OE de capim-limão, ao sanitizante à base de óleo de coco babaçu, ao OE de capim-limão combinado com sanitizante à base de óleo de coco babaçu e, ao OE de gengibre combinado com sanitizante à base de dióxido de cloro ($P < 0,05$). Nessas mesmas condições foi detectado aumento no número de células mortas ($P > 0,05$), como observado na figura 3.8 B.

Os dados relativos aos biofilmes de 8 dias de ambas as cepas de *L. monocytogenes* após os tratamentos com OE e/ou sanitizante, não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$) no número de células viáveis e mortas em comparação com o controle, exceto para biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 tratados com OE de capim-limão ($P < 0,05$), como pode ser observado na figura 3.8 (B e D).

Em resumo, apesar da análise quantitativa de células viáveis e não-viáveis nos biofilmes não terem apresentado diferença significativa na maioria dos tratamentos (Figura 3.8), foi observado através de fotomicrografias adquiridas por meio de microscópio confocal a laser, que os biofilmes sem tratamento (controle) e os tratados com sanitizante à base de dióxido de cloro apresentaram predomínio de células viáveis e, para os demais tratamentos, houve aumento no número de células mortas ou redução do número de células aderidas na superfície (Figuras 3.6 e 3.7).

Os dados deste trabalho indicaram que em biofilmes de *L. monocytogenes* obtidos na superfície de aço inoxidável pelo cultivo em microplacas, houve

predomínio de células individuais de ambas as cepas de *L. monocytogenes* aderidas, com grande espaçamento entre as células (Figuras 3.4 e 3.5). Diferentemente, na câmara contendo 8 poços com fundo de borossilicato (vidro), foi observado grande número de células aderidas (Figuras 3.6 e 3.7).

Uma hipótese para isso refere-se à maior manipulação da lâmina circular de aço inoxidável ao longo do experimento, pois foi submetida a processos de lavagem, transferência de poço e substituição de meio de cultura. Provavelmente, as células fracamente aderidas que não foram removidas do sistema de borossilicato durante os processos de lavagem podem ter contribuído para aumentar o número de camada de células no biofilme.

Figura 3.8. Resultados da quantificação das células viáveis e não-viáveis de *L. monocytogenes* após os tratamentos com óleos essenciais e/ou sanitizantes comerciais através da quantificação de unidades de fluorescência por volume ($UF/\mu m^3$). (A) *L. monocytogenes* IAL 633 e (B) *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas por 4 dias; (C) *L. monocytogenes* IAL 633 e (D) *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderidas por 8 dias. Os asteriscos representam diferença estatística significativa dos tratamentos em comparação com o controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.4 Conclusão

As células planctônicas de *L. monocytogenes* foram mais sensíveis à ação do OE de capim-limão do que do OE de gengibre, e mais sensíveis à ação do sanitizante à base de dióxido de cloro em comparação com o sanitizante à base do óleo de coco babaçu. Entre os OEs e os sanitizantes comerciais, o OE de capim-limão e o sanitizante à base de óleo de coco babaçu foram os mais eficazes tratamentos na remoção de células de *L. monocytogenes* dos biofilmes de 4 e 8 dias formados em superfícies abióticas. A combinação de OEs e sanitizantes comercial também foi efetiva para reduzir a contaminação por *L. monocytogenes* em biofilmes, com ação sinérgica sobre *Listeria*.

Capítulo 4

Capítulo 4 - Efeito antibiofilme de doador de óxido nítrico em biofilmes pré-formados de *Listeria monocytogenes*

Resumo

Biofilmes de *Listeria monocytogenes* são reconhecidamente fontes potenciais de contaminação de alimentos processados por persistirem em superfícies por grandes períodos, resistindo a processos de limpeza e higienização, com possibilidade de dispersão durante a produção e colonização de novos substratos, constituindo uma fonte direta de contaminação. O entendimento de mecanismos de dispersão de células bacterianas de biofilmes é de grande interesse para a indústria, para o meio ambiente e para a área médica. O processo pode ser induzido pelo próprio micro-organismo, por exemplo, por meio do acúmulo de moléculas de oxigênio e nitrogênio reativos formadas no próprio metabolismo microbiano ou devido à exposição ambiental a substâncias relacionadas a esses processos. Neste projeto foi avaliada a presença de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo em biofilmes maduros de duas cepas de *L. monocytogenes* formados em superfícies de aço inoxidável e de vidro. Foi estudado o possível envolvimento do óxido nítrico (NO) exógeno e de inibidores de NO na indução da dispersão de células de biofilmes e na alteração dos níveis de expressão de genes de *L. monocytogenes* relacionados aos estresses oxidativo e nitrosativo (*Lmo0990*, *Lmo0807* e *Lmo1485*) bem como de gene relacionado à regulação da virulência e formação de biofilme (*PrfA*). Com a utilização de marcadores fluorescentes específicos e microscopia, foi verificada a presença de intermediários de oxigênio reativo (ROI – *reactive oxygen intermediates*) e de intermediários de nitrogênio reativo (RNI – *reactive nitrogen intermediates*) nos biofilmes de *L. monocytogenes* obtidos por 4 e 8 dias de incubação a 25°C em superfícies de aço inoxidável e de vidro. A fim de confirmar indiretamente a presença de óxido nítrico (NO) em cultivos de *L. monocytogenes* incubados por 4 e 8 dias a 25°C, foi realizada a dosagem de nitrito com reagente Griess. Foram realizados testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de um doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), e de inibidores de NO como N^ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-oxi-3-óxido (Carboxi-PTIO sal de potássio, C-PTIO) frente a *L. monocytogenes*. Foi testada a eficácia do SNP e dos

inibidores de NO na dispersão de biofilmes pré-formados de *L. monocytogenes* por 4 e 8 dias de incubação a 25°C, em superfície de aço inoxidável. No biofilme de *L. monocytogenes* formado por 4 e 8 dias em aço inoxidável, foram detectadas moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais superóxidos, bem como moléculas que indicaram o estresse nitrosativo, como óxido nítrico (NO) e peroxinitrito. Em superfície de vidro, foram detectadas apenas moléculas relacionadas com o estresse nitrosativo em biofilmes de *L. monocytogenes*. A adição de NO exógeno (SNP) ou de inibidores de NO (L-NAME e C-PTIO) no meio de cultivo não inibiu o crescimento planctônico de *L. monocytogenes*, e a exposição à SNP e aos inibidores de NO por 1h em biofilmes de *L. monocytogenes* pré-formados por 4 e 8 dias, também não induziu a dispersão celular. Os resultados do presente trabalho revelaram ainda que a adição de NO exógeno bem como a remoção de NO do meio de cultura por moléculas inibidoras não alteraram o nível de expressão dos genes *Lmo1485*, *Lmo0990*, *Lmo0807* e *PrfA*, em culturas de *L. monocytogenes* de 8 dias. Em conclusão, foi observado que tanto em culturas de células planctônicas quanto em biofilmes pré-formados por 4 e 8 dias de *L. monocytogenes* ocorreu produção de NO e a exposição de culturas planctônicas ou biofilmes a um indutor clássico de estresse nitrosativo (SNP) não apresentou efeito inibitório. Os nossos resultados mostraram ainda que SNP não interferiu nos biofilmes de *L. monocytogenes*, diferentemente do que ocorre em outras bactérias, de acordo com dados da literatura. Em conclusão, nossos resultados indicam que o estresse nitrosativo não induz dispersão em biofilmes de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, biofilme, dispersão, óxido nítrico, nitroprussiato de sódio

4.1 Introdução

Células individuais do biofilme podem ser liberadas durante o processo de produção, colonizar novos substratos ou constituírem fonte direta de contaminação dos produtos finais (CRUZ, FLETCHER, 2012), representando um risco para a saúde dos consumidores e ocasionando perdas econômicas para a indústria (SIMÕES, SIMÕES, VIEIRA, 2010).

Várias estratégias têm sido propostas para controlar a formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos, incluindo higienização de instalações, adequação de formatos de equipamentos, uso de materiais de fácil higienização e emprego de detergentes e desinfetantes em combinação com métodos físicos (KUMAR; ANAND, 1998). No entanto, a remoção de biofilmes maduros é muito difícil, devido à proteção conferida pela matriz extracelular e à heterogeneidade fenotípica, resultando em populações de células que expressam diferentes níveis de resistência a agentes sanitizantes e antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001).

A fase de dispersão pode ser um processo complexo, envolvendo numerosos sinais ambientais, cadeias de transdução de sinais e mecanismos efetores (KARATAN; WATNICK, 2009). Segundo Barraud et al. (2009b), a exposição de biofilmes a moléculas que induzem a dispersão celular pode contribuir para remoção de células aderidas, com a reversão de células sésseis para planctônicas, podendo restaurar a vulnerabilidade das células aos antimicrobianos.

Em alguns trabalhos, foi demonstrado que o uso de pequenas quantidades não-tóxicas de óxido nítrico (NO) em culturas de biofilmes bacterianos favorece a dispersão celular. Barraud et al. (2006) demonstraram que o uso de doador de NO, como por exemplo nitroprussiato de sódio (SNP) em concentrações baixas e subletais (25 a 500 nM) pode induzir a dispersão em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Barraud et al. (2009a), também observaram que a adição de NO estimulou a ação de fosfodiesterases, que induzem a redução dos níveis de GMP-dicíclico em *P. aeruginosa*, favorecendo a dispersão em biofilmes.

O uso de doadores de NO em baixas concentrações (picomolar a nanomolar) para induzir a dispersão de biofilmes parece ser seguro para humanos e para o meio ambiente (Barraud et al., 2009b).

Alguns trabalhos revelaram que a presença de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em biofilmes maduros de *P. aeruginosa* pode estar relacionada com os processos de morte e dispersão celular (BARRAUD et al., 2006; WEBB, GIVSKOV, KJELLEBERG, 2003).

Para detecção de espécies reativas relacionadas com o estresse nitrosativo e oxidativo, geralmente são utilizados marcadores não-fluorescentes que são capazes de permear a célula microbiana. São exemplos desses compostos: a) 4-amino-5-metilamino-2',7' difluoresceína diacetato (DAFFM-DA) que reage com NO para formar benzotriazol fluorescente; b) 5-(6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) que tem seus grupos acetatos removidos por esterases intracelulares e, então é oxidado em contato com H₂O₂ e torna-se vermelho fluorescente; c) hidroetidina (HEt) que é azul fluorescente no citosol até ser oxidado em contato com radicais superóxidos, intercalando-se com o DNA celular, tornando-se vermelho fluorescente; e, d) dihidrorodamina 123 (DHR) que em contato com peroxinitrito é oxidada a rodamina 123 catiônica que torna-se fluorescente (MOLECULAR PROBES, 2014).

Segundo Marheil et al. (2011), os genes *Lmo0807*, *Lmo0990* e *Lmo1485* de *L. monocytogenes* estão implicados na resistência desta bactéria ao estresse oxidativo e nitrosativo. O gene *Lmo0990* codifica um produto gênico que tem similaridade com a bomba de efluxo multidroga Na⁺ (NorM); o gene *Lmo 0807* é homólogo ao gene do complexo transportador ABC que está envolvido na importação de espermidina/putrescina e, o gene *Lmo 1485* codifica uma proteína putativa com função similar a metiltransferase relacionada com metilação de DNA, sinalização proteína-proteína e biossíntese de componentes celulares.

De acordo com Luo et al. (2013), o gene *PrfA* é um ativador transcricional que regula a expressão da maioria dos genes de virulência de *L. monocytogenes*, e também foi demonstrado que o *PrfA* promove a formação de biofilmes. Aqueles mesmos autores observaram que a deleção do gene *PrfA* alterou dramaticamente a expressão gênica de *L. monocytogenes*, e que resultou em menor capacidade de formação de biofilme pelas cepas mutantes.

No presente trabalho, foi avaliada a presença de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo em biofilmes maduros de duas cepas de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável e de vidro. A superfície de aço inoxidável não permitiu a captura de imagens em campo claro, e não foi possível visualizar células não fluorescentes sobre esta superfície. Desse modo, os experimentos na superfície de vidro foram necessários para permitir a observação das células em campo claro. Foi estudado também o possível efeito de NO exógeno e de inibidores de NO na indução da dispersão de células de biofilme maduro e na alteração do nível de expressão dos genes *Lmo1485*, *Lmo0990*, *Lmo0807* e *PrfA* de *L. monocytogenes*.

4.2 Materiais e métodos

Nesta etapa do trabalho foi utilizada microplaca de poliestireno de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de doadores de óxido nítrico e de inibidores de óxido nítrico frente a *L. monocytogenes*. Para a formação dos biofilmes de *L. monocytogenes* foram utilizadas as superfícies de vidro e de aço inoxidável. Foi estudada a presença de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo em biofilmes e presença de nitrito no meio de cultivo dessa bactéria. Foram utilizadas as técnicas de enumeração de células aderidas e análises qualitativas por meio de microscopia para observação do efeito do doador e inibidores de óxido nítrico em biofilmes maduros, conforme representado esquematicamente na figura 4.1.

Figura 4.1. Fluxograma que representa os sistemas de cultivos utilizados para os estudos de formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em diferentes superfícies abióticas e os métodos utilizados para análises qualitativa e quantitativa dos biofilmes. SNP = nitroprussiato de sódio; L-NAME = cloridrato de N^ω-Nitro-L-arginina metil éster; C-PTIO = 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-oxi-3-óxido

4.2.1 Cepas bacterianas

Listeria monocytogenes ATCC 19115 (sorotipo 4b) e *Listeria monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, foram utilizadas. Todas as culturas foram mantidas a -80°C, em caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid, Reino Unido) suplementado com glicerol 20% (v/v) (Synth, Brasil). Para todos os experimentos, as bactérias foram subcultivadas em caldo BHI e incubadas por 24h a 37°C.

4.2.2 Detecção de intermediários de oxigênio reativo e de nitrogênio reativo em biofilmes maduros de *L. monocytogenes*

Marcadores fluorescentes específicos foram empregados para estudar o estresse oxidativo e o estresse nitrosativo nos biofilmes formados por *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) por 4 e 8 dias de incubação em superfícies de vidro e de aço inoxidável.

Para detectar a presença de intermediários de oxigênio reativo (ROI – *reactive oxygen intermediates*) foram utilizados os marcadores hidroetidina (HEt) (Molecular Probes, EUA) para radicais superóxidos (O_2^-) e 5-(6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCF -DA) (Molecular Probes, EUA) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para a marcação dos intermediários de nitrogênio reativo (RNI – *reactive nitrogen intermediates*) foram utilizados 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína diacetato (DAFFM-DA) (Molecular Probes, EUA) para detectar óxido nítrico (NO) e dihidrorodamina 123 (DHR) (Molecular Probes, EUA) para detectar peroxinitrito ($ONOO^-$).

Para a utilização desses marcadores fluorescentes foram preparadas soluções estoques, como descrito por Barraud et al. (2006). HEt foi armazenado em solução de 1 mg/mL em solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS, “*Phosphate buffered saline*”, constituída por cloreto de sódio 0,8%, cloreto de potássio 0,02%, fosfato de sódio dibásico 0,115% e fosfato de potássio monobásico 0,02%) e dimetil sulfóxido 1% (DMSO, Merck, Alemanha). A solução de H_2DCF -DA foi preparada a 10 mM em DMSO. DAFFM-DA foi preparado a 5 mM em DMSO (Merck, Alemanha). DHR foi preparada como solução de 2,5 mg/mL em etanol (Synth, Brasil). Nos experimentos foram utilizadas as seguintes concentrações finais

dos marcadores fluorescentes: 10 μM para HET, 100 μM para $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, 100 μM para DAFFM-DA e 15 μM para DHR.

Para a obtenção do biofilme de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) foram utilizadas lâminas circulares de aço inoxidável AISI 304 (área de $2,45\text{ cm}^2$). As lâminas circulares foram tratadas de acordo com a metodologia descrita por Winkelströter et al. (2011). Para tanto, as lâminas circulares de aço inoxidável foram lavadas com solução Extran MA02 (Merck), fervidas durante 5 minutos em solução de lauril sulfato de sódio 1% (Vetec, Brasil) (v/v), enxaguadas em água corrente e em água purificada, imersas em álcool etílico 95% (Vetec) durante 5 minutos e novamente enxaguadas em água purificada. Posteriormente, as lâminas foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121°C .

O estudo da adesão de *L. monocytogenes* em lâminas circulares de aço inoxidável foi feito de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2008), com modificações. Para isso, 8 lâminas circulares de aço inoxidável foram colocadas em microplacas de poliestireno de 24 poços (Costar, EUA) contendo 2 mL de caldo BHI (Oxoid) e cultura *L. monocytogenes* previamente reativada (1%, v/v) em caldo BHI (Oxoid) a 37°C por 24h. Foi realizada incubação por 3h a 25°C sem agitação para permitir a adesão inicial das células bacterianas à superfície (CHAE; SCHRAFT, 2000). Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as oito lâminas de aço inoxidável foram lavadas com solução PBS por duas vezes para remoção das células não aderidas e, colocadas em um novo poço da microplaca com adição de meio de cultura fresco (2 mL de caldo BHI), seguida de incubação por 4 dias, a 25°C com agitação orbital (120 rotações por minuto, rpm), visando a aumentar o crescimento séssil. Esse mesmo procedimento de troca de meio de cultura, foi realizado após 4 dias de incubação, para 4 lâminas de aço inoxidável, que foram em seguida incubadas por mais 4 dias (total de 8 dias de incubação).

No final do 4º e 8º dias, as lâminas de aço inoxidável foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células não aderidas. As lâminas de aço inoxidável foram transferidas para um novo poço e foram adicionados 200 μL dos marcadores fluorescentes específicos para detecção de ROI e RNI nas superfícies dos discos, seguido de incubação em temperatura ambiente por 30 minutos em sala escura. Posteriormente, as soluções dos marcadores fluorescentes foram retiradas e as superfícies foram lavadas novamente com solução PBS por duas vezes para remoção do excesso de corante.

As lâminas foram removidas cuidadosamente de cada poço e a parte inferior da lâmina circular de aço inoxidável (que não foi corada) foi colada em uma lâmina de vidro com cola instantânea (Super Bonder, Loctite, EUA), e na parte superior corada, foi colocada uma lamínula de vidro circular. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, modelo 80i, Japão) com ocular de 10x e objetivas de 20x e 40x. O filtro para excitação a 450-490 nm foi utilizado para visualizar as células coradas com DAFFM-DA, e o filtro para excitação a 510-560 nm foi utilizado para visualizar as células coradas com H₂DCF-DA, DHR e HET.

A formação de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de vidro foi obtida em câmara de poliestireno contendo 8 poços com fundo de borosilicato (Nagle Nunc International, EUA). Para tanto, 0,5 mL de caldo BHI (Oxoid) foi inoculado com cerca de 10⁷-10⁸ células de *L. monocytogenes* por mL (previamente cultivada a 37°C por 24h em caldo BHI) e incubado por 3h a 25°C. Após 3h e 4 dias de incubação, foi feita a troca de meio de cultura para remoção das células não aderidas. Para isso, foi retirado o meio de cultura de cada poço e, em seguida, foi feita a lavagem dos poços com PBS por duas vezes e, foi adicionado 0,5 mL de caldo BHI, e a incubação foi prosseguida por até 4 ou 8 dias a 25°C.

Após a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* por 4 e 8 dias, cada poço foi lavado por três vezes com solução de PBS e as células aderidas nas superfícies foram coradas com soluções dos marcadores fluorescentes para detecção de ROI e RNI por 30 minutos em sala escura. Posteriormente, as soluções contendo os marcadores fluorescentes foram removidas e as superfícies dos poços foram lavadas com solução tampão PBS por duas vezes, para remoção do excesso de corante.

Foram feitas observações em microscópio confocal a laser (LEICA TCS-SP5 AOBS, software LAS-AF, do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP) na objetiva de 63x com óleo de imersão. O laser de argônio (488 nm – para fluorescência verde) foi utilizado para visualizar as células coradas com DAFFM-DA, e o laser de hélio (543 nm – para fluorescência vermelha) foi utilizado para visualizar as células coradas com H₂DCF-DA, DHR e HET.

4.2.3 Avaliação do efeito inibitório de doador e de inibidores de óxido nítrico frente a células planctônicas de *L. monocytogenes*

Foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) de doador e de inibidores de óxido nítrico através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2003, com modificações) frente a células planctônicas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b).

O doador de NO utilizado foi o nitroprussiato de sódio (SNP, Sigma, EUA), enquanto que cloridrato de N_ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Sigma, EUA) foi empregado como inibidor de NO e, 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido (Carboxi-PTIO sal de potássio, C-PTIO, Sigma, EUA) foi empregado para captação de NO.

Uma cultura de *L. monocytogenes* de 24h a 37°C em caldo BHI (Oxoid), foi diluída para 0,5 da escala de McFarland, ou seja, aproximadamente entre 10⁵-10⁶ UFC/mL. Foram utilizadas microplacas de poliestireno (8 colunas x 12 linhas) de 96 poços (Costar, EUA). No primeiro poço de cada linha, foram adicionados 80 µL de caldo BHI e 80 µL de uma solução-estoque de SNP (2000 µg/mL), de L-NAME (1000 µM) ou de C-PTIO (1000 µM) preparadas em água purificada esterilizada. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado, e 80 µL do primeiro foram transferidos para o segundo poço, e assim, sucessivamente até o sexto. Cada poço foi inoculado com 20 µL do inóculo bacteriano ajustado e foi realizada incubação a 25°C por 24h. Foram testadas as seguintes concentrações do doador e de inibidores de NO: de 25 a 800 µg/mL (v/v) para SNP e de 12,5 a 400 µM (v/v) para L-NAME e C-PTIO.

Como controles foram utilizados poços contendo 100 µL de caldo BHI sem inóculo (controle negativo) e poços com 80 µL de caldo BHI e 20 µL do inóculo bacteriano ajustado (controle positivo). Os experimentos foram realizados em triplicatas sendo repetidos por duas vezes.

Decorrido o tempo de incubação, o crescimento de *L. monocytogenes* na presença de SNP, L-NAME e C-PTIO, detectado a olho nu, seria indicado pela turvação do meio de cultura. A CIM seria considerada como a menor concentração de SNP, L-NAME ou C-PTIO que inibiu completamente o crescimento de *L. monocytogenes*.

4.2.4 Dosagem de nitrito presente nas culturas planctônicas de *L. monocytogenes*

Nesta etapa do trabalho, foi utilizada para a dosagem de nitrito a mesma microplaca de 96 poços de poliestireno utilizada para a determinação da CIM do doador e dos inibidores de NO frente a *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) por 24h a 25°C.

Além disso, foi utilizada outra microplaca de poliestireno de 96 poços para a dosagem de nitrito presente na cultura de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) de 4 e 8 dias de incubação a 25°C, para verificar se com o aumento do tempo de incubação poderia aumentar a quantidade de nitrito do meio proveniente da produção de NO.

Neste trabalho, a concentração de nitrito no meio de cultura foi quantificada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess, de acordo com as especificações do fabricante. Esse método serve para detectar nitrito formado pela oxidação espontânea de NO em condições fisiológicas, sendo o limite de detecção de 1,0 µM de nitrito.

Para tanto, decorrido o tempo de incubação nas microplacas (24h, 4 dias e 8 dias), foram retirados 60 µL do meio de cultura contendo células planctônicas de *L. monocytogenes* com ou sem SNP, L-NAME e C-PTIO, e transferidos para tubos com capacidade de 1,5 mL, em seguida centrifugados a 6.048g a 4°C por 15 minutos (Thermo, modelo Legend Mach 1.6R, EUA). Posteriormente, 40 µL do sobrenadante centrifugado foram colocados em uma nova microplaca de poliestireno de 96 poços, e foram adicionados 180 µL da solução de Griess, composta por 165 µL de água purificada, 7,5 µL do reagente A, *N*-(1-naftil)etilenodiamina dihidroclorato, e 7,5 µL do reagente B, ácido sulfanílico (kit de Griess, Invitrogen, EUA).

Diferentes concentrações (3,12 a 200 µM) de nitrito de sódio (NaNO₂) foram quantificadas na mesma microplaca para posterior obtenção de curva analítica para o cálculo da concentração de nitrito nas amostras. Para tanto, foram adicionados em todos os poços 40 µL de água purificada e, no primeiro poço foram adicionados 40 µL do padrão de NaNO₂ (400 µM) do kit de Griess (Invitrogen). A mistura foi homogeneizada e, foram transferidos 40 µL da solução para o segundo poço e, assim sucessivamente até o sétimo poço. Um controle (branco) foi também preparado em outro poço contendo somente 40 µL de água purificada. Em seguida,

foram adicionados 180µL da solução de Griess em cada poço. Para leitura de densidade ótica a 540 nm foi utilizada uma leitora de microplaca (Varian Cary 50 Microplate Reader, EUA).

Os experimentos foram realizados em triplicata para determinação da CIM de SNP, L-NAME e C-PTIO frente a células planctônicas de *L. monocytogenes* e para determinação da concentração de nitrito no meio. Para as culturas de *L. monocytogenes* incubadas por 4 e 8 dias para determinação da concentração de nitrito no meio, foram realizadas sextuplicatas.

4.2.5 Enumeração de células aderidas de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas após tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico

Para a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfícies de aço inoxidável por 4 e 8 dias foi utilizado o mesmo sistema de lâminas circulares descrito no subitem 4.2.2. Decorridos 4 e 8 dias de incubação, as lâminas de aço inox foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram tratadas com 500 µL de SNP (100 µg/mL e 2000 µg/mL), L-NAME (100 µM) e C-PTIO (100 µM) por 1h a 25°C sob agitação orbital.

O tempo de exposição de 1h foi escolhido devido a resultados obtidos de testes preliminares realizado no laboratório. As populações de células aderidas de *L. monocytogenes* foram similares em biofilmes formados em superfície de aço inoxidável por 8 dias, por 3h e por 24h e expostos ao doador ou inibidores de NO, respectivamente, por 1h, por 24h e expostos por 7 dias. Como não houve alteração nas contagens, então foi escolhido o tempo de exposição por 1h, que já estava sendo utilizado para outras substâncias frente aos biofilmes de *L. monocytogenes*.

Para enumeração das células aderidas de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável após os tratamentos com doador de NO e inibidores de NO, os discos foram lavados com solução PBS por três vezes e, transferidos para tubos com 10 mL de solução PBS e foram agitados em banho de ultrassom (50-60 Hz) durante 2 minutos e em seguida por 1 minuto em agitador tipo vortex (LERICHE; CARPENTIER, 1995, com modificações). Foram feitas diluições decimais seriadas e 10 µl de cada diluição foram semeados pelo método *drop plating* (HERIGSTAD;

HAMILTON; HEERSINK, 2001, com modificações) em placas de ágar BHI, e incubadas a 37°C por 24h.

Os resultados da enumeração das células aderidas em aço inoxidável foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias de *L. monocytogenes* por cm² (UFC/cm²). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

4.2.6 Avaliação da arquitetura de biofilmes de *L. monocytogenes* após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a arquitetura e a viabilidade celular de biofilmes de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfícies de aço inoxidável por 4 e 8 dias, sendo utilizado o mesmo sistema de lâminas circulares descrito no subitem 4.2.2 e os tratamentos com SNP, L-NAME e C-PTIO descrito no subitem 4.2.5.

Após 4 e 8 dias de incubação a 25°C e após o tratamento com SNP (2000 µg/mL), L-NAME (100 µM) e C-PTIO (100 µM) por 1h a 25°C, os discos de aço inoxidável foram lavados com solução PBS por três vezes para remoção das células fracamente aderidas e, as células aderidas nas superfícies foram coradas com sondas fluorescentes Syto 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular Probes, EUA) por 15 minutos (JOSHI et al., 2010). Estes corantes permitem a diferenciação de células bacterianas viáveis (membrana intacta - verdes fluorescentes) de células mortas (membrana danificada - vermelhas fluorescentes). As superfícies foram lavadas com solução PBS por duas vezes para remoção do excesso de corante. A parte inferior da lâmina circular de aço inoxidável que não entrou em contato com as sondas fluorescentes foi colada em uma lâmina de vidro, e o seu outro lado, com as células aderidas coradas foi recoberto com uma lamínula de vidro circular.

As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon modelo 80i), com ocular 10x e na objetiva de 20x, usando os filtros Nikon B-2A (excitação 450-490 nm) para detectar Syto 9 e Nikon G-2A (excitação 510-560 nm) para detectar iodeto de propídeo. De 3 a 5 imagens por lâmina circular de aço inox foram capturadas através do software NIS-Elements AR 3.2 (Nikon). Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo repetidos independentemente por três vezes.

4.2.7 Análise de expressão gênica em biofilmes pré-formados e culturas planctônicas de *L. monocytogenes* após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico

Para a análise de expressão gênica de células planctônicas e de biofilmes formados em superfícies de aço inoxidável de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e ATCC 19115 (sorotipo 4b) incubadas por 8 dias a 25°C, foi utilizado o sistema de cultivo de microplacas de 24 poços contendo lâminas circulares de aço inoxidável descritos no subitem 4.2.4.

Decorridos 8 dias de incubação, o sobrenadante do meio de cultura foi coletado para tratamento com doador e inibidores de NO. Para o estudo de células planctônicas de *L. monocytogenes* (presentes no sobrenadante do meio de cultura), foi retirado 1 mL do caldo de cultura e, foi transferido para um novo poço da microplaca. As lâminas circulares de aço inoxidável contendo as células aderidas foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células não aderidas e, transferidas para outro poço da microplaca para receber o tratamento. Em seguida, as células aderidas no aço inoxidável e as culturas planctônicas (sobrenadante) de *L. monocytogenes* foram tratadas com SNP (2000 µg/mL), L-NAME (100 µM) e C-PTIO (100 µM) por 1h a 25°C sob agitação.

Antes de coletar as amostras para extração total de RNA das células aderidas em superfície de aço inoxidável e das células planctônicas de *L. monocytogenes*, foram retirados 100 µL de cada poço para enumeração de células aderidas e planctônicas após o tratamento. Para as células aderidas, as lâminas de aço inoxidável foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células fracamente aderidas e, posteriormente, as lâminas foram transferidas para um tubo contendo 10 mL de solução PBS, e agitadas em banho de ultrassom (50-60 Hz) durante 2 minutos e em seguida em agitador tipo vortex por mais 1 minuto (LERICHE; CARPENTIER, 1995, com modificações). Foram feitas diluições decimais seriadas e 10 µL de cada diluição foram semeados pelo método *drop plating* (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001, com modificações) em placas de ágar BHI [caldo BHI adicionado de 1,5% de ágar bacteriológico (Oxoid)] e incubados a 37°C por 24h, para enumeração das células aderidas, sendo os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia por centímetro quadrado (UFC/cm²).

Para enumeração das células planctônicas, foram coletados 100 µL de cada poço da microplaca e transferidos para tubos de capacidade de 1,5 mL contendo 900 µL de solução de PBS e, foram feitas diluições decimais seriadas de cada amostra e, em seguida foram semeados 10 µL em triplicata em placa de petri contendo ágar BHI, seguida de incubação a 37°C por 24h. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

Para extração do RNA total das células planctônicas de *L. monocytogenes*, 1 mL de cada cultura tratada foi transferido para um tubo de 1,5 mL e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de Tri-Reagent® (Zymo Research, EUA). Para as células aderidas de *L. monocytogenes* na superfície de aço inoxidável, as lâminas circulares foram lavadas com solução PBS por três vezes para remoção das células fracamente aderidas e, foram agitadas em banho de ultrassom (50-60 Hz) durante 2 minutos e em seguida por 1 minuto em agitador tipo vortex (LERICHE; CARPENTIER, 1995, com modificações). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de Tri-Reagent® (Zymo Research).

Após a adição de Tri-Reagent® seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente para dissolução dos complexos de nucleoproteínas, tanto para as amostras com células planctônicas quanto para as amostras com células sésseis, foram seguidas as mesmas etapas para extração do RNA total, conforme especificações do fabricante e de acordo com a metodologia descrita por Werbrout et al., 2009. Foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, e foi feita homogeneização por inversão. Após um período de 3 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (fase incolor) foi transferido para outro tubo, com capacidade para 1,5 mL. O RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol e a amostra foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg a 4°C. O isopropanol foi descartado e o extrato foi lavado com 500 µL de etanol 75% e seco em temperatura ambiente. Em seguida os extratos foram ressuspensionados em 50 µL de água ultra-pura tratada com 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen) e foi feita incubação a 60°C por 10 minutos, para facilitar a dissolução do RNA.

O extrato de RNA total foi tratado com DNase presente no kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Reino Unido), de acordo com as especificações do fabricante, com algumas modificações. Para tanto, a cada extrato de RNA obtido (50 µl) foi adicionado 1 µL de solução de DNase I e foi incubado por 2 horas a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 2 µL de EDTA, seguido de re-incubação a 65°C por 10 minutos.

Após o tratamento com DNase, foi feita a extração com fenol-clorofórmio para remoção dos resíduos de DNA contaminante (SUE et al., 2003). Foi adicionado ao extrato do RNA tratado, 50 µL de água ultra-pura tratada com DEPC e, posteriormente, foram adicionados 100 µL da solução fenol:clorofórmio (1:1). A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000xg por 10 minutos. Nesta etapa, ocorreu a separação de fases, onde foi coletada a fase incolor, que foi transferida para outro tubo de 1,5 mL e, foram adicionados 500 µL de isopropanol e foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas em 500 µL de etanol 75% (v/v) e secas em temperatura ambiente. Em seguida os precipitados foram ressuspensos em 50 µL de água ultra-pura tratada com DEPC. O extrato contendo RNA foi incubado a 60°C por 10 minutos, para facilitar a dissolução. O extrato de RNA obtido foi armazenado a -80°C até o momento de sua análise por PCR em tempo real.

O RNA total de cada amostra foi quantificado e avaliado quanto ao seu grau de pureza em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, modelo nanodrop 2000). Medidas de absorbância foram obtidas em comprimentos de onda 260 e 280 nm. A taxa de absorbância em 260 nm e 280 nm é utilizada para verificar a pureza de DNA e RNA. A razão de aproximadamente 2,0 é geralmente aceita como boa pureza para RNA; se essa razão for menor, pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente próximo do comprimento de onda de 280 nm. A razão 260/280 mede o nível de contaminação com proteínas na amostra e a razão 260/230 mede o nível de contaminação de substâncias da preparação da amostra como fenóis (FLEIGE, PFAFFL, 2006; SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989).

Após a quantificação, todos os extratos contendo RNA foram diluídos a uma concentração de 1000 ng/µL e em seguida foi realizada reação para conversão do RNA em DNAc conforme instruções do *kit High-Capacity DNAc Reverse*

Transcription contendo inibidor de RNase (Applied Biosystems, EUA). As amostras de DNAC foram armazenadas a -20 °C, para análise posterior por PCR em tempo real.

O DNAC foi utilizado para a realização da PCR em tempo real, para a quantificação da expressão dos genes de *L. monocytogenes* relacionados ao estresse oxidativo *Imo0990*, *Imo0807* e *Imo1485* e o gene relacionado com a capacidade de formação de biofilmes *PrfA*. Como controle endógeno foi utilizado o gene *16S rRNA* (Tabela 4.1). O volume final da reação de PCR foi de 10 µL, sendo os componentes: 2µL da solução contendo DNAC, 5 µL do reagente iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, EUA), 2 µL de água purificada (Milli-Q, Millipore, EUA) e 0,5 µL de solução de cada primer a 0,5 µM, descritos na Tabela 4.1 (Invitrogen, EUA).

O protocolo de amplificação da PCR em tempo real consistiu de uma etapa inicial de 15 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos com desnaturação de 95°C por 15 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, exceto para o gene *Imo1485*, em que foi necessária uma mudança na temperatura de anelamento para 56°C por 30 segundos.

Os ensaios foram realizados considerando um limiar de detecção (“*threshold*”) de 0,014. Os valores de CT (“*Cycle Threshold*”) correspondem ao ciclo de amplificação em fase exponencial onde ocorria a intersecção da curva de amplificação com este limiar (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

Os valores de CT foram utilizados para avaliar a expressão diferencial dos genes alvos nas diferentes condições e para isso foi calculado o $\Delta\Delta CT$. A expressão gênica foi obtida a partir da equação $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresentou amplificação exponencial e ΔCT a diferença entre o CT da amostra amplificada para o gene utilizado como controle endógeno. Finalmente o $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra de interesse (condições analisadas) e o ΔCT da amostra de referência - calibrador (sem tratamento, *L. monocytogenes* tratada com água purificada esterilizada) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para fazer a comparação dos grupos, os valores de CT obtidos foram normalizados com os valores de CT do gene endógeno 16S para cada amostra e calibrados, conforme as fórmulas abaixo:

- Normalização: $CT_{(\text{gene alvo})} - CT_{(\text{controle endógeno})} = \Delta CT$

- Calibração: $\Delta CT_{(\text{condição estresse})} - \Delta CT_{(\text{caldo modelo sem suplemento})} = \Delta \Delta CT$

Em seguida foram avaliados quanto ao nível de expressão gênica pela fórmula:

$$QR (\text{nível de expressão gênica}) = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

Os valores da expressão gênica de cada isolado obtido nas diferentes condições foram representados em unidades arbitrárias.

Tabela 4.1. Especificações dos *primers* que foram utilizados para avaliação da expressão gênica em *Listeria monocytogenes*.

Primer	Sequência (5'- 3')	Referência
16S-rRNA-fwd	GATGCATAGCCGACCTGAGA	Werbrouch et al. (2009)
16S-rRNA-rev	TGCTCCGTCAGACTTTCGTC	Werbrouch et al. (2009)
Imo0807-fwd	CACTATGAAGTAGGTTGTATCG	Mraheil et al. (2011)
Imo0807-rev	ATCGAATTCTTCCTCCGTTTC	Mraheil et al. (2011)
PrfA-fwd	CAATGGGATCCACAAGAATATTGTAT	Werbrouch et al. (2009)
PrfA-rev	GATGGTCCCGTTCTCICTAA	Werbrouch et al. (2009)
Imo0990-fwd	TTATTGTGCTCTTGCTTTCGAG	Mraheil et al. (2011)
Imo0990-rev	CAGTCCTGTAAATCCACTGAAA	Mraheil et al. (2011)
Imo1485-fwd	CGCATTTAGAACCAAATGG	Mraheil et al. (2011)
Imo1485-rev	CGATGGAGTGTGGATGTT	Mraheil et al. (2011)

4.2.8 Análise estatística

Os resultados da CIM e da dosagem de nitrito das células tratadas com SNP, L-NAME e C-PTIO, bem como a enumeração de células aderidas em superfície de aço inoxidável e da expressão gênica de células de *L. monocytogenes* após tratamento com SNP, L-NAME e C-PTIO foram avaliados através da análise de variância de uma via ANOVA, seguida do teste de Bonferroni, considerando como diferença significativa $P < 0,05$ para a diferença entre os tratamentos aplicados. Os resultados da dosagem de nitrito em culturas de *L. monocytogenes* de 4 e 8 dias

foram analisados pela análise de variância de duas vias ANOVA, seguida do teste de Bonferroni, para verificar se havia diferença significativa na concentração de nitrito entre as culturas de *L. monocytogenes* nos diferentes tempos de incubação. Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa Prisma Graph versão 5.0. (EUA).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Detecção de intermediários de oxigênio reativo e de nitrogênio reativo em biofilmes maduros de *L. monocytogenes*

A fim de investigar a presença moléculas de ROI e de RNI em biofilmes maduros de *L. monocytogenes* (4 e 8 dias a 25°C) formados em superfície de aço inoxidável e de borossilicato, estes foram marcados com reagentes fluorescentes específicos e examinados em microscópio confocal a laser (para superfície de borossilicato) ou em microscópio de fluorescência (para superfície de aço inoxidável).

Na figura 4.2, está mostrado que houve fluorescência em todas as condições avaliadas com os marcadores testados: DAFFM-DA para detecção de NO; DHR para detecção de peroxinitrito; H₂DCF para detecção de H₂O₂; e, HET para detecção de radicais superóxidos.

Figura 4.2. Fotomicrografias que documentam as análises realizadas com marcadores fluorescentes para ROI e RNI em biofilmes de *L. monocytogenes* 1/2a (A, B, E, F, I, J, M e N) e *L. monocytogenes* 4b (C, D, G, H, K, L, O e P) na superfície de aço inoxidável após 4 dias (A, E, I, M, C, J, K, O) e 8 dias (B, F, J, N, D, H, L e P). Foram utilizados H₂DCF (A-D) para detectar peróxido de hidrogênio; DAFFM-DA (E-H) para detectar óxido nítrico; HET (I-L) para detectar radicais superóxidos e DHR (M-P) para detectar peroxinitrito. Foram capturadas imagens em ocular de 10x e objetiva de 40x com auxílio de microscópio de fluorescência. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 µm.

Nas figuras 4.3 e 4.4, podem ser observadas fluorescências obtidas com dois marcadores: DAFFM-DA que detecta NO e, DHR que detecta peroxinitrito em biofilmes de *L. monocytogenes* (1/2a e 4b) formados em superfície de vidro com 4 e 8 dias de incubação.

Os resultados negativos para fluorescência com os marcadores H₂DCF e HET, são indicativos da ausência de H₂O₂ e de radicais superóxidos, respectivamente, nos biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfície de borosilicato (Figuras 4.3 e 4.4).

Os resultados obtidos para as duas superfícies (aço inoxidável e vidro) foram diferentes. NO e peroxinitrito foram detectados nos biofilmes de *L. monocytogenes* em todas as superfícies testadas (aço inoxidável e vidro). Entretanto, H₂O₂ estava presente apenas na superfície de aço inoxidável com 4 dias de incubação e, radicais superóxidos foram detectados na superfície de aço inoxidável com 4 e 8 dias de incubação. Essa diferença pode ser atribuída em parte a características intrínsecas de cada sistema de cultivo, pois no caso da superfície de aço inoxidável, as microplacas foram incubadas em agitação orbital, o que pode ter causado aeração do meio, justificando a presença de moléculas intermediárias de oxigênio reativo, como H₂O₂ e radicais superóxidos.

Figura 4.3. Fotomicrografias que documentam as análises realizadas com marcadores fluorescentes para moléculas intermediárias de oxigênio reativo (ROI) e para moléculas intermediárias de nitrogênio reativo (RNI) em biofilmes de *L. monocytogenes* 1/2a em superfície de borosilicato com 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) corados com marcadores fluorescentes. Imagens capturadas na ocular de 10x e em objetiva de 63x (sob imersão) com zoom de 2,5, por fluorescência e campo claro, com o auxílio de microscópio confocal a laser. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 µm.

Figura 4.4. Fotomicrografias que documentam as análises realizadas com marcadores fluorescentes para moléculas intermediárias de oxigênio reativo (ROI) e para moléculas intermediárias de nitrogênio reativo (RNI) em biofilmes de *L. monocytogenes* 4b em superfície de borosilicato com 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) corados com marcadores fluorescentes. Imagens capturadas por fluorescência e campo claro com o auxílio de microscópio confocal a laser na ocular de 10x e em objetiva de 63x (sob imersão) com zoom de 2,5, por fluorescência e campo claro, com o auxílio de microscópio confocal a laser. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala= 10 µm.

Na literatura não foi encontrado nenhum resultado sobre detecção de ROI e RNI em biofilmes de *L. monocytogenes*. No entanto, foram encontrados trabalhos relacionados com estresse oxidativo e nitrosativo, bem como produção de NO em diferentes gêneros bacterianos.

Barraud et al. (2006), encontraram fluorescência para DHR e HET em biofilmes de *P. aeruginosa* em superfície de vidro após 7 dias de incubação e, verificaram resultados negativos para H₂DCF e DAFFM-DA. Para o marcador DAFFM-DA, aqueles mesmos autores encontraram resultado negativo, mesmo com a adição de nitroprussiato de sódio ao meio de cultura (SNP, doador de NO), sugerindo que o marcador não foi capaz de detectar NO em biofilmes de *P. aeruginosa*.

L. monocytogenes é uma bactéria catalase positiva, e a presença desta enzima é um dos principais fatores envolvidos na resistência de células ao estresse oxidativo, via degradação do H₂O₂ (HERBERT, FOSTER, 2001). O resultado negativo para H₂DCF encontrado para o biofilme formado por *L. monocytogenes* na superfície de vidro corrobora com a ação da enzima catalase por essa bactéria. Controversamente, na superfície de aço inoxidável foram observadas células coradas com H₂DCF, indicando a presença de H₂O₂ nas células.

Webb, Givskov e Kjelleberg (2003), verificaram que biofilmes de *P. aeruginosa* com 10 dias de incubação corados com DHR 123, apresentaram fluorescência somente nas microcolônias que apresentavam cavidades, indicando morte celular e acúmulo de espécies de oxigênio reativo dentro do biofilme devido à idade ou senescência da bactéria e no sistema multicelular.

Barraud et al. (2006) relataram a presença de peroxinitrito dentro de microcolônias de *P. aeruginosa*, sendo este formado devido à oxidação de NO somente na presença de intermediários de oxigênio reativo (por exemplo O²⁻). Aqueles autores, entretanto, não explicaram porque peroxinitrito foi produzido dentro de microcolônias, um ambiente considerado de baixa tensão de O₂, apesar de ocorrer um gradiente de O₂ e NO₃ devido à respiração.

Neste trabalho, o peroxinitrito detectado no biofilme de *L. monocytogenes* provavelmente foi formado pela oxidação de NO na presença de intermediários de oxigênio reativo, uma vez que biofilmes de *L. monocytogenes* não apresentam muitas camadas de células, sendo provável que não tenha ocorrido a formação de um microambiente anaeróbio nessas estruturas.

De acordo com as imagens das figuras 4.3 e 4.4, há células em imagens de campo claro, mas que não fluoresceram. A presença de NO e de peroxinitrito foi indicada por forte fluorescência, em células que estavam próximas de cavidades, indicando provavelmente a ocorrência de processos de dispersão ou morte celular (Figura 4.3 C, D e G).

Liu, Huang e Chen (2012), inseriram o gene *nos*, que codifica a expressão da enzima NO sintase, em *Pseudomonas putida* para produzir NO. Biofilmes de *P. putida* com NO endógeno apresentaram forte fluorescência quando corados com DAFFM-DA e, níveis tóxicos de NO inibiram a formação de biofilme por *P. putida*, induzindo a dispersão de células da superfície.

Schreiber et al. (2011) demonstraram através de microscopia confocal a laser combinada com o marcador específico cobre fluoresceína, que *Bacillus subtilis* 3610 produziu NO intracelular por meio da enzima NOS. Esses mesmos autores revelaram que a produção de NO é baixa no meio de cultura que usualmente é utilizado para formação de biofilmes.

Trabalhos recentes têm demonstrado que várias bactérias gram-positivas como *Bacillus anthracis*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) apresentam a enzima NO sintase e produzem NO, o qual pode influenciar a capacidade de resistência a determinados antibióticos, fatores de virulência e a sobrevivência frente a ataques imunes oxidativos (SHATALIN et al., 2008; SCHREIBER et al., 2011; VAN SORGE et al., 2013).

L. monocytogenes é um patógeno intracelular que é capaz de invadir células do hospedeiro e disseminar célula-célula. Cole et al. (2012), demonstraram que a produção de NO por macrófagos durante a infecção primária por *L. monocytogenes* parece retardar a fusão fagolisossomal e, aumentar a sobrevivência de listeria nas células fagocíticas, auxiliando, portanto, na disseminação de *L. monocytogenes* para novas células. Esses resultados indicam que o NO produzido pelos macrófagos não tem efeito inibitório frente a *L. monocytogenes*, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho para *L. monocytogenes* em biofilmes.

Na literatura não foram encontrados relatos de bactérias do gênero *Listeria* que apresentam a enzima NO sintase ou que produzam NO. No presente trabalho, de maneira inédita foi detectado NO em biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies de aço inoxidável e de vidro. Desse modo, uma hipótese é que a produção de NO por *L. monocytogenes* ocorre por outras vias que não a via de NO sintase.

Sudhamsu e Crane (2009) relataram que bactérias podem produzir NO por várias vias independentes da enzima NOS. Wu e Morris (1998) e Wei et al. (2007) demonstraram que arginina pode ser precursora de NO, através de sua hidrólise, formando citrulina e amônia, pela ação da enzima arginina deiminase.

Schreiber et al. (2011) demonstraram que em biofilmes de *B. subtilis* foi detectada a produção de NO mesmo com a adição de inibidor de NOS, indicando que ocorre produção de NO por outras vias além da via da enzima NOS.

L. monocytogenes utiliza a enzima arginina deiminase para degradar arginina em amônia e citrulina, que podem ser utilizadas como fontes de nitrogênio (JOSEPH, GOEBEL, 2007). É provável que essa via de catabolização da arginina que *L. monocytogenes* utiliza seja a fonte de produção do NO encontrado no biofilme de *L. monocytogenes*, embora sejam necessários mais estudos para a comprovação desta hipótese.

4.3.2 Ação inibitória do doador e de inibidores de óxido nítrico frente a células planctônicas de *L. monocytogenes*

Diante dos resultados deste trabalho, com a detecção de intermediários de oxigênio e nitrogênio reativos nos biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfícies de aço inoxidável, foi testado o efeito da adição de inibidores de NO (L-NAME e C-PTIO) e de doador de NO (SNP) em biofilmes de *L. monocytogenes* formados em superfície de aço inoxidável.

Para impedir a formação de NO em sistemas biológicos podem ser empregados o cloridrato de N_ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um análogo da arginina que inibe a produção de NO e, também o sal potássio de carboxi-PTIO (C-PTIO) que reage com óxido nítrico para formar derivados de carboxi-PTI, inibindo a ação da NO sintase (SIGMA, 2014).

Neste trabalho, inicialmente foram verificadas as ações inibitórias do SNP, L-NAME e C-PTIO frente a células planctônicas de *L. monocytogenes*. As concentrações testadas de SNP (25-800 µg/mL), de L-NAME (12,5-400 µM) e de C-PTIO (12,5-400 µM) não apresentaram efeito inibitório e, não foi possível determinar o valor de CIM para tais compostos.

Ogawa et al. (2001) sugeriram que espécies reativas de nitrogênio (doadores de NO como PAPA/NO ($\text{NH}_2(\text{C}_3\text{H}_6)(\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]\text{C}_3\text{H}_7)$) e DEA/NO ($\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$)

sozinhas ou em combinação com espécies relacionadas com oxigênio reativo (como hipoxantina, xantina oxidase e catalase) não tiveram efeito na sobrevivência ou na erradicação direta de *L. monocytogenes* em caldo BHI por 3h.

Entretanto, Zaitseva et al. (2009) observaram que a partir de 100 µg/mL de SNP, as células planctônicas de *P. aeruginosa* foram inibidas. Joannou et al. (1998) também demonstraram que SNP (10 a 40 mM) inibiu *Clostridium sporogenes*, enquanto que concentrações maiores que 80 mM causaram morte e lise celular. Aqueles mesmos autores observaram alterações na morfologia da parede celular de *C. sporogenes* após tratamento com concentrações subletais de SNP (20-40 µM), demonstrando que a parede celular é provavelmente o alvo primário desse agente nitrosil.

Como não foi possível neste trabalho obter a CIM para SNP, L-NAME e C-PTIO frente a *L. monocytogenes*, foi utilizada em biofilmes pré-formados a concentração da solução-estoque de SNP (2000 µg/mL) e, concentrações de doador e inibidores de NO previamente descritas na literatura, a saber 100 µg/mL de SNP (Zaitseva et al., 2009) e a concentração de L-NAME e C-PTIO de 100 µM (Schreiber et al., 2011).

4.3.3 Dosagem de nitrito nas culturas de *L. monocytogenes*

De acordo com Liu et al. (2012), o NO produzido pelas células é oxidado a nitrito e nitrato em meio aerado, portanto, concentrações de nitrito e nitrato estão diretamente correlacionadas com o nível de NO gerado.

A figura 4.5 apresenta a quantidade de nitrito presente no meio de cultivo de *L. monocytogenes* adicionado de diferentes concentrações de SNP, L-NAME e C-PTIO após 24h de incubação a 25°C. Para ambas as cepas de *L. monocytogenes* IAL 633 e ATCC 19115, as maiores concentrações de nitrito foram encontradas com a adição de 100, 200 e 400 µg/mL de SNP quando comparado com o controle (*L. monocytogenes* sem adição de SNP). Adicionando-se maior concentração de SNP (800 µg/mL) não foi detectada maior quantidade de nitrito no meio, indicando que não houve aumento do consumo de NO (Figura 4.5 A e C).

No cultivo de *L. monocytogenes* na presença do inibidor de NO (L-NAME), não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) na quantidade de nitrito encontrada, quando comparado com o controle. As diferentes concentrações do

sequestrador de NO, C-PTIO, não alteraram a concentração de nitrito detectada no meio com *L. monocytogenes* IAL 633 (Figura 4.5 B e D)

A quantidade de nitrito detectada no controle (*L. monocytogenes* sem adição de doador ou inibidor ou captador de NO) foi baixa, dificultando a detecção de NO pela adição de inibidor ou captador de NO (Figura 4.5 A-D).

No entanto, para *L. monocytogenes* ATCC 19115, foi observada uma maior quantidade de nitrito no meio de cultura quando houve adição de pequenas quantidades de C-PTIO (12,5 e 25 μ M) em comparação com o controle. Isso pode indicar que não houve inibição da produção de NO, e pelo contrário, pode ter ocorrido super estimulação de outra via de produção de NO (Figura 4.5 D).

Figura 4.5 Quantificação de nitrito pelo método de Griess, nos meios de cultivo de *L. monocytogenes* IAL 633 (A e B) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (C e D) por 24h a 25°C, com adição de diferentes concentrações do doador de NO, SNP (A e C) e dos inibidores de NO, os compostos L-NAME e C-PTIO (B e D). Diferença estatística significativa quando comparado com o controle *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

A partir da cultura de *L. monocytogenes* obtida de incubação por 1, 4 e 8 dias a 25°C em microplacas de poliestireno, foi realizada quantificação de nitrito. A

concentração de nitrito em culturas de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) em diferentes períodos de incubação não foi alterada, exceto para *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) com um dia de incubação que apresentou um pequeno aumento na concentração de nitrito em comparação com o controle (caldo BHI), $P < 0,01$. Assim, o maior tempo de incubação de *L. monocytogenes* não favoreceu o aumento da produção de NO (Figura 4.6).

A maior concentração de nitrito encontrada em culturas de *L. monocytogenes* cultivadas por 24h com adição de NO exógeno foi de 1000 a 1500 μM , independentemente da concentração do doador de NO presente no meio. Enquanto, que o valor de nitrito em culturas de *L. monocytogenes* sem adição de NO exógeno (cerca de 10 a 30 μM) foi menor mesmo com o tempo de incubação prolongado (até 8 dias).

A presença de nitratos e nitritos no meio de cultivo pode indicar a presença de NO e de outras moléculas de nitrogênio reativo, uma vez que o tempo de vida do NO no meio é de poucos segundos (BOXHAMMER et al., 2012; SAGIN et al., 2004).

Figura 4.6. Resultados da quantificação de nitrito pelo método de Griess, no sobrenadante de cultivo de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) por 1, 4 e 8 dias a 25°C por método espectrofotométrico com reagente de Griess. Lm = *L. monocytogenes*. Diferença estatística significativa quando comparado com o controle (BHI) - *** $P < 0,001$.

4.3.4 Enumeração de células aderidas de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas após tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico

Células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 e ATCC 19115 em aço inoxidável por 4 e 8 dias após adição de SNP, L-NAME e C-PTIO, apresentaram números de células similares do controle sem tratamento com doador ou inibidores de NO. Exceto para *L. monocytogenes* ATCC 19115 aderida por 8 dias no aço inox e tratadas com captador de óxido nítrico (C-PTIO), houve redução de aproximadamente 1 log UFC/cm² ($P < 0,01$), em comparação com o controle (Figura 4.7).

Figura 4.7. Células aderidas de (A) *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e (B) *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) em superfície de aço inoxidável por 4 e 8 dias a 25°C tratadas com doador (SNP) e de inibidores de óxido nítrico (L-NAME e C-PTIO) por 1h a 25°C. Lm = *L. monocytogenes*. Diferença estatística significativa ** $P < 0,01$.

Esses resultados sugerem que não houve maior adesão e nem dispersão de células de *L. monocytogenes* em aço inoxidável na presença de SNP, L-NAME e C-PTIO. Controversamente, Zaitseva et al. (2009), observaram que em estudos em microplacas de poliestireno, a partir de 100 µg/mL de SNP adicionado ao meio de cultura, as células de biofilme de *P. aeruginosa* foram inibidas e, que em concentrações sub-inibitórias de SNP, houve aumento da biomassa do biofilme, principalmente em concentrações intermediárias de SNP (25 a 50 µg/mL).

Schreiber et al. (2011) demonstraram que a dispersão de células de biofilmes obtidos em microplacas e películas em ágar de *Bacillus subtilis* foi maior no mutante deletado para o gene *nos* e para a cepa selvagem cultivada na presença de inibidores de NO (L-NAME). Foi evidenciada naquele trabalho uma dispersão quatro vezes maior em culturas na presença de sequestrador de NO (C-PTIO), sugerindo que o envolvimento da enzima óxido nítrico sintase na manutenção do biofilme.

Barraud et al. (2009b) examinaram os efeitos de NO em vários biofilmes de significância clínica e industrial e, observaram que doadores de NO induziram a dispersão e reduziram a formação de biofilmes por *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Staphylococcus epidermidis*.

Diferentemente de nossos resultados para biofilmes de *L. monocytogenes*, Barnes et al. (2013), observaram uma significativa redução da biomassa do biofilme de *P. aeruginosa* após exposição a SNP (80 µmol/L), mas o tempo de tratamento foi maior (12h), sugerindo que a liberação de NO a partir de SNP pode ser lenta.

4.3.5 Avaliação da arquitetura de biofilmes de *L. monocytogenes* após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico

De acordo com as imagens adquiridas por microscópio de fluorescência (Figuras 4.8 e 4.9), as células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) por 4 e 8 dias em aço inoxidável, tratadas com SNP, L-NAME e C-PTIO apresentaram disposição semelhante ao controle (tratado com água purificada esterilizada). Houve predomínio de células individuais viáveis (verde) e raras células danificadas (vermelho), exceto para *L. monocytogenes* IAL 633 aderida por 4 dias e tratada com C-PTIO, que apresentou predomínio de células mortas (Figura 4.8 G). Mesmo neste caso, após 8 dias houve aumento no número de células aderidas viáveis (Figura 4.8 H).

Nas observações por microscopia de fluorescência, para *L. monocytogenes* ATCC 19115 em 4 e 8 dias, havia menor densidade de células aderidas após os tratamentos com SNP, L-NAME e C-PTIO quando comparada com o controle, principalmente para as células com maior tempo de cultivo (8 dias), como observado na Figura 4.9. Para *L. monocytogenes* IAL 633, também foi observada menor densidade de células na superfície após 8 dias de incubação, no tratamento com SNP (Figura 4.8). Apesar disso, não foi possível afirmar que o doador de NO ou os inibidores de NO possam ter aumentado a dispersão de células aderidas de *L. monocytogenes*, devido a presença de pequeno número de células individuais também no controle (tratamento com água esterilizada).

Foi observado que os tratamentos com SNP, L-NAME e C-PTIO, não erradicaram as células aderidas de *L. monocytoneges* da superfície de aço inoxidável apesar do número reduzido de células presentes, o que foi confirmado

também pela enumeração em ágar de células aderidas em aço inoxidável (UFC/cm²), que mantiveram populações semelhantes ao controle (tratado com água esterilizada). Cabe lembrar ainda que não foi possível determinar a CIM desses compostos frente a células planctônicas de *L. monocytogenes*.

Schreiber et al. (2011), em observações microscópicas e com técnica de cultivo também observaram que não houve alteração na formação e na estrutura de biofilmes de *Bacillus subtilis* pela adição de inibidores de NOS, adição de NO exógeno, ou adição de captador de NO. Contudo, de maneira diversa do que foi observado no presente trabalho com biofilmes de *L. monocytogenes*, Schreiber et al. (2011) relataram aumento da dispersão das células de *B. subtilis* na presença de inibidores de NOS.

Falsetta et al. (2009), observaram que biofilmes de *Neisseria gonorrhoeae* formados em superfícies de vidro e de plástico por 24h (sem tratamento) e tratados com concentrações sub-letais de NO (SNP 500 nM) e incubados por 24h adicionais, não apresentaram diferença aparente na biomassa e espessura, em comparação com o biofilme controle (24h sem tratamento), sugerindo que a adição de SNP em biofilme de 24h, paralisa o desenvolvimento do biofilme devido ao acúmulo de NO. Estes resultados foram confirmados pela adição simultânea de doador de NO (SNP) e captador de NO (C-PTIO) nos biofilmes de *N. gonorrhoeae*.

Barraud et al. (2006), expuseram biofilmes de *P. aeruginosa* formados por um dia à concentração subletal de 500 nM de SNP por 24h, resultando na dispersão de células da superfície (80% de redução da população), controversamente a nossos resultados com biofilmes de *L. monocytogenes*. Contudo, de modo semelhante ao presente trabalho, aqueles autores observaram que as bactérias remanescentes na superfície após o tratamento com SNP apresentaram alta viabilidade.

Barraud et al. (2009b), observaram através de imagens de microscopia que biofilmes multi-espécies estabelecidos em um sistema de água após o tratamento com SNP (100 e 500 nM) por 18h, apresentaram redução no tamanho das microcolônias, indicando a ocorrência de eventos de dispersão.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho relativos aos experimentos com doador e inibidores de NO permitem concluir que o emprego desses compostos mesmo em altas concentrações, no tratamento por 1h, não afetaram a dispersão de biofilmes maduros de *L. monocytogenes* (4 e 8 dias). Além disso, as células planctônicas de *L. monocytogenes* foram expostas aos mesmos compostos por um período maior (24h de exposição) e não houve inibição.

Figura 4.8. Células aderidas de *L. monocytogenes* IAL 633 (1/2a) em aço inoxidável por 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) tratadas por 1h com SNP (C e D), L-NAME (E e F), C-PTIO (G e H), e sem tratamento (controle – A e B). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência com ocular de 10x e na objetiva de 20x. As células coradas com SYTO 9 em verde fluorescente e com iodeto de propídeo em vermelho fluorescente. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 µm.

Figura 4.9. Células aderidas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 (4b) em aço inoxidável por 4 dias (A, C, E e G) e 8 dias (B, D, F e H) tratadas por 1h com SNP (C e D), L-NAME (E e F), C-PTIO (G e H), e sem tratamento (controle – A e B). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência com ocular de 10x e na objetiva de 20x. As células coradas com SYTO 9 em verde fluorescente e com iodeto de propídeo em vermelho fluorescente. Esses experimentos foram repetidos por duas vezes e são mostrados resultados representativos. Escala = 10 µm.

4.3.6 Análise de expressão gênica em biofilmes pré-formados e culturas planctônicas de *L. monocytogenes* após o tratamento com doador e inibidores de óxido nítrico

Os resultados da enumeração de células aderidas de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável por 8 dias a 25°C, após os tratamentos com SNP, L-NAME e C-PTIO foram cerca de 10^5 - 10^6 UFC/cm² similares às populações de células aderidas de *L. monocytogenes* sem tratamento (controle).

Apesar da grande quantidade de células viáveis de *L. monocytogenes* aderidas na superfície de aço inoxidável (10^5 - 10^6 UFC/cm²), com ou sem tratamento com doador e inibidores de NO, a extração de RNA total dessas amostras foi ineficaz. Mesmo após o tratamento com a enzima DNase seguida da extração com fenol-clorofórmio para remoção de resíduos de DNA, as amostras de RNA foram insuficientes (< 100 ng/μL) com cerca de 65 ng/μL e com a pureza de RNA inadequada, com valor de aproximadamente 1,4, tanto para contaminação de proteínas (razão 260/280 nm) quanto para contaminação com polissacarídeos e fenóis (razão 260/230 nm), estando abaixo do valor considerado satisfatório que seria acima de 1,8.

Uma explicação para o baixo rendimento de RNA total extraído das amostras de biofilme no presente trabalho, é que a presença de componentes da matriz extracelular do biofilme pode ter dificultado a lise celular e, que os ácidos nucleicos purificados também poderiam conter contaminação residual interferente na quantificação de RNA.

França, Melo e Cerca (2011), demonstraram que amostras de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* poderiam conter alto conteúdo extracelular de polissacarídeos e proteínas e, interferindo na quantificação de RNA. França, Bento e Cerca (2012) demonstraram que para biofilmes de *L. monocytogenes* a qualidade do RNA extraído poderia interferir na quantificação do RNA mensageiro (RNAm).

O RNA extraído geralmente é composto por 1-5% de RNAm, sendo o restante composto por RNA ribossômico e RNA transportador. Além disso, o RNAm é altamente instável (meia-vida de poucos minutos) e, quando o rendimento do RNA total é muito baixo, alguns RNAm específicos podem ser perdidos. Além disso, quando o objetivo do experimento é detectar genes que apresentam baixa

expressão, um pequeno rendimento da extração de RNA pode fornecer esses genes em quantidades abaixo do limite de detecção (FRANÇA, BENTO, CERCA, 2012).

Desse modo, os resultados apresentados neste trabalho foram referentes à análise de expressão gênica de células planctônicas que estavam presentes no meio de cultivo em que estava imerso o disco de aço inoxidável, por 8 dias a 25°C. Conforme descrito anteriormente no item material e métodos deste capítulo, os discos de aço inoxidável foram lavados e transferidos para um novo poço da microplaca após cada troca de meio de cultura (com 3h e 4 dias), sendo que essas células planctônicas presentes no meio de cultivo com 8 dias de incubação, provavelmente são células provenientes da superfície de aço inoxidável que se desprenderam ao longo do tempo de incubação.

O número de células planctônicas de ambas as cepas de *L. monocytogenes* cultivadas por 8 dias e, em seguida tratadas com SNP, L-NAME e C-PTIO apresentaram valores similares aos do controle (*L. monocytogenes* cultivada por 8 dias e tratada apenas com água purificada esterilizada), com cerca de 9 log UFC/mL.

De acordo com a figura 4.10, foi observado que *L. monocytogenes* IAL 633 apresentou os níveis de expressão para os genes *PrfA*, *Lmo1485* e *Lmo0807* similares ao controle, ou seja, não houve mudança na expressão desses genes após tratamento com SNP (suposta indutor de estresse nitrosativo), L-NAME e C-PTIO (inibidores de NO).

L. monocytogenes ATCC 19115 não apresentou mudanças na expressão dos genes *PrfA*, *Lmo0990* e *Lmo0807* após o tratamento com SNP, L-NAME e C-PTIO comparados com o controle ($P > 0,05$), como mostra a Figura 4.10. O gene *Lmo1485* foi testado para *L. monocytogenes* ATCC 19115, mas não foi detectada expressão desse gene no controle, nem nas amostras tratadas.

Nossos resultados estão em parte de acordo o trabalho publicado por Mraheil et al. (2011) que também não observaram alteração na expressão do gene *Lmo0990* e *Lmo1485* em *L. monocytogenes* EGD-e na sua fase exponencial de crescimento em caldo BHI, quando incubada por 2h na presença do doador de NO, espermina nonoato (250 μ M). Entretanto, diferentemente dos nossos resultados, aqueles autores demonstraram que a expressão do gene codificante do ABC transporter (*Lmo0807*) foi aumentada quando *L. monocytogenes* EGD-e foi incubada com 0,05% de peróxido de hidrogênio, 5% de etanol ou 250 μ M de espermina nonoato

(doador de NO), sendo o maior efeito alcançado na presença do doador de NO, indicando segundo aqueles autores que *Lmo0807* parece desempenhar um importante papel na resistência ao estresse em geral e especialmente para o estresse nitrosativo em *L. monocytogenes*.

Nossos resultados demonstraram que para o gene *Lmo0990* houve uma redução no nível de expressão após o tratamento com SNP, L-NAME e C-PTIO comparado com o controle, demonstrando que tanto a indução de estresse nitrosativo por SNP como a remoção de NO do meio (pelo captador de NO, C-PTIO ou pelo inibidor de NO sintase, L-NAME) provocaram alterações similares na expressão desse gene em células planctônicas de *L. monocytogenes* IAL 633 (Figura 4.10). Esses resultados com *L. monocytogenes* IAL 633 sugerem que altas concentrações de NO bem como remoção da pequena quantidade de NO intrínseco do cultivo pode sensibilizar o mesmo mecanismo regulatório.

Vareille et al. (2007) demonstraram que existe um sensor de óxido nítrico em *Escherichia coli* O157:H7 capaz de ativar inibição de óxido nítrico e, inibir a síntese da toxina Shiga, sem alterar a viabilidade bacteriana. Os sensores de NO, como por exemplo o repressor sensível a nitrito, são reguladores chave do estresse nitrosativo em enterobactérias, sendo ativados na presença de NO, o que permite que a célula responda rapidamente ao estresse induzido por NO (BUSH et al., 2011; RODIONOV et al., 2005).

No presente trabalho, não foi observada mudança na expressão gênica de *PrfA* nos tratamentos com SNP, L-NAME e C-PTIO para ambas as cepas de *L. monocytogenes* (Figura 4.10). Isso indica que a presença de NO exógeno (SNP, doador de NO), ou seja, indução de estresse nitrosativo, não interfere na expressão desse gene regulador da expressão de genes de virulência e de formação de biofilme.

Makino et al. (2005), compararam por meio da técnica de PCR em tempo real, o nível de expressão dos genes *PrfA* e *hly* em células de *L. monocytogenes* pré-cultivadas em caldo BHI e incubadas por 60 min com peróxido de hidrogênio (5 mM), ou com substâncias doadoras de RNI como S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP - 0,1 mM) ou (±)-(E)-4-Etil-2-[(E)-hidroxiimino]-5-nitro-3-hexenamida (NOR3 - 0,1 mM) que são doadores de NO, ou 3-morfolino-sidnonimino HCl (SIN-1 - 0,1 mM) que é doador de peroxinitrito. Esses autores verificaram que a maior expressão de *PrfA* e *hly* ocorreu quando *Listeria* foi estimulada com peróxido de hidrogênio e, que

os doadores de RNI, SNAP e NOR3, foram menos efetivos para induzir a expressão desses genes, sugerindo um aumento da expressão gênica de *L. monocytogenes* dentro de macrófagos ativado foi devido aos ROI gerados.

Nossos resultados indicaram que a indução de estresse nitrosativo em biofilmes maduros de 8 dias de *L. monocytogenes* formados em superfície de aço inoxidável, não apresentou alterações em genes relacionados com estresse oxidativo e nitrosativo nem no gene relacionado com regulação da virulência e formação do biofilme.

Figura 4.10. Resultados da quantificação de RNAm em culturas de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) expostas a doador (SNP) e inibidores de NO (L-NAME e C-PTIO). Os genes estudados referiam-se à resposta ao estresse oxidativo e nitrosativo em bactérias. Os níveis de expressão foram quantificados por PCR em tempo real pela síntese de DNA complementar (DNAC) a partir do RNA extraído das células. O RNAm quantificado foi normalizado para a quantidade de RNAr 16S da mesma cultura. As linhas pontilhadas indicam a taxa de expressão de 1 (sem alteração). Para diferença estatística significativa foram comparados os valores (SNP, L-NAME, C-PTIO) de cada gene com os valores obtidos do controle. *P<0,05.

4.4 Conclusões

Nossos resultados indicam que:

- Biofilmes maduros de *L. monocytogenes* formados por 4 e 8 dias em superfície de vidro apresentaram moléculas intermediárias de nitrogênio reativo, enquanto que em superfície de aço inoxidável foram detectadas moléculas intermediárias de nitrogênio e de oxigênio reativos. É provável que essa diferença seja principalmente devido à diferença de aeração dos sistemas de cultivo.

- O aumento do tempo de cultivo de *L. monocytogenes* de 4 para 8 dias não aumentou a quantidade de nitrito presente no meio, indicando que no caso de biofilmes de *L. monocytogenes*, o papel do NO na dispersão de biofilmes maduros não é evidente.

- Doadores e inibidores de NO não demonstraram nem efeito inibitório nem protetor para as células planctônicas ou células aderidas de *L. monocytogenes* em aço inoxidável por 4 e 8 dias.

- O estresse nitrosativo estudado por meio de doador de NO bem como a remoção de NO (por meio de captador ou inibidor) não alterou o nível de expressão dos genes relacionados com estresse oxidativo e nitrosativo como *Lmo1485*, *Lmo0990* e *Lmo0807* e do gene regulador dos genes de virulência e da formação de biofilme *PrfA*, em culturas de 8 de *L. monocytogenes*.

Considerações Finais

Considerações Finais

L. monocytogenes IAL 633 (sorotipo 1/2a) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (sorotipo 4b) foram capazes de aderir e persistir por até 8 dias em diferentes superfícies abióticas como aço inoxidável, poliestireno e vidro. Ambas as cepas de *L. monocytogenes* formaram um biofilme pouco espesso e irregular, independentemente do tempo de incubação (1, 4 ou 8 dias), indicando que o aumento do tempo de formação do biofilme de *L. monocytogenes* não favoreceu o aumento da biomassa.

Na superfície de aço inoxidável, houve predomínio de células individuais com produção de EPS e, diferentemente, na superfície de vidro, foi observado maior número de células aderidas e agrupadas, ficando bem evidente a formação de uma estrutura semelhante a “favo de mel” contendo canais de água e produção de EPS e, com cavidades de diferentes tamanhos, indicando processos de dispersão e morte celular.

As células planctônicas de *L. monocytogenes* foram mais sensíveis à ação do OE de capim-limão do que ao OE de gengibre, e mais sensíveis à ação do sanitizante à base de óleo de coco babaçu em comparação com o sanitizante à base de dióxido de cloro. Os resultados revelaram que entre os OEs e os sanitizantes comerciais, o OE de capim-limão e o sanitizante a base de óleo de coco babaçu foram os tratamentos mais eficazes na remoção de células de *L. monocytogenes* dos biofilmes de 4 e 8 dias formados em superfícies abióticas, e a combinação do OE e sanitizante comercial foram também efetivos, demonstrando sinergismo.

Biofilmes maduros de *L. monocytogenes* formados por 4 dias e 8 dias em superfície de vidro apresentaram moléculas intermediárias de nitrogênio reativo, enquanto que em superfície de aço inoxidável foram detectadas moléculas intermediárias de nitrogênio e de oxigênio reativo. É provável que essa diferença seja principalmente devido à aeração dos sistemas de cultivo. O aumento do tempo de cultivo de *L. monocytogenes* de 4 para 8 dias não aumentou a quantidade de nitrito presente no meio, indicando que no caso de *L. monocytogenes*, o papel do NO na dispersão de biofilmes maduros não é evidente.

O doador de NO, SNP, e os inibidores de NO, L-NAME e C-PTIO, não demonstraram efeito inibitório nem protetor para as células planctônicas ou células aderidas de *L. monocytogenes* em aço inoxidável por 4 e 8 dias. O estresse

nitrosativo estudado por meio de doador de NO bem como a remoção de NO (por meio de captador ou inibidores) não alterou o nível de expressão dos genes relacionados com estresse oxidativo e nitrosativo (*Lmo1485*, *Lmo0990* e *Lmo0807*) e nem do gene regulador da expressão dos genes de virulência e de formação de biofilme (*PrfA*), em culturas de *L. monocytogenes* de 8 dias.

Em conclusão, *L. monocytogenes* formou biofilme com estruturas bem definidas que podem contribuir para a sobrevivência e disseminação da bactéria no ambiente de processamento de alimentos. Apesar de *L. monocytogenes* não formar um biofilme espesso com multicamadas, as células aderidas apresentam geralmente maior resistência à ação dos antimicrobianos em comparação com as células planctônicas, conseguindo sobreviver e persistir na superfície, com mecanismos regulatórios bastante eficientes frente a diferentes tipos de estresse.

Referências

Referências

ADAMS, R. P. **Identification oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 468p.

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1217-1227, 2012.

ALLESEN-HOLM M. et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1114-1128, 2006.

ALVES, V. F. et al. Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. **Journal of Food Protection**, v. 68, n.10, p. 2068-2077, 2005.

AMALARADJOU, M. A. R.; NORRIS, C. E.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of octenidine hydrochloride on planktonic cells and biofilms of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4089-4092, 2009.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 833-838, 1998.

ANDRADE, M. P. et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ARAÚJO, P. C. C. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 1, p. 19-25, 2002.

ARAÚJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, p. 481-488, 2011.

ATANASSOVA, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 860-864, 2008.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2009.

BAE, Y. M.; BAEK, S. Y.; LEE, S. Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 465-473, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARNES, R. J. et al. Optimal dosing regimen of nitric oxide donor compounds for the reduction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and isolates from wastewater membranes. **Biofouling**, v. 29, n. 2, p. 203-212, 2013.

BARRAUD, N. et al. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p. 7344-7353, 2006.

BARRAUD et al. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7333-7342, 2009a.

BARRAUD, N. et al. Nitric oxide-mediated dispersal in single and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 3, pp. 370-378, 2009b.

BELESSI, C. E. A. et al. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. S46-S52, 2011a.

BELESSI, C. E. A. et al. Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. S53-S60, 2011b.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 29, p. 886-895, 2009.

BONSAGLIA, E. C. R. et al. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, p. 386-391, 2014.

BORTOLUSSI, M. Listeriosis: a primer. **Canadian Medical Association Journal**, v. 179, n. 8, p. 795-797, 2008.

BOXHAMMER, V. et al. Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution. **New Journal of Physics**, v. 14, p. 1-18, 2012.

BRIDIER, A. et. al. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, p. 64-70, 2010.

BRYERS, J. D.; RATNER, B. D. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, v. 70, p. 232-237, 2004.

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

BUSH, M. et al. Transcriptional regulation by the dedicated nitric oxide sensor, NorR: a route towards NO detoxification. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 289-293, 2011.

CABEDO, L.; BARROT, L. P.; CANELLES, A. T. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 855-859, 2008.

CARPENTIER, B.; CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 111-122, 2004.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103-111, 2000.

CHAVANT, P. et al. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 728-737, 2002.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; HÉBRAUD, M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 241-248, 2004.

CHOI, N. Y. et al. Efficacy of aerosolized hydrogen peroxide-based sanitizer on the reduction of pathogenic bacteria on a stainless steel surface. **Food Control**, v. 27, p. 57-63, 2012.

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1586-1596, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard — Ed. 6^a. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). v. 23, n. 2, 2003.

COLE, C. et al. Nitric oxide increases susceptibility of Toll-like receptor-activated macrophages to spreading *Listeria monocytogenes*. **Immunity**, v. 36, p. 807-820, 2012.

COMBROUSE, T. et al. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1120-1131, 2013.

CRUZ, C. D.; FLETCHER, G. C. Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 26, p. 194-199, 2012.

DAS, T. et al. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 10, p. 3405-3408, 2010.

DEN BAKKER, H. C. et al. Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatic* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparica* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1882-1889, 2014.

DESAI, M. A. et al. Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 7, p. 1332-1337, 2012.

DI BONAVENTURA, G. et al. Influence of temperature on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2950-2958, 2002.

DONG, B. et al. Generation of antifouling layers on stainless steel surfaces by plasma-enhanced crosslinking of polyethylene glycol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 97, p. 485-497, 2005.

DONG, Y. H.; WANG, L. H.; ZHANG, L. H. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 362, p. 1201-1211, 2007.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DREVETS, D. A.; BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, p. 151-165, 2008.

DYNES, J. J. et al. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 163-178, 2009.

ECKHART, L. et al. DNase1L2 supresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **British Journal of Dermatology**, v. 156, p. 1342-1345, 2007.

FALSETTA, M. L. et al. Transcriptional profiling identifies the metabolic phenotype of gonococcal biofilms. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3522-3532, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Edição IV, parte II, 1º-5º fascículos, 1996-2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 182f.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 126-129, 2006.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010

FRANÇA, A.; MELO, L. D. R.; CERCA, N. Comparison of RNA extraction methods from biofilm samples of *Staphylococcus epidermidis*. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 572-576, 2011.

FRANÇA, A.; BENTO, J. C.; CERCA, N. Variability of RNA quality extracted from biofilms of foodborne pathogens using diferente kits impacts mRNA quantification by qPCR. **Current Microbiology**, v. 65, p. 54-59, 2012.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 227-238, 2010.

FREITAG, N. E.; PORT, G.; MINER, M. D. *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 623-628, 2009.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. J. E. The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v. 23, p. 747-752, 2006.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. et al. Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 17-26, 2009.

GRAM, L. ET al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 1165-1171, 2007.

GUNDUZ, G. T.; TUNCEL, G. Biofilm formation in an ice cream plant. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 329-336, 2006.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 7-10, 2005.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 591-595, p. 1998.

HARMSSEN, M. et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2271-2279, 2010.

HARRISON, J. J. et al. Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. **American Scientist**, v. 93, p. 508-515, 2005.

HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v. 24, p. 380-392, 2007.

HERBERT, K. C.; FOSTER, S. J. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel compounds. **Microbiology**, v. 147, p. 2275-2284, 2001.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

HUANG, Y. et al. Mutations in *gltB* and *gltC* reduce oxidative stress tolerance and biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 223-230, 2013.

IBUSQUIZA, P. S. et al. Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. **Food Control**, v. 25, p. 202-210, 2012.

JADHAV, S. et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125-130, 2013.

JANSSON, E.; LINDBLAD, P. Cloning and molecular characterization of a presumptive *argF*, a structural gene encoding ornithine carbamoyl transferase (OCT), in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. **Physiologia Plantarum**, v. 103, p. 347-353, 1998.

JOANNOU, C. L. et al. Characterization of the bactericidal effects of sodium nitroprusside and other pentacyanonitrosyl complexes on the food spoilage bacterium *Clostridium sporogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, v. 64, n. 9, p. 3195-3201.

JOSEPH, B.; GOEBEL, W. Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1188-1195, 2007.

JOSHI, S. G. et al. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. **American Journal of Infection Control**, v. 38, p. 293-301, 2010.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 459-471, 2005.

KALMOKOFF, M. L. et al. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 725-734, 2001.

KADAM, S. R. et al. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, p. 259-264, 2013.

KANDHAI, M. C. et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **The Lancet**, v. 363, p. 39-40, 2004.

KAPLAN, J. B. et al. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2633-2636, 2004.

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 205-218, 2010.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310-347, 2009.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 1811-1829, 2002.

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 249-258, 2006.

KIM, Y. J.; KIM, M. H.; SONG, K. B. Efficacy of aqueous chlorine dioxide and fumaric acid for inactivating pre-existing microorganisms and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on broccoli sprouts. **Food Control**, v. 20, p. 1002-1005, 2009.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

LEADBETTER, J. R.; GREENBERG, E. P. Metabolism of Acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, p. 6921-6926, 2000.

LEONARD, C. M. et al. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 676-680, 2010.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1186-1191, 1995.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 594-605, 2000.

LIU, P.; HUANG, Q.; CHEN, W. Heterologous expression of bacterial nitric oxide synthase gene: a potential biological method to control biofilm development in the environment. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 336-344, 2012.

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.

LUO, Q. et al. PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*. **Current Microbiology**, v. 67, p. 372-378, 2013.

MAH, C. THIEN-FAH; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 34-39, 2001.

MAKINO, M. et al. Involvement of reactive oxygen intermediate in the enhanced expression of virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* inside activated macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 8, p. 805-811, 2005.

MANN, E. E. et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5822, 2009.

MARSH, E. J.; LUO, H.; ; WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 203-210, 2003.

MARTINS, L. A.; GERMANO, P. M. L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v. 22, p. 297-302, 2011.

MARVASI, M. et al. Systematic analysis of the ability of nitric oxide donors to dislodge biofilms formed by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. **AMB Express**, v. 4, p. 42-52, 2014.

MAYAUD, L. et al. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 167-173, 2008.

MCDUGALD, D. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 39-50, 2012.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 249-253, 2003.

MEYLHEUC, T. et al. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, p. 128-137, 2006.

MINEI, C. C. et al. Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 3, p. 634-638, 2008.

MIRANDA, J. E. A. et al. Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 315, p. 23-29, 2011.

MOLECULAR PROBES. Disponível em: < <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/>>. Acesso em: 08 de julho de 2014.

MONK, I. R. et al. Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: biological significance of rough colony isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6686-6694, 2004.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, p. 107-121, 2004.

MRAHEIL, M. A. et al. Adaptation of *Listeria monocytogenes* to oxidative and nitrosative stress in IFN- γ -activated macrophages. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 547-555, 2011.

NI, N. et al. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. **Medical Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 65-124, 2009.

NILSSON, R. E.; ROSS, T.; BOWMAN, J. P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 14-24, 2011.

NITSCKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 576-582, 1999.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 320-324, 2001.

NOSTRO, A. et al. Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. **Applied Microbiology Technology**, v. 87, p. 729-737, 2010.

OGAWA, R. et al. Comparison of control of *Listeria* by nitric oxide redox chemistry from murine macrophages and NO donors: insights into listeriocidal activity of oxidative and nitrosative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 3, p. 268-276, 2001.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p. 549-553, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 809-818, 2012.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 357-365, 2013.

ORSI, R. H.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 79-96, 2011.

PAN, Y.; BREIDT, F. J.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7711-7717.

PAO, S. et al. Microbial quality of raw aquacultured fish fillets procured from internet and local retail markets. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1544-1549, 2008.

PAUL, D. et al. Application of quorum quenching to inhibit biofilm formation. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 8, p. 1319-1323, 2009.

PÉREZ-CONESA, D. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 1, p. 55-62, 2011.

PETERSEN, F. C.; TAO, L.; SCHEIE, A. A. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4392-4400, 2005.

PLEITNER, A. M. et al. Transcriptional and phenotypic responses of *Listeria monocytogenes* to chlorine dioxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2951-2963, 2014.

QIN, Z. et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 153, p. 2083-2092, 2007.

RATTI, R. P. ***Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia, Área Biociências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHIERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S29-S42, 2010.

RIEU, A. et al. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: No mushrooms but a network of knitted chains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4491-4497, 2008.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 197-209, 2000.

RODIONOV, D. A. et al. Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 5, p. 415-431, 2005.

RODRIGUES, D. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, p. 181-189, 2011.

RODRIGUEZ, A.; AUTIO, W. R.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 170-175, 2008.

SAGIN, F. G. et al. Link between monoamine oxidase and nitric oxide. **NeuroToxicology**, v.25, p. 91-99, 2004.

SAKATE, R. I. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v.53, n.2, 2003.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1989.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The effect of five common essential oil componentes on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 1070-1075, 2008.

SÃO JOSÉ, J. F.; VANETTI, M. C. D. Effect of ultrasound and comercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, p. 95-99, 2012.

SCHOOLING, S. R.; HUBLEY, A.; BEVERIDGE, T. J. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 4097- 4102, 2009.

SCHREIBER, F. et al. The role of nitricj-oxide-synthase-derived nitric oxide in multicellular traits of *Bacillus subtilis* 3610: biofilm formation, swarming, and dispersal. **BMC Microbiology**, v.11, n. 111, p. 1-11, 2011.

SHATALIN, K. et al. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. **PNAS**, v. 105, n. 3, p. 1009-1013, 2008.

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

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/> >. Acesso em: 08 de julho de 2014.

SILVA, W. P. et al. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.911-916, 2004.

SILVA, S. et al. Adhesion to and viabiliaty of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1379-1385, 2008.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergente biofilm control strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIVASOTHY, Y. et al. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 124, p. 514-517, 2011.

SOUZA, V. M. et al. Survey of *Listeria* spp. in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. **Food Control**, v. 19, p. 1011-1013, 2008.

SPOERING, A. L.; GILMORE, M. S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 133-137, 2006.

STEINBERGER, R. E.; HOLDEN, P. A. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5404-5410, 2005

SUDHAMSU, J.; CRANE, B. R. Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 5, 2009.

SUE, D.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. σ^B -dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *Imo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v. 149, p. 3247-3256, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STEPANOVIC, S. et al. plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.

TEIXEIRA, P. et al. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1239-1244, 2008.

TETZ, G. V.; ARTEMENKO, N. K.; TETZ, V. V. Effect of Dnase and antibiotics on biofilms characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1204-1209, 2009.

THONGSON, C. et al. Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 10, p. 2054-2058, 2005.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22, p. 1484-1490, 2011.

TRESSE, O. et al. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1569-1578, 2007.

TRINETTA, V. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat food processing equipment by chlorine dioxide gas. **Food Control**, v. 26, p. 357-362, 2012.

UPADHYAY, A. et al. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 36, p. 79-89, 2013.

VAID, R.; LINTON, R. H.; MORGAN, M. T. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. **Food Microbiology**, v. 27, p. 979-984, 2010.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7854-7860, 2010a.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. HrcA and DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v. 156, p. 3782-3790, 2010b.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117-1131, 2010.

VAN SORGE, N. M. et al. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6417-6426, 2013.

VAREILLE, M. et al. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 104, n. 24, p. 10199-10244, 2007.

VEROS PRODUTOS QUÍMICOS LTDA. Disponível em: < <http://www.veros.com.br/proces.php> >. Acesso em: 08 de julho de 2014.

VIATOR, R. J. et al. Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. **BMC Biochemistry**, v. 9, p. 15, 2009.

VILAIN, S. et al. DNA as an adhesion: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2861-2868, 2009.

WEBB, J. S. et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 15, p. 4585-4592, 2003.

WEBB, J. S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 578-585, 2003.

WEI, Y. et al. Insight into the catalytic mechanism of arginine deiminase: functional studies on the crucial sites. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 66, p. 740-750, 2007.

WERBROUCK, H. et al. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 306-314, 2007.

WHITCHURCH, C. B. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1487, 2002.

WINKELSTRÖTER, L. K. et al. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 22, p. 1404-1407, 2011.

WINKELSTRÖTER, L. K. et al. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 35-46, 2013.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rising and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 727-733, 1996.

WONG, A. C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2765-2770, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Disinfectants and disinfectant by-products**. Geneva, 2000.

WU, G.; JR. MORRIS, M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

WU, J.; XI, C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5390- 5395, 2009.

XIOUNG, Y.; LIU, Y. Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 825-837, 2010.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS Letters**, v. 468, p. 89-92, 2000.

YANG, L. et al. Combating biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, p. 1-12, 2011.

ZAITSEVA, J. et al. Effect of nitrofurans and NO generators on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Burkholderia cenocepacia* 370. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 353-357, 2009.

ZAMEER, F. Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EGD-e. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1143-1147, 2010.