

**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**

## 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<sub>ω</sub>-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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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.*

# 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, HARMSEN 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 hidrocloreto, 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<sup>®</sup>), 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<sup>®</sup>.

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 actinomycetemcomitans* 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 transcpcionais 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 ativado por interferon- $\gamma$ , 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 ativado, 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**

---

## 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 cm<sup>2</sup>, e observações em microscópio de fluorescência, incluindo quantificação de células viáveis em microscópio confocal a laser.

## 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**

---

### 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.

### 3.4 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**

---



## 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 (H<sub>2</sub>DCF-DA) que tem seus grupos acetatos removidos por esterases intracelulares e, então é oxidado em contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> (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*.

#### 4.4 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 *Cinnamomun zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agrônômica**, 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 diferente 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<sup>a</sup>. 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, 1<sup>o</sup>-5<sup>o</sup> 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.
- MCDOUGALD, 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- $\gamma$ -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.; MCLANDBOROUGH, 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 viabilitaty 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.  $\sigma^B$ -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 HOUTT, 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 potential 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.