

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO P34  
SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS GRAM-  
POSITIVAS E BIOFILME POLIMICROBIANO**

**GÉSSICA ARACÉLI COSTA**  
Bacharel em Biomedicina - UNIPAR

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Agosto de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO P34  
SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS GRAM-  
POSITIVAS E BIOFILME POLIMICROBIANO**

**GÉSSICA ARACÉLI COSTA**  
**Bacharel em Biomedicina - UNIPAR**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola e do  
Ambiente como um dos requisitos  
para a obtenção do Grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola  
e do Ambiente

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Amanda de Souza da Motta  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon  
Professor Colaborador: Adriano Brandelli

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Agosto de 2015.

## CIP - Catalogação na Publicação

Costa, Géssica Aracéli

Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre a formação de biofilmes de bactérias Gram-positivas e biofilme polimicrobiano / Géssica Aracéli Costa.-- 2015.  
125 f.

Orientadora: Amanda de Souza da Motta.  
Coorientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Biofilme. 2. Peptídeo Antimicrobiano P34. 3. Staphylococcus aureus. 4. Enterococcus faecalis. 5. biofilme polimicrobiano. I. Motta, Amanda de Souza da, orient. II. Frazzon, Ana Paula Guedes, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, coragem e por iluminar meu caminho todos os dias.

Quero agradecer a todos aqueles que fizeram parte da realização deste trabalho, que direta ou indiretamente me ajudaram nesta conquista, incentivando-me com carinho, bom humor e amor, ao longo desta etapa de crescimento profissional e pessoal. Por isso, dedico e agradeço:

À minha família, em especial, à minha mãe **Roselei**, pelo incentivo, carinho, amor incondicional e por ser meu orgulho e exemplo.

Ao meu noivo **Taison**, por sempre me fazer acreditar na minha capacidade. Por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, demonstrando toda sua compreensão, apoio e amor.

Agradeço muito à minha orientadora, **Amanda Motta**, por ter me aceitado como sua primeira orientada de mestrado na UFRGS. Muito obrigada pela sua confiança, por ter sido sempre acessível e disposta a ajudar, sobretudo, por todos os ensinamentos compartilhados ao longo destes dois anos, sempre com carinho e bom humor.

À minha co-orientadora **Ana Paula Frazzon**, por me auxiliar neste trabalho, ensinando-me que para tudo há solução.

Às gurias do laboratório 164, em especial a **Fefe** e a **Carol**, pelas risadas, cafés e caminhadas. Agradeço por todas as palavras de incentivo, por compartilharmos tantas alegrias e frustrações, sobretudo, pela amizade que levarei para sempre.

Às gurias do 209, em especial a **Gabi**, pela parceria e amizade que iniciou na universidade e se estendeu-se fora dela. Obrigada por todos os bons momentos que dividimos, sempre com alegria e sabedoria.

Ao **Prof. Dr. Adriano Brandelli**, por abrir as portas de seu laboratório para a execução deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 218 do ICTA, em especial a **Aninha**, pela amizade, risadas e ótima companhia em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório **Gabi Albieiro**, **Renê**, **Marciéle**, **Ingrid**, **Karine**, e **Maya**, obrigada pela troca de conhecimento, convivência e apoio.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## **Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano p34 sobre a formação de biofilmes de bactérias Gram-positivas e biofilme polimicrobiano.**

Autor: Géssica Aracéli Costa<sup>1</sup>

Orientadora: Amanda de Souza Motta

Co-orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

### **RESUMO**

O peptídeo antimicrobiano P34, produzido por *Bacillus* sp. P34 é uma substância que vem sendo explorada por apresentar potencial antibacteriano e antiviral. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibiofilme deste composto frente aos biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* provenientes de alimentos. Foram realizadas avaliações frente a células planctônicas e sésseis, bem como, sobre os biofilmes formados por estas bactérias. Os resultados obtidos demonstram que a substância antimicrobiana possui capacidade em reduzir o percentual de células microbianas aderidas à superfície, não sendo verificada completa inibição do biofilme. Observou-se um percentual de inibição metabólica das células dos biofilmes dos isolados de *S. aureus*, porém, as células de *E. faecalis* apresentaram-se metabolicamente estimuladas. A associação do peptídeo antimicrobiano P34 com a bacteriocina nisina não apresentou efeito sinérgico sobre células de *S. aureus* F4-1, no entanto, ao ser avaliado individualmente, foi observado efeito bacteriostático sobre este isolado. Na avaliação do efeito deste composto sobre o biofilme polimicrobiano formado por *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Candida tropicalis* 72-A e *S. aureus* F4-1 em aço inoxidável tipo AISI 304, observou-se diferença na disposição celular e na arquitetura do biofilme, com diminuição da aderência de células leveduriformes. Na avaliação dos diferentes meios de cultura empregados, a presença de glicose mostra-se como um fator que promoveu um incremento na formação de biofilme de *Staphylococcus* sp. Os resultados obtidos indicam que a substância apresenta potencial antibiofilme para a espécie *S. aureus*, e fornecem informações para posteriores estudos sobre os biofilmes polimicrobianos.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (127 p.) Agosto, 2015.

## **Effect of the antimicrobial peptide P34 on biofilm formation by Gram-positive bacteria and polymicrobial biofilme**

Author: Géssica Aracéli Costa<sup>1</sup>

Supervisor: Amanda de Souza Motta

Co-supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon

### **ABSTRACT**

The antimicrobial peptide P34, produced by *Bacillus* sp. P34 is a substance that has been explored by having antibacterial and antiviral potential. The objective of this study was to evaluate the antibiofilm potential of this compound compared to biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* from food. Evaluations were carried out against planktonic and sessile cells, as well as on biofilms formed by these bacteria. The obtained results evidence that the antimicrobial substance has ability to reduce the percentage of adhered microbial cells to the surface, not being verified complete inhibition of the biofilm. Was observed a metabolic inhibition percentage of cells isolated in the biofilm of *S. aureus*, however, *E. faecalis* cells performed metabolically stimulated. The combination of antimicrobial peptide P34 with the nisin bacteriocin showed no synergistic effect on cells of *S. aureus* F4-1, however, when evaluated individually, bacteriostatic effect was observed on this isolated. In the evaluation of this compound effect on the polymicrobial biofilm formed by *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Candida tropicalis* 72-A and *S. aureus* F4-1 on stainless steel AISI 304, difference was observed in the cell layout and biofilm architecture, with reduced adhesion of yeast cells. The evaluation of different culture media used, the presence of glucose is presented as a factor that promoted an increment in the formation of *Staphylococcus* sp biofilms. The obtained results indicate that the substance presents antibiofilm potential for the *S. aureus* species, and provide information for further studies about polymicrobial biofilms.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agricultural Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (127 p.) August, 2015.

## SUMÁRIO

<b>RELAÇÃO DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RELAÇÃO DE FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Objetivo Geral .....	3
1.1.2 Objetivos Específicos .....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> sp.....	5
2.1.1 Espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
2.2 Gênero <i>Enterococcus</i> sp.....	10
2.2.1 Espécie <i>Enterococcus faecalis</i> .....	12
2.3 Biofilmes.....	14
2.4 Formação do biofilme .....	16
2.5 O impacto dos biofilmes na indústria de alimentos .....	19
2.6 Estratégia de controle de biofilmes .....	22
2.7 Peptídeo antimicrobiano P34 .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Microrganismos e condições de cultivo .....	27
3.1.1 Isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
3.1.2 Isolados de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	27
3.1.3 Cepa <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar Enteritidis ATCC 13076.....	28
3.1.4 Isolados de <i>Candida tropicalis</i> 72-A .....	28
3.2 Identificação genotípica de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	29
3.2.1 Extração de DNA.....	29
3.2.2 Identificação de <i>Enterococcus faecalis</i> por PCR .....	29

3.3	Avaliação da formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	30
3.4	Produção e purificação parcial do peptídeo antimicrobiano P34.....	32
3.5	Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34 contra células planctônicas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	33
3.6	Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34.....	33
3.6.1	Inibição da formação do biofilme .....	33
3.6.2	Erradicação do biofilme pré-formado .....	34
3.6.3	Quantificação da inibição do biofilme .....	35
3.7	Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes .....	35
3.8	Curva de crescimento do isolado <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 .....	36
3.9	Avaliação do efeito da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 sobre a cinética de crescimento do isolado <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 .....	37
3.10	Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas culturas <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 e <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 utilizadas no biofilme polimicrobiano .....	38
3.11	Avaliação da formação de biofilme do <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A em meio de cultura caldo de carne de frango.....	38
3.12	Cinética de crescimento dos isolados <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A, avaliados individualmente com o peptídeo antimicrobiano P34.....	39
3.13	Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista de <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A.....	41
3.14	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme polimicrobiano .....	42
3.15	Análise estatística .....	43
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	Isolados bacterianos .....	44
4.2	Identificação genotípica de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	44
4.3	Avaliação da formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	45



4.4	Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34 contra células planctônicas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	46
4.5	Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34.47	
4.5.1	Inibição da formação do biofilme .....	48
4.5.2	Erradicação do biofilme pré-formado.....	49
4.6	Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes .....	52
4.7	Curva de crescimento do isolado <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 .....	56
4.8	Avaliação do efeito da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 sobre o crescimento do isolado <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1.....	57
4.9	Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas culturas <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 e <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 utilizadas no biofilme polimicrobiano.....	58
4.10	Avaliação da formação de biofilme do <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A em meio de cultura caldo de carne de frango.....	59
4.11	Cinética de crescimento dos isolados <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A, avaliados individualmente com o peptídeo antimicrobiano P34.....	61
4.12	Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista de <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A.....	63
4.13	Microscopia Eletronica de Varredura do biofilme polimicrobiano .....	64
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
5.1	Formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	67
5.2	Atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34 contra células planctônicas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> ..	70
5.3	Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 e atividade metabólica dos biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .....	72
5.4	Avaliação do efeito da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 sobre o crescimento do isolado <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 .....	75

5.5	Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas culturas <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1 e <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 utilizadas no biofilme polimicrobiano .....	78
5.6	Avaliação da formação de biofilme do <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A em meio de cultura caldo de carne de frango .....	79
5.7	Cinética de crescimento dos isolados <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A, avaliados individualmente com o peptídeo antimicrobiano P34.....	81
5.8	Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista de <i>Staphylococcus aureus</i> F4-1, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Candida tropicalis</i> 72-A.....	84
5.9	Microscopia Eletronica de Varredura do biofilme polimicrobiano .....	86
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>92</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Origem do isolados de <i>Enterococcus faecalis</i> . .....	28
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeo iniciador utilizado nas reações de PCR para a espécie <i>Enterococcus faecalis</i> .....	30
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos isolados quanto à capacidade da formação de biofilme.....	46
<b>Tabela 4.</b> Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34.....	47
<b>Tabela 5.</b> Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 .....	52
<b>Tabela 6.</b> Avaliação da inibição da atividade metabólica dos biofilmes .....	55
<b>Tabela 7.</b> Avaliação da formação de biofilme em diferentes meios de cultura .....	61
<b>Tabela 8.</b> Cinética de crescimento do <i>S. aureus</i> F4-1, <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 e <i>C. tropicalis</i> 72-A, frente ao peptídeo antimicrobiano P34 no decorrer de 24 horas. ....	63
<b>Tabela 9.</b> Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista com <i>S. aureus</i> F4-1, <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 e <i>C. tropicalis</i> 72-A, em caldo BHI a 37°C no decorrer de 24 horas.....	64

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1.** Fases do desenvolvimento do biofilme (Breyes & Ratner, 2004)....17
- Figura 2.** Verificação da amplificação do produto de 475 pb em gel de agarose 1,5% com marcador molecular Ladder 100 pb (canaleta 1), isolados de *E. faecalis* (canaleta 2 a 12), controle negativo sem DNA (canaleta 13) e controle positivo com DNA extraído de *E. faecalis* ATCC 29212 (canaleta 14).....45
- Figura 3.** Curva de crescimento do isolado de *S. aureus* F4-1 monitorado durante 12 h em meio caldo BHI a 37°C.....56
- Figura 4.** Avaliação da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34, frente ao isolado *S. aureus* F4-1, no decorrer de 24 h em meio caldo BHI a 37°C. Para um mesmo tratamento, letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle positivo (C+) .....58
- Figura 5.** Verificação da produção de exopolissacarídeos em meio CRA. A) controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984, B) *S. aureus* F4-1, C) *S. Enteritidis* ATCC 13076.....59
- Figura 6.** Avaliação cinética do isolado *S. aureus* F4-1 com o peptídeo antimicrobiano P34, durante 24 h em meio caldo BHI a 37°C. Amostra controle (triângulo) e a amostra tratada (quadrado) .....62
- Figura 7.** Imagens do MEV para biofilme polimicrobiano com o *S. aureus* F4-1, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A, formados sobre superfície de aço inoxidável – (a, c e e) controle positivo; (b, d e f) superfície tratada com peptídeo antimicrobiano P34.....66

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**%:** porcentagem  
**>:** maior  
**<:** menor  
**°C:** Graus Celsius  
**µg:** microgramas  
**µL:** microlitros  
**µM:** micromolar  
**µm:** micrometro  
**Ace:** adesina colágeno  
**Agg:** substância de agregação  
**Agr:** sistema gene regulador acessório  
**ANOVA:** Análise de Variância  
**ANVISA:** *Agencia Nacional de Vigilância Sanitária*  
**ATCC:** *American Type Culture Collection*  
**ATP:** adenosina trifosfato  
**BAL:** bactéria ácido láctica  
**BHI:** Brain Heart Infusion  
**BLS:** *bacteriocin-like substance*  
**C+:** controle positivo  
**CDC:** *Centers for Disease Control and Prevention*  
**Cyl:** enzima citolisina  
**CRA:** Congo Red Ágar  
**DETEN/MS:** Departamento Técnico-Normativo da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde  
**DMSO:** Dimetilsufóxido  
**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico  
**dNTP:** Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados  
**DO:** densidade óptica  
**DTA:** Doenças Transmitidas pelos Alimentos  
**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
**EDTA:** Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
**EPS:** Substância polimérica extracelular  
**Esp:** proteína de superfície de enterococos  
**FAO:** *Food and Agriculture Organization*  
**FDA:** *Food and Drug Administration*  
**g:** grama  
**GeIE:** enzima gelatinase  
**gene agr:** gene regulador acessório  
**gene lcaA:** gene da proteína lcaA  
**gene nuc:** gene da termonuclease termoestável estafilocócica

**GRAS:** *Generally Recognized as Safe*  
**h:** hora  
**IAE:** infecção alimentar estafilocócica  
**ica:** operon *ica*  
**ICBS:** Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
**K:** Potássio  
**kDa:** KiloDaltons  
**LAB:** bactéria ácido láctica  
**M:** marcador  
**mg:** miligrama, molar  
**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio  
**min:** minuto  
**mL:** mililitro  
**mm:** milímetro  
**mM:** milimolar  
**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura  
**MSCRAMMs:** moléculas de adesão a superfície da matriz adesiva  
**MTT:** 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
**NaOH:** Hidróxido de Sódio  
**NADH:** Dinucleotideo de nicotinamida e adenina reduzido  
**NADPH:** Fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina reduzido  
**ng:** nanogramas  
**nm:** nanômetro  
**OMS:** Organização Mundial da Saúde  
**p.:** página  
**pb:** pares de base  
**PIA:** adesina intercelular polissacarídea  
**PBS:** Tampão fosfato  
**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase  
**pH:** Potencial de Hidrogênio Iônico  
**PLBD:** poliestireno linear de baixa densidade  
**RDC:** Resolução da Diretoria Colegiada  
**rpm:** rotações por minuto  
**SCO:** *Staphylococcus* coagulase positiva  
**SCoN:** *Staphylococcus* coagulase negativa  
**SDS:** Dodecil sulfato de sódio  
**SEA:** enterotoxina A  
**SEB:** enterotoxina B  
**SEC:** enterotoxina C  
**SED:** enterotoxina D  
**SEE:** enterotoxina E  
**SEs:** enterotoxinas estafilocócicas  
**TAE:** Tampão Tris-Ácido Acético-EDTA

**Taq:** enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
**TE:** Tampão Tris-EDTA  
**TRIS:** trisaminometano  
**TSB:** Trypticase Soy Broth  
**U:** Unidade  
**UA/mL:** unidades arbitrárias por mL  
**UFC:** Unidade Formadora de Colônia  
**UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
**UTI:** Unidade de terapia intensiva  
**v/v:** volume/volume  
**WHO:** *World Health Organization*

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias estão presentes nos mais diversos ambientes, podendo coexistirem aderidas às superfícies que entram em contato com diversas substâncias, possibilitando deste modo, a formação de agregados celulares. É uma tendência natural dos microrganismos fixados em superfícies úmidas, multiplicar-se e inserir-se em uma matriz viscosa composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e assim, desenvolver os biofilmes.

Os biofilmes são problemáticos em determinados setores da indústria alimentícia, além disso, existe a preocupação com a saúde dos consumidores, visto que nos últimos anos, houve relatos de que a maioria dos surtos cujos agentes etiológicos são transmitidos por alimentos parecem estar associados à formação de biofilmes. Essa correlação deve-se aos casos que interligam a persistência de agentes patogênicos alimentares em superfícies de contato com alimentos e a ocorrência de biofilmes.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), microrganismos contaminantes dos alimentos são considerados um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) afirmou que doenças transmitidas por alimentos (DTA) causaram aproximadamente 1000 notificações de surtos, com



cerca de 128.000 hospitalizações e 3000 mortes por ano nos Estados Unidos entre 1996 e 2010. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, entre os anos 2000 a 2014 houve 9.719 surtos notificados, com aproximadamente 192.800 hospitalizações, porém, em 51,34% dos surtos, não houve identificação do agente etiológico causador de DTA. Reconhece-se que os biofilmes são frequentes fontes de infecções, e que, cerca de 80% das infecções bacterianas persistentes transmitidas por alimentos nos Estados Unidos foram associadas a biofilmes.

Diversos são os gêneros de microrganismos que ocasionaram surtos de doenças transmitidas por alimentos nos últimos anos. Dentre os patógenos Gram-positivos, podemos citar a constante ocorrência de *Staphylococcus* spp. Mais recentemente, patógenos emergentes do gênero *Enterococcus* spp. vem sendo correlacionados as ocorrências em ambientes hospitalares. Estes microrganismos possuem fatores de virulência, tais como: substâncias de agregação e proteínas de superfície extracelular, que propiciam habilidade de formar biofilmes. Estas características lhes permitem desenvolver resistência aos desinfetantes comumente utilizados nas indústrias de alimentos.

Diferentes métodos são associados visando evitar a formação do biofilme e promover a sua remoção. Geralmente, para a remoção de biofilmes é utilizada a associação de métodos químicos e físicos, porém, bactérias patogênicas produtoras de biofilmes tornam-se mais resistentes à remoção mecânica e a ação dos desinfetantes.

Novas estratégias para controlar o desenvolvimento de biofilmes têm sido descritas nos últimos anos. Um fator comum é a busca por compostos que

possuam características como biodegradabilidade, baixa taxa de toxicidade e propriedades antiadesivas.

Como alternativa de combate a formação de biofilmes, supõe-se que peptídeos antimicrobianos possam ser utilizados para tal finalidade, pois, estes compostos apresentam capacidade de realizar modificações na parede celular microbiana, o que possivelmente influenciaria na adesão dos microrganismos. Entretanto, não tem sido relatados estudos destes compostos para o efeito de inibição de formação de biofilmes.

Neste contexto, este estudo buscou evidenciar o efeito antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 sobre biofilmes mono e polimicrobianos, formados por bactérias Gram-positivas provenientes de amostras alimentares em associação com outros microrganismos.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Investigar o efeito antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 frente a biofilmes formados por bactérias Gram-positivas provenientes de amostras alimentares, bem como, frente a um biofilme polimicrobiano.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Verificar o potencial da formação de biofilme de bactérias Gram-positivas patogênicas isoladas de alimentos.
- Avaliar o efeito inibitório do peptídeo antimicrobiano P34 sobre células planctônicas de diferentes microrganismos.

- Avaliar o efeito antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 sobre as culturas de *Staphylococcus* sp e *Enterococcus* sp. formadoras de biofilmes.
- Verificar a atividade metabólica de células de *Staphylococcus* sp e *Enterococcus* sp. presentes no biofilme tratado com o P34.
- Verificar o efeito da associação do peptídeo antimicrobiano P34 com a nisina sobre a cultura do isolado de *S. aureus* F4-1.
- Avaliar o desenvolvimento microbiano em cultura monoespécie e cultura mista com a presença do P34.
- Verificar a formação do biofilme com diferentes meios de cultura.
- Verificar a formação de biofilme polimicrobiano em superfície de aço inoxidável em presença e ausência do P34.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gênero *Staphylococcus* sp.

*Staphylococcus* sp. são bactérias classificadas como cocos Gram-positivos devido ao seu formato esférico e coloração violeta no método de Gram. Apresentam a enzima catalase, sendo consideradas catalase-positivas, característica que as diferenciam de outros gêneros (Banneman & Peacock, 2007). São mesófilos, com temperatura ótima de desenvolvimento a 37°C, são bactérias imóveis, não formadoras de esporos e tipicamente não encapsuladas. O gênero *Staphylococcus* sp. consiste de mais de 50 espécies, muitas das quais são encontradas no homem (Murray et.al, 2009; Rogers et al., 2009).

Os *Staphylococcus* sp. estão disseminados pela natureza, sendo a pele e a mucosa do homem e outros animais de sangue quente seu principal habitat (Murray et al., 2006; Banneman & Peacock, 2007). Geralmente, esses microrganismos apresentam uma relação benigna ou simbiótica com seus hospedeiros, tornando-se patogênicos conforme as condições imunológicas do organismo que habitam (Quinn et al., 2011).

Quando ocorre quebra da barreira do sistema imune, estes microrganismos tornam-se importantes patógenos para os seres humanos. Eles podem ocasionar um amplo espectro de enfermidades, incluindo doenças

de pele, tecidos moles, além de infecções oportunistas e bacteremias (Murray et al., 2009). Este gênero compreende dois grandes grupos conforme a capacidade de coagular o plasma sanguíneo, os denominados coagulase positivos (SCP) e o grupo que não tem a capacidade de coagular o plasma, denominado coagulase negativo (SCoN) (Rogers et al., 2009). As espécies associadas às patologias humanas são *Staphylococcus aureus* (SCP) e espécies do grupo dos estafilococos coagulase-negativa (SCoN) como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* (Center et al., 2003; Banneman & Peacock, 2007).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. são capazes de produzir inúmeros fatores de virulência que promovem sua sobrevivência e, conseqüentemente sua disseminação. Entre os fatores de virulência deste gênero, podem-se citar alguns como: a produção de hemolisinas que são diferentes entre si de acordo com a ação lítica sobre os eritrócitos (Park et al., 2004; Oogai et al., 2011; Salaberry et al., 2015), a DNase que catalisa a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA e é importante para distinguir *Staphylococcus* patogênicos de não patogênicos da microbiota (Citak et al., 2009), a catalase, coagulase e lipases, fibrolisinas, e também, as toxinas extracelulares e enterotoxinas (SEs) (Deresinski, 2005; Murray et al., 2009).

Em algumas espécies deste gênero, como em *S. aureus*, o sistema regulador do gene acessório (Agr) é uma importante via regulatória entre o modo de vida planctônico e o biofilme (Boles & Horswill, 2008). Este sistema contribui para a virulência das infecções associadas aos biofilmes, isso se deve ao fato de que o sistema *quorum-sensing* nesta espécie é regulado pelo *locus*

*agr* (Novick 2003; Novick & Geisinger, 2008). A perda da função do *Agr* em *Staphylococcus* spp. confere uma maior capacidade de formação de biofilme. Além disso, a atenuada regulação do *agr* é acompanhada pelo aumento da expressão dos fatores de aderência, (Yarwood & Schlievert, 2003; Yarwood et al., 2004; Boles & Horswill, 2008).

Os biofilmes de *Staphylococcus* sp. são correlacionados com a contaminação das superfícies do âmbito hospitalar, os quais estão associados principalmente com a resistência das células bacterianas do biofilme frente a antibioticoterapia e ao sistema imune do hospedeiro (Flemming & Wingender, 2010). Já em indústrias de alimentos, os biofilmes desses microrganismos podem interferir na segurança dos alimentos e provocar alterações na qualidade e vida de prateleira do produto (Walencka et al., 2006; Oulahal-Lagsir et al., 2008).

Dentre as variadas espécies do gênero produtoras de biofilme, o *S. aureus* é principal patógeno devido a capacidade de produção diversas enterotoxinas (SEs) transmitidas por alimentos (Pinchuk et al., 2010), as quais são estáveis ao calor e possuem diferentes graus de toxicidade ao organismo humano (Balaban & Rasooly, 2000).

### **2.1.1 Espécie *Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* é a espécie conhecida como a mais patogênica do gênero *Staphylococcus* sp., sendo também, o principal representante do grupo dos SCP (Lowy, 1998), e um dos mais comuns causadores de DTA em vários países do mundo (Zahoor & Bhatia, 2007).

Este patógeno é comumente encontrado nas narinas e na pele de animais de sangue quente, sendo que, seres humanos são considerados reservatórios naturais. Estima-se que 30% das pessoas saudáveis carregam persistentemente esse microrganismo (Lowy, 1998; Kuehnert et al., 2006) e outras 60% são consideradas portadoras intermitentes, ambos casos, sem o aparecimento de sintomas clínicos (Wertheim et al., 2004; Gorwitz et al., 2008; Onofre & Costa; 2013).

Este microrganismo possui a capacidade de crescer e produzir diferentes enterotoxinas estafilocócicas (SE). A maioria dos surtos de infecção alimentar estafilocócica (IAE) estão associados com a presença de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED, e SEE) sendo a SEA, considerada a causa mais comum de IAE (Schelin et al. 2011; Crago et al., 2012; Hennekinne et al., 2012; Wallin-Carlquist et al., 2012).

No Brasil, entre os anos de 1999 a 2009 houve o registro de 6.349 surtos de DTA envolvendo 123.917 sendo que 20,5 % dos casos relatados foram causados por *S. aureus*. No estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 1999 a 2005 foram notificados 1.275 surtos, dos quais o *S. aureus* foi responsável por 11,7% dos surtos notificados (Brasil, 2009). A ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento ocasionam violenta êmese, náusea e diarreia (Balaban & Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003; Crago et al., 2012; Hennekinne et al., 2012).

O tratamento com aquecimento do alimento é capaz de matar a bactéria. No entanto, a estabilidade das SEs produzidas torna o *S. aureus* uma das principais causas de DTA (Le Loir et al., 2003). As SEs possuem

resistência ao congelamento, secagem, tratamento térmico (121°C por 28 minutos) e baixo pH (Murray 2006, Pinchuk et al., 2010), possuem também resistência a enzimas proteolíticas retendo a sua atividade no trato digestivo após a ingestão. Geralmente, os tratamentos térmicos utilizados comumente no processamento de alimentos não são eficazes para a destruição completa das SEs (Hennekinne et al., 2012).

O *S. aureus* apresenta mecanismos de virulência multifatoriais, que dependem da expressão de determinantes de virulência, envolvidos na evasão imune, adesão, entre outros. A aderência da bactéria ao tecido do hospedeiro e superfícies abióticas é a etapa fundamental para o processo de colonização e infecção. As proteínas associadas à superfície da célula que medeiam a ligação à matriz extracelular do hospedeiro, denominadas moléculas de adesão a superfície da matriz adesiva (MSCRAMMs), exercem a função de propiciar o desenvolvimento do biofilme (Foster & Hook, 1998; Kuroda et al., 2008; Speziale et al., 2009).

A habilidade de *S. aureus* de formar biofilmes em tubulações já foi evidenciada em indústrias de alimentos. Este fato preocupa não somente devido à disseminação e produção de enterotoxinas através do alimento, mas também, devido às perdas econômicas pela ocorrência de características indesejáveis no produto final (De Vita et al., 2007; Gutiérrez et al., 2012; Di Ciccio et al., 2015). A sobrevivência e crescimento em plantas de processamento de alimentos proporcionam uma vantagem metabólica como agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos (Oulahal-Lagsir et al., 2008; Schelin et al., 2011).



## **2.2 Gênero *Enterococcus* sp.**

*Enterococcus* sp. constituem um diverso, complexo e importante grupo de bactérias que estão amplamente distribuídas na natureza, devido à capacidade de se desenvolver e sobreviver em condições adversas (Giraffa, 2002; Valenzuela et al., 2009; Gilmore, 2014). São microrganismos comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos, água e alimentos, animais, solo e em plantas. Deste modo, são utilizados como indicadores de contaminação fecal tanto na água quanto em alimentos (Casal et al., 2009; López et al., 2009). Atualmente, são conhecidas mais de 53 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. No entanto, à medida que novos estudos foram sendo realizados, novas espécies foram descritas, sendo possível a identificação de *Enterococcus* sp. em diversos ambientes (Euzéby, 2014).

Estes microrganismos são cocos Gram-positivos que se dispõem em pares ou cadeias curtas, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos com temperatura ótima de crescimento em torno de 35°C (Cullebras et al., 2010; Zou et al., 2011). Pertencem ao grupo de organismos conhecidos como bactérias ácido lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas e, geralmente, toleram condições ambientais adversas, como alta concentrações de NaCl (6,5%), uma ampla faixa de temperatura (entre 5°C e 50°C), variações de pH (4,6 a 9,9), além de serem resistentes na presença de sais biliares (40%) (Koneman & Allen, 2001; Fischer & Phillips, 2009).

Bactérias pertencentes a este gênero, comumente apresentam uma gama de fatores de virulência, entre eles a produção de substâncias de

agregação (Agg), citolisina (Cyl), gelatinase (GeIE) e proteína de superfície de enterococos (Esp) relacionada com a adesão celular e a capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas (Poeta et al., 2005; Medeiros, 2014).

Em alimentos, os *Enterococcus* sp. podem produzir algumas bacteriocinas com efeitos antilisteriais (Giraffa et al., 2002), sugerindo seu uso em culturas *starter* garantindo melhor parâmetro de segurança do alimento. Encontram-se também em produtos de origem animal, entretanto, devido à característica de possuir maior resistência térmica em relação às outras bactérias, a presença de *Enterococcus* sp. pode ser indicativa de contaminação. Além disso, estes microrganismos estão relacionados com a deterioração de produtos cárneos cozidos e processados (Franz et al., 2003; Fouliquié Moreno et al., 2006; Gomes et al., 2010).

Embora algumas linhagens sejam utilizadas na indústria de alimentos, *Enterococcus* sp. podem causar infecções em humanos e animais, como por exemplo, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (Fischer & Phillips, 2009; Antonello, 2010).

No Brasil, no ano de 2008, um estudo evidenciou a prevalência de *Enterococcus* sp. em 60% em produtos cárneos, sendo a espécie frequentemente isolada o *E. faecium* (Gomes et al., 2008). Outra pesquisa realizada com carne e leite pasteurizado no estado do Rio de Janeiro desenvolvida por Fracalanza et al., (2007) demonstrou a incidência de *Enterococcus* sp. em 56,8% das amostras de carnes e 43,2% das amostras leite, com o predomínio do isolamento da espécie *E. faecalis*.

As células bacterianas de *Enterococcus* sp. que possuem perfis de resistência, podem ser transferidas para os seres humanos através dos alimentos e colonizar o trato gastrointestinal, podendo ser capazes de transferir genes de resistência à microbiota residente (Fischer & Phillips, 2009; Frazzon et al, 2010; Cassenego et al, 2011). Deste modo, a detecção de cepas produtoras de biofilmes serve como política de controle de falhas no processo de higienização, prevenindo possíveis fontes de contaminação na indústria de alimentos (Marinho et al., 2013).

### **2.2.1 Espécie *Enterococcus faecalis***

O isolamento de *Enterococcus faecalis* em alimentos processados, como carne, salsichas e queijos, está frequentemente associado a contaminação fecal, pois esta espécie é capaz de sobreviver a processos aos quais os alimentos são expostos durante a produção (Fisher & Phillips, 2009). No Brasil, *E. faecalis* já foi isolado de alimentos como carnes, vegetais e produtos lácteos (Gomes et al., 2008; Riboldi et al., 2009; Frazzon et al., 2010).

Na região sul do Brasil, esta espécie é a prevalente entre o grupo dos *Enterococcus* sp. que são isolados de alimentos de origem animal (Riboldi et al., 2009).

A alta disponibilidade de nutrientes com fonte de carbono, como a glicose, permite maior crescimento e multiplicação de *E. faecalis* e, conseqüente estabelecimento do biofilme microbiano (Cassenego et al., 2013).

Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium*. Doenças relacionadas a

outras espécies do mesmo gênero são raras (Jett et al., 1994; Kayaoglu & Orstavik 2004).

*E. faecalis* pertence ao grupo de patógenos que emergiram nos últimos anos como oportunistas em pacientes imunossuprimidos que encontravam-se em unidades de terapia intensiva (UTI). Dentre o quadro de infecções causadas por esse microrganismo, incluem-se endocardites, infecções em ferimentos cirúrgicos, sepse neonatal e infecções do trato urinário (Giraffa, 2002; Fisher & Phillips, 2009). Há relatos na literatura de *E. faecalis* sendo frequentemente encontrado em canais de obturação dentária, onde, estudos *in vitro* demonstraram a capacidade das células bacterianas em penetrar nos túbulos dentinários, habilidade esta, que não é demonstrada por todas as espécies bacterianas (Rocas et al., 2004; Zoletti et al., 2006).

Há uma grande correlação entre isolados clínicos de *E. faecalis* que apresentam perfil de resistência a antimicrobianos, com os isolados de *E. faecalis* de origem alimentar. Poulsen et al., (2012) demonstraram que durante os anos de 2008 a 2010, amostras de urina de pacientes com infecção do trato urinário por *E. faecalis* foram associadas a clones que estavam presentes em aves. A homologia entre os isolados da urina dos pacientes e os isolados de aves indica o potencial de propagação de *E. faecalis*.

A propagação de células bacterianas dos isolados provenientes de alimentos pode ocorrer devido à presença de diferentes fatores de virulência, os quais podem estar associados à formação de biofilme. Dentre estes fatores citam-se: substâncias de agregação (Agg), adesinas de colágeno (Ace),

citolisinas (Cyl) e proteínas de superfície de enterococcus (Esp) (Medeiros et al., 2014).

### **2.3 Biofilmes**

Biofilmes são agregados de células microbianas embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície biótica, como tecidos vegetais e animais, ou abiótica, como rochas, metais e polímeros diversos, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais abertos por entre as microcolônias (Flemming & Wingender, 2010).

Um biofilme pode ser formado por uma única espécie bacteriana, sendo denominado monoespécie, ou, por várias espécies, como fungos, algas e protozoários, denominado polimicrobiano ou multiespécie (O' toole et al., 2000; Singh et al., 2006). No biofilme polimicrobiano, uma espécie pode ser favorecida por outra através do comensalismo, como exemplo, o consumo de oxigênio por uma bactéria aeróbica, facilitando o crescimento de uma espécie microaerófila (Nikolaev & Plakunov, 2007). Porém, em alguns casos, devido a competição por nutrientes, algumas bactérias são capazes de impedir ou reduzir a adesão de outras através de excreção de substâncias antagonistas (Leriche & Carpentier, 2010).

Este tipo de organização oferece vantagens às espécies de microrganismos formadores de biofilme, pois apresenta proteção contra adversidades, como a persistência durante longos períodos em privação de nutrientes, a capacidade de resistir e se multiplicar após a exposição a agentes

físicos, químicos e biológicos, capacidade de suportar mudanças de pH, a habilidade de disseminação para colonizar novos locais e a resistência a antimicrobianos (Gilbert & Rickard, 2003; Cooper, 2010). Em relação à resistência, estudos demonstram que microrganismos de um biofilme apresentam um nível de resistência de 10 a 100 vezes maior a antibióticos do que as células planctônicas (Singh et al., 2006; Mohamed et al., 2007; Palmer et al., 2007).

A principal estrutura de um biofilme é a matriz polimérica extracelular ou EPS, a qual é formada pelas células microbianas e matéria orgânica, mas também pode ser constituída por proteínas (principalmente proteínas de adesão), ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios caracterizando assim, uma composição heterogênea e complexa (Davies et al., 1998; Sutherland, 2001). Entretanto, as proteínas e os polissacarídeos (exopolissacarídeos) são responsáveis por 75 – 89% da composição da EPS do biofilme, considerados, portanto, o componente essencial da matriz (Tsuneda et al., 2003; Houdt & Michiels et al., 2010). A principal função dessa matriz é agir como barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam arrastadas pelo fluxo de substâncias, auxiliando a célula a resistir a condições de estresse presentes no ambiente (Caixeta, 2012).

Existem vários fatores relacionados à formação de biofilmes. Os principais são: características físico-químicas do material sobre o qual estão aderidos, a expressão de fatores de virulência por parte dos microrganismos, como produção de cápsula exopolimérica, fímbrias e síntese de adesinas (Zottola & Sasahara, 1994). Dentre os fatores que podem interferir na formação

do biofilme estão as variações de pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio e concentração dos metabólitos bacterianos (Singh et al., 2006).

Além de se auto-protegerem, as células no biofilme também colaboram metabolicamente, formando associações enzimáticas para degradar compostos complexos e também para neutralizar substâncias tóxicas geradas pelos seus próprios metabolismos que podem acarretar quadros de toxinoses graves (Houdt & Michiels et al., 2010; Simões et al., 2010; Pinto 2014).

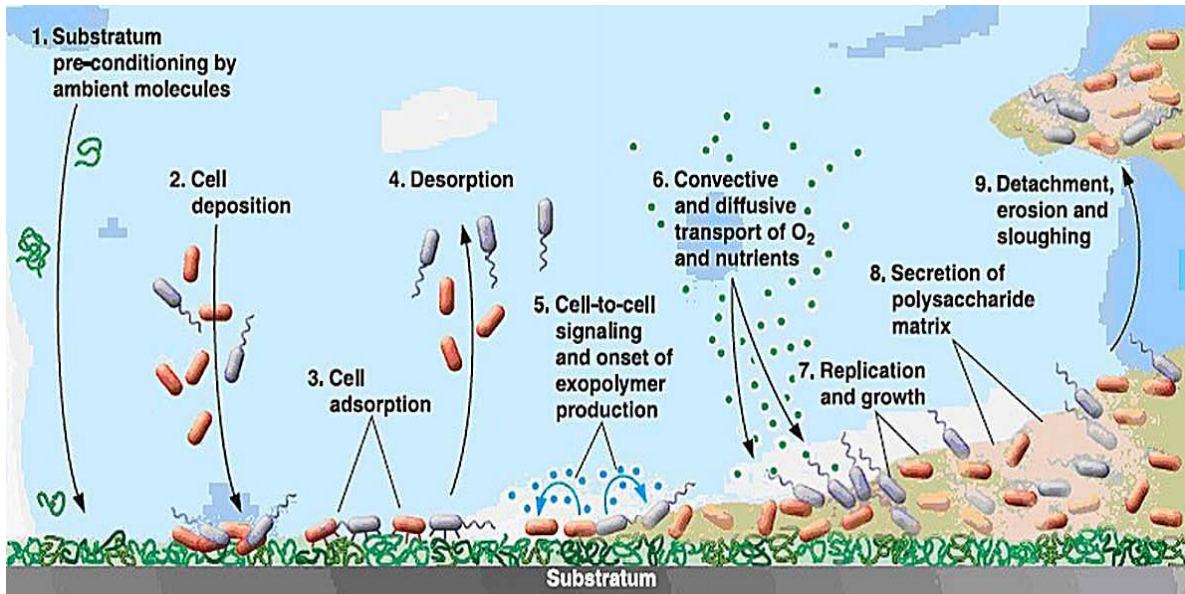
#### **2.4 Formação do biofilme**

A etapa inicial de adesão da bactéria pode ser considerada passiva ou ativa dependendo da motilidade celular. A adesão, quando passiva, é conduzida pela gravidade e difusão dinâmica de fluídos. Na adesão ativa, características da superfície celular como pili, flagelo, cápsula e carga da superfície favorecem a adesão (Allison, 2003; Palmer et al., 2007).

Anteriormente à formação do biofilme ocorre à formação de um filme condicionante que contém em sua superfície de adesão macromoléculas orgânicas e inorgânicas presentes em um líquido que reveste a superfície (Kumar & Anand, 1998; Breyers & Ratner, 2004).

Após a formação do filme condicionante ocorre a deposição das células planctônicas na superfície. Esta deposição num primeiro momento acontece com interações fracas, tais como forças eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (Zottola & Sasahara, 1994; Palmer et al., 2007; Sandasi et al., 2010; Caixeta, 2012) (Figura 1). Neste estágio de

adsorção a bactéria pode ser facilmente removida através da lavagem da superfície.



**Figura 1.** Fases do desenvolvimento do biofilme. O desenvolvimento do biofilme inclui: (1) a formação de um filme condicionante, (2) a deposição celular, (3) a adsorção reversível, (4) a dessorção e adsorção irreversível, (5) produção de moléculas para comunicação entre células, (6) o transporte de substratos para dentro do biofilme, (7) o crescimento, replicação e (8) produção de EPS e (9) a maturação e dispersão do biofilme (Breyes & Ratner, 2004).

Posteriormente, ocorre a adsorção das células planctônicas na superfície juntamente com a dessorção das células adsorvidas reversivelmente (Breyers & Ratner, 2004). Esta etapa é denominada irreversível, onde ocorre a interação física da célula com a superfície, com a síntese de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzido pela bactéria (Zottola & Sasahara, 1994; Allison, 2003). Nesse momento, as fímbrias poliméricas ligam à célula bacteriana ao substrato, tornando complexa a remoção do biofilme pelos métodos físicos e químicos, sendo necessário adotar força mecânica (Caixeta, 2012).



Após a etapa irreversível, as células bacterianas começam a crescer e se agregar, formando microcolônias e canais de água (Chmielewski & Frank, 2003). Neste momento, a motilidade cessa e genes envolvidos na comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e na produção de EPS se tornam totalmente ativos. A principal força de ligação célula-superfície é conferida pela matriz tridimensional e insolúvel de EPS (Boari et al., 2009).

O processo de *quorum sensing* fornece um mecanismo de auto-organização e regulação das células microbianas (Parsek & Greenberg, 2005) e é conhecido por estar envolvido em atividades microbianas importantes como a biossíntese de enzimas extracelulares, biossíntese de antibióticos, produção de biosurfactante e a síntese EPS (Davies et al., 1998; Daniels et al., 2004; Fux et al., 2005; Houdt & Michiels et al., 2010).

A presença de poros e canais permite a passagem de substratos para dentro do biofilme, então, o substrato é metabolizado e em contrapartida há o transporte de produtos para fora do biofilme (Flemming & Wingender, 2010). Esses processos são acompanhados pelo crescimento celular, replicação e produção de EPS (Breyers & Ratner, 2004) e é denominado como fase de maturação do biofilme que pode ocorrer de três a seis dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias, aumentando deste modo a espessura do biofilme e a estabilidade da colônia contra flutuações do ambiente (Forsythe, 2010).

A etapa final corresponde à remoção de biofilme por destacamento ou descamação ocorrendo a dispersão de células planctônicas ou microcolônias (Breyers & Ratner, 2004; Palmer et al., 2007;). Esta é a etapa

onde ocorre a disseminação de microrganismos patogênicos causadores de DTA.

## **2.5 O impacto dos biofilmes na indústria de alimentos**

Em indústrias de alimentos, as atividades relacionadas à presença dos biofilmes podem ser classificadas em duas grandes categorias: as benéficas, conduzindo a transformações de valor positivo, e as prejudiciais, responsáveis por processos que devem ser evitados devido as consequências negativas. Entre os efeitos benéficos estão o auxílio no tratamento de efluentes e de água potável, e a produção de biopolímeros para usos diversos (Gjaltema et al., 1997 Arcuri, 2000).

Quanto aos efeitos prejudiciais, segundo Mittelman (1998) e Vieira (1993), os microrganismos em biofilmes catalisam reações químicas e biológicas que causam corrosão do metal em tubulações e podem reduzir a eficácia de transferência de calor. Como consequência, isto pode acarretar perdas econômicas devido a manutenção do equipamento, além da diminuição de vida de prateleira do produto pela disseminação de células bacterianas deteriorantes e patogênicas (Flach et al., 2005; Bremer et al., 2006; Gram et al., 2007).

Os biofilmes são problemáticos em determinados setores da indústria alimentícia como: indústria cervejeira, processamento de lácteos, processamento de aves, de carne vermelha, industrialização de produtos frescos e de frutos do mar (Chen et al., 2007; Harvey et al., 2007; Sofos & Geornaras, 2010; Shikongo-Nambabi, 2011).

Devido às células bacterianas dos biofilmes serem mais resistentes quando comparadas as planctônicas, a eliminação das mesmas em instalações de processamento de alimentos se torna um grande desafio (Simões et al., 2006; Simões & Vieira, 2009). Evidências indicam que o modo de vida em um biofilme ocasiona o aumento da resistência aos sanitizantes utilizados na indústria (Sidhu et al., 2001; Langsrud et al., 2003; Simões et al., 2006; Houdt & Michiels et al., 2010).

Segundo dados do *Food and Drug Administration* (FDA), agência que regulamenta os setores de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, aproximadamente dois terços das etiologias confirmadas de toxinfecções veiculadas por alimentos estão diretamente associadas a contaminações microbiológicas ocorridas em indústrias, principalmente de origem bacteriana (FDA, 1997).

A maioria dos surtos de DTA parecem estar associados a biofilmes, pois, na literatura há um número expressivo de relatos correlacionando a persistência de patógenos de origem alimentar em superfícies de contato com os alimentos e a ocorrência dos biofilmes. Essa relação envolve surtos de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. (Kumar & Anand, 1998; Dykes et al., 2003; Lapidot et al., 2006; Aarnela et al., 2007).

O ramo industrial mais afetado é o de lácteos, onde a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e contamina os alimentos, devido ao eventual desprendimento de porções aderidas (Flach et al., 2005, Gutiérrez et al., 2012). Um dos principais problemas são as máquinas de envase, onde os

biofilmes podem se desenvolver nas soldas e gerar contaminação do produto após a pasteurização. Além disso, bactérias patogênicas presentes na matéria prima podem produzir enzimas extracelulares que resistem ao processamento térmico. A produção de lipases e proteases é pontada como a principal causa de deterioração dos produtos lácteos (Waak et al., 2002; Marchand et al., 2009).

Na indústria de processamento de aves, fatores como a alimentação animal, superfícies, poeira, e o transporte das aves, tem sido importante fontes de contaminação por *Salmonella* sp. Aproximadamente 50% dos isolados de *Salmonella* sp. provenientes de aves são capazes de formar biofilme (Marin et al., 2009). Além disso, este importante patógeno pode apresentar a habilidade de desenvolver biofilme sobre superfícies com menor disponibilidade de nutrientes quando comparada a fornecida pelo ambiente industrial. Esta capacidade de persistência auxilia na disseminação das células bacterianas provocando a contaminação dos alimentos (Stepanović et al., 2004).

É importante ressaltar que as características dos materiais que compõem a superfície que entra em contato com o alimento são um dos principais fatores que propiciam a formação do biofilme, devido a hidrofobicidade, carga e rugosidade estarem relacionadas (Palmer et al., 2007; Chia et al., 2009). Além disso, a diversidade da composição a matéria prima auxilia na formação de biofilmes polimicrobianos, onde, a adesão de uma espécie pode fornecer substâncias que promovem a ligação de outras espécies (Nikolaev & Plakunov 2007), A presença de biofilmes polimicrobianos

aumentam as chances de microrganismos patógenos se estabelecerem na indústria de alimentos (Habimana et al., 2010).

## **2.6 Estratégias de controle de biofilmes**

Atualmente, as estratégias de controle microbiano não são eficientes o suficiente para proporcionar uma erradicação completa de microrganismos perigosos sem afetar a qualidade do produto (FAO/WHO, 2008, Caixeta et al., 2012).

Em meio ao biofilme, as células bacterianas estão presumivelmente protegidas. Assim, a eficácia de agentes desinfetantes diminui, podendo apenas reduzir pouco mais de dois ciclos logarítmicos de microrganismos (Whipps et al., 2008).

As estratégias convencionais para controle de microrganismos são baseadas na higienização química das linhas de processamento, como o uso de compostos ácidos, biocidas à base de aldeído, produtos cáusticos, cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, ácido peracético, entre outros (Kumar & Anand, 1998; Dosti et al, 2005, Bremer et al., 2006; Caixeta et al., 2012). É possível que células microbianas residuais mantenham resistência ao uso constante de desinfetantes químicos, ou possam adquiri-la através de mutação ou troca genética, o que permite sobreviver a concentração dos desinfetantes (Gilbert & McBain, 2003).

Nos últimos anos, têm se buscado alternativas ecologicamente corretas, denominadas “estratégia verde”. O uso de detergentes a base de enzimas conhecido como “química verde” pode servir como uma opção para

superar o problema de biofilme na indústria alimentar (Parkar et al., 2004; Lequette et al., 2010). Augustin et al., (2004) demonstraram o potencial de aplicação enzimáticas contra biofilmes formados por microrganismos comumente encontrados em produtos lácteos (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* e *Streptococcus thermophilus*).

A associação de ondas ultra-sônicas e enzimas proteolíticas demonstrou ser efetiva sobre biofilme em linhas de processamento de leite, podendo eliminar 61% a 96% do total de biofilme produzido por *Escherichia coli* sobre o aço inoxidável (Oulahal-Lagsir et al., 2003). Na literatura também há relatos do uso de bacteriófagos (Sillankorva et al., 2004) e o uso de moléculas bioativas (Simões et al., 2010).

Compostos bioativos como os óleos essenciais extraídos de plantas (Trentin et al., 2013, Negreiros, 2014) e o uso de biossurfactantes como a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, podem possuir baixa taxa de toxicidade, alta biodegradabilidade, e até propriedades anti-adesivas (Van Hamme et al., 2006; Nitschke & Costa, 2007), o que possibilitaria sua utilização como estratégia de controle de biofilmes.

Nos últimos anos, peptídeos bioativos denominados bacteriocinas têm sido alvo de muitos estudos. As bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomicamente produzidos por diferentes tipos de bactérias. Este grupo de substâncias apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes. Devido a isto, desperta interesse para a sua aplicação na preservação de alimentos e condicionamento de superfícies, de modo a evitar

a formação de biofilmes microbianos (Nes et al., 2007; Balciunas et al., 2013; Garcia-Almendarez et al., 2008; Güllüce et al., 2013,).

Algumas bacteriocinas como a nisina e pediocina que atuam como bioconservantes, também foram descritas por seu potencial de controle do biofilme microbiano em instalações de processamento de laticínios, incluindo seu efeito frente a *Listeria monocytogenes* (Dufour et al., 2004; Garcia-Almendarez et al., 2008;).

Outros peptídeos bioativos oriundos de microrganismos como a lactocina 705 e lactocina AL705 produzidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705, quando aplicadas em polietileno linear de baixa densidade (PLBD) demonstraram atividade antimicrobiana in vitro contra *Lactobacillus plantarum* CRL691 e *Listeria innocua* (Massani et al., 2008). Os peptídeos bioativos produzidos por *Enterococcus faecium* (enterocinas A e B) aplicados sobre embalagem plástica demonstraram eficiência antimicrobiana no controle de *L. monocytogenes* por 90 dias de armazenagem a 6°C quando utilizada em sinergismo com o processamento de alta pressão (Marcos et al., 2008).

A classificação das bacteriocinas sofrem constantes modificações à medida que se fazem novas descobertas. A classificação mais recente foi descrita por Zouhir et al., (2010) e baseia-se nas sequências de aminoácidos que compõem a molécula. No entanto, há o grupo de substâncias semelhantes às bacteriocinas (*bacteriocin-like substance* - BLS) que compreende peptídeos antimicrobianos cuja natureza proteica não está completamente definida (Todorov et al., 2010).

De modo geral, os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias são ativos em baixas concentrações, podendo exibir ações bactericida, fungicida, viricida e antitumoral, exigindo um curto tempo de contato para induzir a eliminação de patógenos (Chen & Luo, 2009).

A possibilidade do uso destes peptídeos bioativos como controle de biofilmes vem sendo pesquisada ao longo dos anos, entretanto, são necessários mais estudos para avaliar o mecanismo de ação (Gálvez et al., 2007; Guerrieri et al., 2009; Kumar et al., 2009; Winkelströter et al., 2011).

### **2.7 Peptídeo antimicrobiano P34**

O peptídeo antimicrobiano P34 foi identificado, purificado e caracterizado por Motta et al., (2007a), a partir de uma linhagem de *Bacillus* sp. P34, isolado do intestino do peixe *Leporinus* sp. proveniente do ambiente aquático da bacia amazônica. Este peptídeo é produzido no início da fase do crescimento exponencial, com pico máximo de produção na fase estacionária, e apresenta espectro de ação principalmente sobre bactérias Gram-positivas, caracterizado como *bacteriocin-like substance* (BLS) (Motta et al., 2007a).

Este composto possui peso molecular de 1.498 kDa, e é relativamente estável ao calor e a enzimas proteolíticas, apresentando atividade em uma faixa de pH de 3,0 a 10 em temperatura entre 25 e 37°C (Motta et al., 2007b).

O modo de ação deste peptídeo antimicrobiano foi avaliado frente a diferentes bactérias, e demonstrou possuir atividade antimicrobiana frente a importantes patógenos e deteriorantes de alimentos como *Listeria innocua*,



*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora*, e *Aeromonas hydrophila* e *Salmonella* Enteritidis (Motta et al., 2007b; Motta et al., 2008). Sobre *L. monocytogenes*, foi observado efeito bactericida (Motta et al., 2008).

Em experimentos realizados para avaliar a citotoxicidade *in vitro* deste composto, tendo nisina como padrão de comparação, foi observado comportamento de similaridade entre as substâncias nos testes realizados (Vaucher et al., 2010), indicando baixa toxicidade do peptídeo antimicrobiano P34. Além disso, outros estudos demonstram o potencial antiviral contra viroses de animais domésticos (Silva et al., 2014).

Com base nos resultados descritos na literatura, estima-se que o peptídeo antimicrobiano P34 poderia ser aplicado às células bacterianas patogênicas formadoras de biofilme. Até o momento, não há relatos na literatura sobre o possível efeito antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### **3.1 Microrganismos e condições de cultivo**

##### **3.1.1 Isolados de *Staphylococcus aureus***

Onze isolados de *S. aureus* de amostras de carne de frango resfriado e congelado foram utilizados neste trabalho. Estes isolados foram previamente identificados por Martins et al. (2013) e encontravam-se estocados em caldo brain heart infusion (BHI-Himedia®) adicionado de 20% de glicerol e congelados a -20°C. Os isolados foram reavaliados quanto à morfologia da colônia, coloração de Gram, teste da catalase, coagulase, fermentação do manitol e estocadas em *Skim Milk* com 20% de glicerol a -20°C.

##### **3.1.2 Isolados de *Enterococcus faecalis***

Onze isolados de *E. faecalis*, de amostras de diferentes alimentos foram utilizados neste trabalho (Tabela 1). Estes isolados foram previamente identificados fenotipicamente por Riboldi et al. (2009) e encontravam-se

estocadas em caldo brain heart infusion (BHI-Himedia®) adicionado de 20% de glicerol e congelado a -20°C. Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a confirmação da espécie. As colônias foram reavaliadas quanto à morfologia, coloração de Gram, teste da catalase, e bili-esculina e estocadas em caldo *Skim Milk* com 20% de glicerol a -20°C.

**Tabela 1.** Origem do isolados de *Enterococcus faecalis*.

<b>Isolado</b>	<b>Origem</b>	<b>Isolado</b>	<b>Origem</b>
<b>C-8</b>	Cenoura	C-11, E-2, E-3, E-4	Batata
<b>A-8, G-6,</b>	Queijo colonial	E-7	Sal de frango
<b>G-8</b>	Queijo mussarela	G-2	Ricota

### **3.1.3 Cepas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076**

Esta cepa foi utilizada para os experimentos de avaliação de seu comportamento em estado planctônico e sésil. Esta cepa foi estocada com 20% de glicerol a -20°C e foi reativada com uso de caldo BHI. Também foram realizados isolamento em Ágar MacConkey (Himedia©) e coloração de Gram para a confirmação da pureza do isolado.

### **3.1.4 Isolado de *Candida tropicalis* 72-A**

Este microrganismo é um isolado clínico proveniente da cavidade oral de paciente hospitalar. Apresenta resistência a fluconazol, anfotericina B, voriconazol e anidulafungina, e a habilidade da formação de biofilme, sendo considerado como um microrganismo fraco formador (Bergamo et al., 2014). Esta levedura foi utilizada para os experimentos de avaliação de seu comportamento em estado planctônico e sésil. As células foram estocadas em

meio Ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia©) com óleo mineral a 25°C. Repiques e coloração de Gram foram realizados para confirmar a pureza das colônias.

### **3.2 Identificação genotípica de *Enterococcus faecalis***

#### **3.2.1 Extração de DNA**

A extração do DNA total foi realizada por método físico-químico segundo Donato, (2007). Uma colônia isolada em ágar brain heart infusion (BHI Himedia®) foi reinoculada em 5 mL de caldo BHI a 37°C por 24 h. Após incubação, 1 mL da cultura foi transferida para um microtubo, o qual foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 40 µl da solução de lise composta por 5% de NaOH 1M, 2,5% de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 92,5% de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). O *pellet* ressuspendido na solução de lise permaneceu à temperatura de 100°C durante 15 minutos e, posteriormente, foi diluído em 460 µl de tampão TE 1X, homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após essa centrifugação, o sobrenadante formado contendo o DNA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C. O *pellet* foi descartado. A confirmação da extração foi realizada por corrida eletroforética com gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio e analisado em luz ultravioleta.

#### **3.2.2 Identificação de *Enterococcus faecalis* por PCR**

Para a confirmação da espécie *E. faecalis*, os isolados foram submetidos a uma PCR. O oligonucleotídeo iniciador espécie-específico

utilizado para as reações esta descrito na Tabela 2. As reações da PCR foram realizadas em 10 µl de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1,25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT® – Integrated DNA Technologies), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 50 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®) (Nachtigall et al., 2013). Os produtos foram amplificados em termociclador Amplitherm Thermal Cyclers nas seguintes condições: 5 min a 94°C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min a 72°C; e 5 min a 72°C. A cepa *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo para as reações. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta, submerso em tampão TAE (Depardieu et al., 2004).

**Tabela 2.** Oligonucleotídeo iniciador utilizado nas reações de PCR para a espécie *Enterococcus faecalis*.

Oligonucleotídeo Iniciador	Sequência 5'- 3'	Produtor (pb)	Referência
ddl_F	CACCTGAAGAAACAGGC	475	Depardieu et al., (2004)
ddl_R	ATGGCTACTTCAATTCACG		

### 3.3 Avaliação da formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*

A avaliação qualitativa da formação de biofilme foi realizada conforme descrito por Stepanović et al., (2007). Três a cinco colônias foram suspensas em 4 mL de solução salina a 0,85% e comparada à escala de 0,5

McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Vinte microlitros desta solução foram transferidos para cada uma das cavidades da microplaca de poliestireno com 96 poços. Posteriormente, 180  $\mu$ l de caldo triptona de soja (TSB Himedia®) suplementado com 1% de glicose foram adicionados a cada poço. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 h. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com solução salina a 0,85% para remover as células não aderidas. As células aderidas foram fixadas com 200  $\mu$ l de metanol durante 20 minutos, em seguida, a placa foi seca à temperatura ambiente durante 30 minutos. Foi adicionado cristal violeta 0,5% durante 15 minutos para corar as células bacterianas aderidas à placa. Depois, as placas foram lavadas em água corrente, e, após sua secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi suspenso com 200  $\mu$ l de etanol 95% por 30 min. A densidade óptica do biofilme aderente foi determinada com um filtro de 450 nm num leitor de placas de microtitulação, utilizando a espectrofotometria de ELISA (Anthos Zenyth 200). Todos os isolados foram testados pelo menos oito vezes e em duplicata.

A cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi usada como controle positivo, e como branco foi utilizado somente o caldo TSB.

O valor da densidade óptica (DO) utilizado foi o valor médio obtido nas oito leituras para cada isolado menos o valor medido para o controle branco; desta forma foi possível excluir os valores mais discrepantes e controlar a variabilidade. Considera-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura DO para cada isolado, for maior ao valor do ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula  $[B + 3(s)]$ , onde B é a média da leitura do branco e s é o desvio padrão das leituras do branco. Os isolados foram

classificados como fortes produtores de biofilme quando  $4DOc \leq DO$ , moderado quando  $2DOc \leq DO \leq 4DOc$  e fraco quando  $DOc \leq DO \leq 2DOc$  e não produtor de biofilme quando valor obtido foi igual ou menor ao valor de DOc (Tabela 3).

### **3.4 Produção e purificação parcial do peptídeo antimicrobiano**

#### **P34**

Para a produção do peptídeo antimicrobiano P34, a cultura produtora, *Bacillus* sp. P34 foi cultivada em 100 mL de meio BHI a 30°C em um agitador rotativo a 180 rpm. Após o cultivo durante 24 h, as células foram colhidas através da centrifugação a 10.000g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi precipitado com solução de sulfato de amônio (Nuclear®) a 20% de saturação e deixado em *overnight* a 4°C. Posteriormente, o *pellet* foi colhido por centrifugação a 10.000g durante 15 min a 4°C e dissolvido em solução de tampão de fosfato 10 mM pH 7,0. Esta solução foi parcialmente purificada através da cromatografia em gel de filtração usando uma coluna Sephadex G-100.

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de diluição descrito por Mayr-Harting et al. (1972). A atividade foi definida como o inverso da diluição após a última série de diluição em que se observou a zona de inibição. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL). As UA/mL foram determinadas utilizando a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como cultura indicadora. As frações que mostram a atividade antimicrobiana

foram reunidas para formar um *pool*, que foi esterilizado em filtro de 0,22µm (Millipore, Bedford, EUA) e estocado a -20°C (Motta et al., 2007a).

### **3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34 contra células planctônicas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis***

A atividade antimicrobiana foi determinada como descrito por Motta & Brandelli (2002).

Uma alíquota de 20 µl do peptídeo antimicrobiano P34 parcialmente purificado com atividade de 1.600 UA/mL foi aplicado em placas de ágar BHI (Himedia®) previamente inoculadas com um *swab* submerso em suspensões de 0,5 na escala de McFarland de *E. faecalis* e *S. aureus*. A cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como controle. As placas foram incubadas à temperatura ótima de crescimento e as zonas de inibição (mm) foram medidas após 24 h (Tabela 4).

### **3.6 Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34**

#### **3.6.1 Inibição da formação do biofilme**

Foi preparada uma solução do peptídeo antimicrobiano P34 com atividade de 1.600 UA/mL. Cem microlitros da solução foram adicionados aos poços da microplaca de poliestireno com 96 poços, volumes iguais de água destilada esterilizada foram adicionados como controle negativo. A microplaca foi deixada a temperatura ambiente por durante 4 h (tempo correspondente a



metade do período de processamento na maioria das indústrias de alimentos). Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com água estéril e 100 µl das culturas bacterianas (preparado conforme descrito no item 3.3) foram então, adicionados aos poços em quadruplicata, e o caldo TSB (Himedia®) estéril foi adicionado como um controle adicional para confirmar a esterilidade do meio. As placas foram incubadas durante 24 h a 37°C. A inibição da formação do biofilme foi avaliada utilizando o método do cristal violeta (Jadhav et al., 2013).

### **3.6.2 Erradicação do biofilme pré-formado**

O efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre o biofilme foi avaliado como descrito por Jadhav et al. (2013), com algumas modificações. Os biofilmes foram formados durante 24 h antes da adição do peptídeo antimicrobiano P34 com 1.600 UA/mL. A formação de biofilme foi realizada conforme descrito no item 3.3. As culturas foram adicionadas aos poços em quadruplicata e o caldo TSB (Himedia®) estéril foi adicionado como um controle adicional para confirmar a esterilidade do meio. A microplaca foi incubada durante 24 h a 37°C para permitir a fixação das células e formação de biofilmes. Após a incubação, as placas foram lavadas com água estéril para remover as células não aderidas e 100 µl da solução antimicrobiana foram adicionados a cada poço. Volumes iguais de água esteril foram adicionados ao controle negativo. Após o tratamento do biofilme pré-formado, as placas foram incubadas durante 4 h a temperatura ambiente. Após a incubação, os biofilmes foram avaliados quanto à capacidade de fixação utilizando o ensaio do cristal violeta.

### 3.6.3 Quantificação de inibição do biofilme

A absorbância média (DO 450nm) foi utilizada para a determinação da porcentagem de inibição dos biofilmes com o uso do peptídeo antimicrobiano P34 conforme a seguinte equação:

**Porcentagem de inibição=**  $100 - \left[ \frac{\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ poço tratado com P34}}{\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ poço controle sem P34}} \times 100 \right]$  (Jadhav et al., 2013).

### 3.7 Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes

A avaliação da atividade metabólica das células do biofilme foi determinada pela técnica de redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] - 2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma) de acordo com Denizote Lang (1986). O sal de MTT foi dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) em uma concentração de  $5\text{mg/ml}^{-1}$ . O meio de cultura dos poços da microplaca e o peptídeo antimicrobiano P34 foram removidos. Os poços foram lavados cinco vezes com solução salina a 0,85% e secos a temperatura ambiente. Cem microlitros da solução de MTT (5mg/mL) foram adicionados a cada poço, a microplaca foi incubada por 3 h a 37°C. O formazan de cor púrpura (obtido na hidrólise enzimática do MTT pelas desidrogenases de células vivas) foi dissolvido então em dimetil sulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida a 570nm usando uma Leitora de ELISA Espectrofotométrica (Anthos Zenyth 200). Esta avaliação foi realizada em duplicata.

A atividade metabólica foi avaliada em % de inibição através da equação:

**Taxa de inibição MTT** = {Abs controle (células não tratadas) - Abs das amostras/ Abs controle- Abs do branco} x 100.

A partir dos resultados da atividade metabólica, foi selecionado um isolado Gram-positivo (*S. aureus* F4-1) para dar segmento aos demais experimentos.

### **3.8 Curva de crescimento do isolado *Staphylococcus aureus* F4-1**

A curva de crescimento do isolado F4-1 de *S. aureus* foi realizada através do acompanhamento da densidade óptica (DO) no decorrer de 12 h para a determinação do início da fase logarítmica do microrganismo.

Foi utilizado 1 mL da suspensão do pré-inóculo do isolado crescido em 20 mL de caldo BHI (Himedia®) sob agitação de 180 rpm a 37°C por 24 h e avaliada a sua densidade óptica a 600nm. O pré-inóculo foi padronizado em uma densidade óptica de 0,469 de absorbância, após a padronização foi retirado 1% (0,500 µl) da solução e adicionado em frasco Erlenmeyer com 50 mL de caldo BHI (Himedia®). O frasco Erlenmeyer foi agitado e retirou-se 1 mL para avaliação da densidade óptica, considerando este como o tempo zero de crescimento. O Erlenmeyer foi incubado sob agitação de 180 rpm a 37°C e a cada hora foram coletados os pontos para construção da curva de crescimento através da densidade óptica (Figura 3). Esse teste foi realizado em duplicata.

### **3.9 Avaliação do efeito da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 sobre a cinética de crescimento do isolado *Staphylococcus aureus* F4-1**

Para este ensaio foi padronizada a concentração de  $10^3$  UFC/mL do isolado F4-1 (tolerância máxima exigida da amostra indicativa conforme RDC 12/2001 para *Staphylococcus coagulase positiva* (Brasil, 2001)) em 50 mL caldo BHI (Himedia®). Para cada teste (nisina e associação da nisina com peptídeo antimicrobiano P34) foram utilizados 4 Erlenmeyers com 50 mL de inóculo padronizado, que correspondiam as duas amostras controles e duas amostras tratadas.

Na primeira avaliação (ação da nisina), após a padronização, foram aplicados 5 mL (10%) de tampão de fosfato 10 mM pH 7,0 aos frascos Erlenmeyers das amostras controle. Nos Erlenmeyers das amostras tratadas foram aplicados 5 mL (10%) de nisina (Chr. Hansen®) na concentração de 12,5 g/L (concentração máxima permitida conforme DETEN/MS 29/1996 (Brasil, 1996)). Após aplicação foram coletadas alíquotas de 100 µl nos pontos 0 h, 8h e 24 h para realização de microdiluição até  $10^{-6}$  UFC/mL. Duas alíquotas de 20 µl de cada microdiluição foram inoculadas em ágar BHI (Himedia®) e incubadas em estufa a 37°C por 24 h para posterior contagem das UFC/mL (Milles & Misra, 1938). No decorrer das 24 h de avaliação, os Erlenmeyers das amostras foram incubados a 37°C com agitação de 180 rpm.

Na avaliação da associação da nisina com peptídeo antimicrobiano P34 foi realizado o mesmo procedimento para as amostras controles. Para as amostras tratadas foram adicionadas 2,5 mL do peptídeo antimicrobiano P34

com concentração de 1.600 UA/ml e 2,5 mL de nisina (Chr. Hansen®) na concentração de 12,5 g/L. As amostras foram incubadas sob as mesmas condições e também foram coletadas alíquotas dos pontos 0 h, 8h e 24 h para determinação das UFC/mL.

Este experimento foi realizado em duplicata para as duas condições avaliadas.

### **3.10 Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas culturas *Staphylococcus aureus* F4-1 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 utilizadas no biofilme polimicrobiano.**

A produção de exopolissacarídeos pelas bactérias *S. aureus* (F4-1), *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi determinada pelo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA) através do uso de 0,8 g de corante vermelho congo (Dinâmica®) para 1L de ágar BHI (Himedia®) e 50 g de sacarose (Freeman et al., 1989). Para tanto, as placas de ágar vermelho congo foram inoculadas e incubadas à 37°C por 48 horas. A produção de colônias rugosas e pretas foi utilizada para diferenciar as bactérias produtoras de exopolissacarídeos das não produtoras, as quais apresentam colônias lisas e vermelhas. Foi utilizada a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 para controle positivo.

### **3.11 Avaliação da formação de biofilme do *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A em meio de cultura caldo de carne de frango**

Este teste foi realizado para avaliação da influência do meio de cultura utilizado no protocolo laboratorial padronizado em relação às reais condições de cultura do isolado de *S. aureus* F4-1, e a verificação do comportamento da *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A quando cultivadas em meio com caldo de carne de frango. A formação do biofilme foi realizada individualmente para cada espécie e com a junção das três espécies visando obter um biofilme polimicrobiano.

A formação do biofilme se deu conforme descrito no item 3.3, e os microrganismos foram utilizados na concentração de  $10^8$  UFC/mL. No entanto, foram avaliados três diferentes meios de cultivo: caldo TBS com 1% de glicose, caldo TBS 1% de glicose juntamente com o caldo de carne (proporção 1:1) e o cultivo somente em caldo de carne.

O caldo de carne foi obtido do seguinte modo: Foram utilizadas 50 g de carne de coxa de frango resfriada e macerada (com pele e osso), submetida à cocção por 5 minutos em 500 ml de água. A carne foi desprezada e o caldo foi filtrado para remover as partículas maiores. O caldo foi então autoclavado a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos e utilizado para avaliação a formação de biofilme.

Este experimento foi realizado em duplicata.

### **3.12 Cinética de crescimento do isolado *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A, avaliados individualmente com o peptídeo antimicrobiano P34**

Após obtidos os resultados do período de início da fase logarítmica do microrganismo *S. aureus* F4-1 (que ocorreu entre 3 a 4 h após o início da

incubação) conforme demonstrado na Figura 3, foi determinada a cinética de crescimento com o peptídeo antimicrobiano P34 no decorrer de 24 h a 37°C e agitação de 180 rpm.

Para isso, foi padronizada a concentração de  $10^3$  UFC/mL em 50 mL de caldo BHI (Himedia®) que foi incubada a 37° e 120 rpm. Após atingir 3 h de incubação (início da fase logarítmica) foi adicionado ao frasco Erlenmeyer controle, 5 mL (10%) de tampão de fosfato 10 mM pH 7,0, e no Erlenmeyer da amostra tratada foi adicionado 5 mL (10%) do peptídeo antimicrobiano P34 na concentração de 1.600 UA/mL. Foram coletadas alíquotas de 100 µl dos pontos 0 h (equivalente a 3 h de crescimento) 2 h, 4 h, 6 h, 8h, 12 h e 24 h de tratamento para realização de microdiluição até  $10^{-6}$  UFC/mL. Duas alíquotas de 20 µl de cada microdiluição foram inoculadas em ágar BHI (Himedia®) e incubadas a 37°C por 24 h para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Foram utilizados quatro Erlenmeyers com 50 mL de inóculo que correspondiam a duas amostras controles e duas amostras tratadas.

Para as contagens das UFC/mL de cada amostra em cada ponto analisado, foi realizada a contagem da última diluição que apresentou de 20 a 200 colônias. As contagens foram aplicadas no cálculo: média da contagem de UFC x fator de diluição x 50 (fator de correção).

Este protocolo também foi utilizado para determinação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A frente ao uso do peptídeo antimicrobiano P34, porém com pontos de 0h, 8h e 24h. Todos os microrganismos foram avaliados em duplicata.

### **3.13 Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista de *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A**

Para este ensaio, primeiramente foi padronizada a concentração de  $10^3$  UFC/mL de cada isolado em caldo BHI (Himedia®). Após a padronização, os isolados foram adicionados em quantidade iguais a um tubo de ensaio até o volume total de 5 mL (o que equivale a 1,66 mL de cada isolado na concentração  $10^3$  UFC/mL). Para esta avaliação foram utilizados quatro tubos de ensaio com 5 mL de inóculo padronizado, que correspondiam a dois tubos de amostras controles e dois tubos de amostras tratadas.

Nos tubos das amostras controle foram adicionados 0,5 µl de tampão fosfato 10 mM pH 7 e nos tubos das amostras tratadas foram adicionados 0,5 µl do peptídeo antimicrobiano P34 na concentração de 1.600 UA/ mL. Após aplicação, foram coletadas alíquotas de 100 µl nos pontos 0 h, 8h e 24 h para realização de microdiluição até  $10^{-6}$  UFC/mL. Duas alíquotas de 20 µl de cada microdiluição foram inoculadas em meios seletivos (Ágar Sal Manitol- Himedia®, Ágar MacConkey-Himedia® e Ágar Sabouraud Dextrose-Acumedica® suplementado com clorafenicol a 1%) para a separação das espécies microbianas e incubadas em estufa a 37°C por 24 h para posterior contagem das UFC/mL. No decorrer das 24 h de avaliação, as amostras foram incubadas a 37°C com agitação de 180 rpm.



### **3.14 Microscopia Eletronica de Varredura do biofilme polimicrobiano**

Neste experimento, foi avaliada a capacidade do peptídeo antimicrobiano P34 em impedir a formação de biofilme sobre corpos de prova de aço inoxidável do tipo AISI 304 (2 cm x 2 cm, espessura desprezível). Os corpos foram preparados previamente por imersão em solução de detergente neutro a 0,3%, por uma hora, sendo posteriormente imersos em acetona a 100%, enxaguados com água destilada e pulverizados com etanol 70% para desinfecção. Após este processo de sanitização, foram submetidos a secagem por 2 h a 60°C e autoclavados a 121°C por 15 minutos (Rassoni & Gaylarde et al., 2000).

O corpo de prova controle foi submerso em água estéril por 4 h enquanto que o corpo de prova tratado foi submerso na solução do peptídeo antimicrobiano P34 na concentração de 1.600 UA/mL por igual período.

Para esta análise, foram utilizados dois tubos falcon, cada um continha 20 mL de uma solução de caldo TSB (Himedia®) com 1% de glicose e os microrganismos *S. aureus* F4-1, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A com concentração em torno de  $10^8$  UFC/mL igualmente distribuídos. Após o tratamento dos corpos de provas, os mesmos foram imersos no caldo polimicrobiano e incubados a 37°C e 180 rpm por 24 h. Após esse período, as superfícies com as células aderidas, tratadas e não tratadas, foram fixadas com glutaraldeído 3% (v/v) em tampão fosfato 0,2 M pH 7.2 por 8 dias. Após este processo, os materiais foram lavados três vezes com o mesmo tampão e desidratados num gradiente de acetona de 30% a 100% de concentração (v/v).

A seguir, o material foi processado em um secador de ponto crítico (Balzers CPD030; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Na sequência, partículas de ouro e platina foram depositadas sobre as amostras. A visualização foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS através de um Microscópio Eletrônico de Varredura JSM6060 disponível (JEOL, Tóquio, Japão).

### **3.15 Análise estatística**

O efeito do peptídeo antimicrobiano P34 aplicado antes da formação do biofilme e após o biofilme pré-formado, bem como a avaliação da atividade metabólica nesses tratamentos foram analisadas utilizando a análise de variância ANOVA modelo “one-way” seguida do teste de Tukey com uso do software Statistics 10.0. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Isolados bacterianos

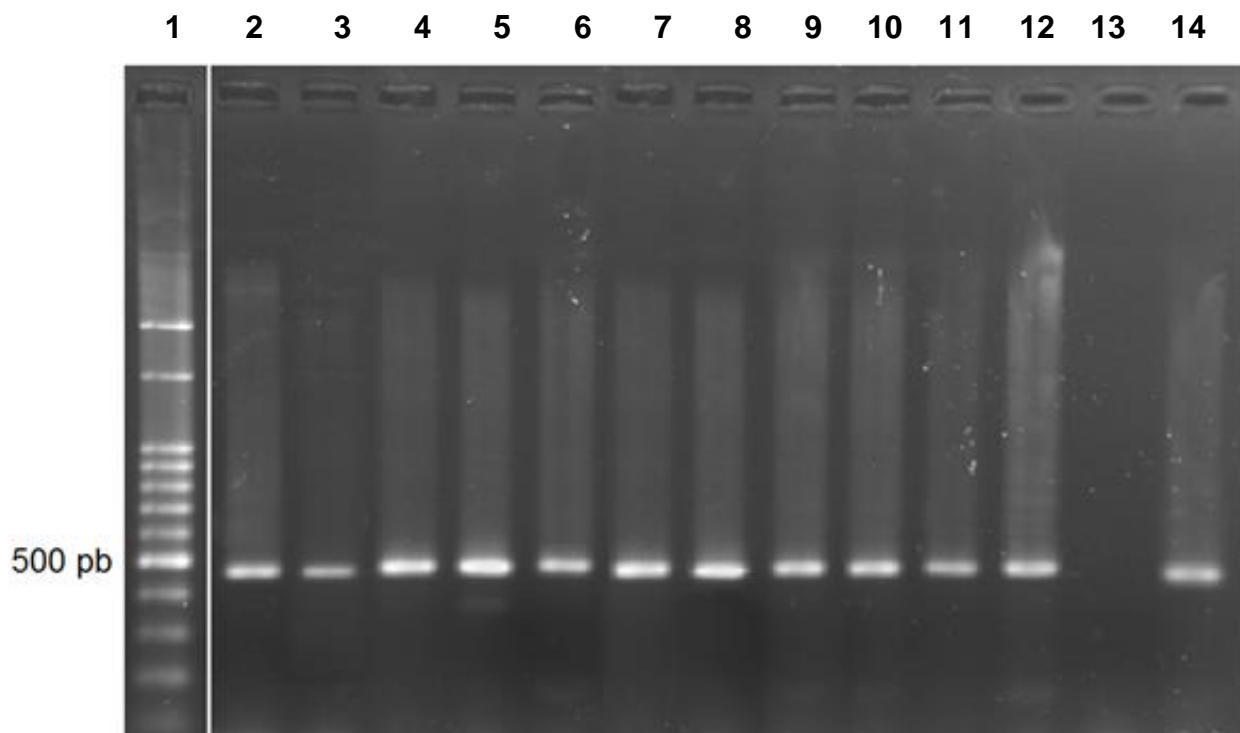
Os onze isolados de *S. aureus* provenientes de carcaça de frango foram identificados previamente por Pinto (2014) através da verificação da amplificação do gene *nuc*. Estes isolados foram reavaliados fenotipicamente onde apresentaram-se como cocos Gram-positivos, catalase e coagulase positivos e capacidade em fermentação do manitol, sendo assim, pertencentes à espécie *S. aureus*.

Os onze isolados de *E. faecalis* foram reavaliados fenotipicamente e demonstraram-se Gram-positivos de cadeias curtas, catalase negativos e capacidade de degradação da bili-esculina, deste modo, pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp.

### 4.2 Identificação genotípica de *Enterococcus faecalis* por PCR

Os onze isolados de *E. faecalis* provenientes de diferentes amostras alimentares já haviam sido identificados fenotipicamente por d'Azevedo et al. (2006) e Riboldi et al. (2009). Com a realização da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeo iniciadores espécie-específicos para *E. faecalis*, confirmou-se

o resultado fenotípico da espécie devido a amplificação do fragmento de DNA de 475 pb conforme o esperado (Figura 2)



**Figura 2.** Verificação da amplificação do produto de 475 pb em gel de agarose 1,5% com marcador molecular Ladder 100 pb (canaleta 1), isolados de *E. faecalis* (canaleta 2 a 12), controle negativo sem DNA (canaleta 13) e controle positivo com DNA extraído de *E. faecalis* ATCC 29212 (canaleta 14).

#### **4.3 Avaliação da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis***

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada através do método da microplaca conforme descrito por Stepanović et al., (2007). Os onze isolados de *S. aureus* de carcaça de frango já haviam sido avaliados por Pinto (2014) e classificados como fortes formadores de biofilme. Entretanto, dos onze isolados reavaliados neste estudo, sete (63,3%)

apresentaram-se como fortes formadores e quatro (36,36%) como moderados formadores. Em relação aos onze isolados de *E. faecalis*, os mesmos já haviam sido classificados por Medeiros et al., (2014) como fortes formadores de biofilme, entretanto, na presente avaliação, seis (54,54%) isolados apresentaram-se como fortes formadores e cinco (45,45%) como moderados formadores (Tabela 3). Para a classificação dos isolados quanto à capacidade de formação de biofilme, como critério de validação dos resultados, foram adotadas as médias cujo desvio padrão não excedesse a 10%.

**Tabela 3.** Classificação dos isolados quanto à capacidade da formação de biofilme.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Classificação	<i>Enterococcus faecalis</i>	Classificação
F2-1, F5-4, F5-5, F8-3	MF	A-8, C-11, E-2, E-4, G-4	MF
F2-3, F2-4, F3-3, F4-1, F5-1, F5-2, F5-3	FF	C-8, E-3, E-7, G-2, G-6, G-8	FF

MF: Moderado formador de biofilme; FF: Forte formador de biofilme.

#### 4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34 contra células planctônicas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*

Em relação aos isolados de *S. aureus*, cinco dos onze isolados demonstraram halo de inibição  $\geq 10.0$  mm, sendo que os demais isolados não se demonstraram sensíveis à solução antimicrobiana testada. O peptídeo antimicrobiano P34 foi capaz de inibir os onze isolados de *E. faecalis*, os quais apresentaram halo de inibição  $\geq 12.0$  mm, sendo deste modo, qualitativamente

mais sensíveis que o grupo dos isolados de *S. aureus*. Para a cepa indicadora *L. monocytogenes* ATCC 7644 utilizada como controle positivo foi observado halo de inibição de 13.6 mm (Tabela 4).

**Tabela 4.** Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34.

<b>Microrganismo indicador</b>	<b>Halo de inibição (mm)</b>	<b>Microrganismo indicador</b>	<b>Halo de inibição (mm)</b>
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	13.6		
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>		<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	
<i>S. aureus</i> F 2-1	0	<i>E. faecalis</i> A-8	12.0
<i>S. aureus</i> F 2-3	11.0	<i>E. faecalis</i> C-8	12.2
<i>S. aureus</i> F 2-4	0	<i>E. faecalis</i> C-11	13.5
<i>S. aureus</i> F 3-3	12.2	<i>E. faecalis</i> E-2	12.0
<i>S. aureus</i> F 4-1	13.0	<i>E. faecalis</i> E-3	12.5
<i>S. aureus</i> F 5-1	11.3	<i>E. faecalis</i> E-4	13.0
<i>S. aureus</i> F 5-2	0	<i>E. faecalis</i> E-7	13.3
<i>S. aureus</i> F 5-3	10.0	<i>E. faecalis</i> G-2	12.3
<i>S. aureus</i> F 5-4	0	<i>E. faecalis</i> G-4	12.5
<i>S. aureus</i> F 5-5	0	<i>E. faecalis</i> G-6	12.5
<i>S. aureus</i> F 8-3	0	<i>E. faecalis</i> G-8	12.0

#### **4.5 Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34**

#### 4.5.1 Inibição da formação do biofilme

O potencial de inibição da formação de biofilme foi realizado com os isolados de *S. aureus* e *E. faecalis* através do tratamento dos poços da microplaca por 4 h com o peptídeo antimicrobiano P34. Em relação ao grupo dos *S. aureus*, a média geral de inibição da formação de biofilme foi de 21%, sendo que, quando avaliados os onze isolados individualmente, apenas dois isolados apresentaram interferência na formação do biofilme com o uso da solução antimicrobiana, sendo que o percentual de inibição do biofilme foi de 40,51% para o isolado de *S. aureus* F-5-3 e 46,91% para o isolado F4-1 (Tabela 5). Estes resultados demonstram que houve uma diminuição da aderência de algumas células microbianas à superfície. Para os demais isolados de *S. aureus*, o percentual de inibição da formação dos biofilmes variou de 8,31% a 22,35% (Tabela 5).

Para os isolados do grupo dos *E. faecalis* a média geral de inibição da formação de biofilme através do tratamento da superfície com a solução antimicrobiana foi de 18,71%. Dos onze isolados de *E. faecalis* avaliados, os maiores percentuais de inibição da formação do biofilme foram: E-7 (29,40%), G-6 (29,96%) e C-11 (31,44%). Os demais isolados obtiveram percentuais de inibição da formação do biofilme que variou de 2,39% a 22,40% (Tabela 5).

Juntamente com a avaliação dos grupos foi também realizada a avaliação do comportamento da cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, utilizada como controle positivo devido a forte formação de biofilme no ensaio do cristal violeta. Esta cepa apresentou um percentual de inibição da formação de biofilme de 7,72% quando avaliada com o grupo dos *S. aureus* e 9,20% quando

avaliada com o grupo dos *E. faecalis*. Esse resultado não é estatisticamente significativo.

A média de inibição dos *E. faecalis* foi inferior ao grupo dos *S. aureus*. Entretanto, o perfil de inibição é semelhante, de modo que, em ambos os grupos, as células microbianas sofreram diminuição da aderência à superfície dos poços, quando aplicado o peptídeo antimicrobiano P34 (Tabela 5).

#### **4.5.2 Erradicação do biofilme pré-formado**

Ao analisar os resultados de erradicação do biofilme pré-formado, verificou-se que, para as espécies de *S. aureus*, a média geral de inibição do biofilme pré-formado foi de 15,70%, sendo que, os maiores percentuais de inibição do biofilme pré-formado foram observados para os isolados F2-1 (45,69%) e F4-1 (55,74%) (Tabela 5). O resultado referente ao isolado F4-1 ao ser comparado com o resultado no tratamento de inibição da formação do biofilme (cujo apresentou taxa de 46,91%) indica um perfil de similaridade de comportamento frente às duas condições avaliadas. Este perfil de similaridade também foi observado para o isolado F8-3, no entanto, este perfil não está presente para os demais isolados do grupo. Para o isolado *S. aureus* F2-1 a substância antimicrobiana apresentou potencial de inibição de 45,69% sobre o biofilme pré-formado. Este valor é superior ao percentual de inibição 22,19% obtidos quando a substância foi aplicada anterior a formação do biofilme (Tabela 5). Apenas o isolado *S. aureus* F2-4 apresentou o valor negativo de -1,77% nesta avaliação. Esse resultado indica que, de algum modo, as células bacterianas presentes no biofilme pré-formado foram estimuladas quando em



contato com a solução antimicrobiana testada. Para os demais isolados de *S. aureus*, os percentuais de inibição variaram entre 1,55% a 17,65% (Tabela 5).

Para o grupo da espécie *E. faecalis* a média geral de inibição do biofilme pré-formado obteve resultado negativo de -2,13%. Este resultado se deve ao fato de que, para a maioria dos isolados o comportamento foi semelhante ao isolado *S. aureus* F2-4, possivelmente pela estimulação das células bacterianas do biofilme. A possível estimulação reflete na média da densidade óptica dos poços tratados, sendo esta, superior a média dos poços não tratados com a solução antimicrobiana. Apenas 3 isolados de *E. faecalis* sofreram inibição, sendo estes o C8, E2 e G4 com resultados de 2,81%, 6,89% e 7,47% respectivamente. Entretanto, esses resultados foram inferiores quando comparados ao tratamento da superfície antes da formação do biofilme (Tabela 5).

Do mesmo modo que o tratamento anterior, juntamente com a avaliação dos grupos bacterianos foi também realizado a avaliação do comportamento da cepa *S. epidermidis* ATCC 35984. Esta cepa sofreu inibição de 5,62% quando avaliada com o grupo dos *S. aureus* e 7,46% quando avaliada com o grupo dos *E. faecalis*. Esse resultado não é estatisticamente significativo.

Correlacionando os dados dos tratamentos avaliados, a Tabela 5 apresenta os percentuais de inibição dos biofilmes isolados em relação ao tratamento avaliado. Ao comparar os dados dos dois tratamentos através da análise de variância, foi possível verificar que o grupo de *E. faecalis* demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação as duas condições

avaliadas. Este resultado é devido aos diferentes perfis de resposta frente à solução antimicrobiana, que, ao ser aplicada anteriormente a formação de biofilme ocasionou diminuição da aderência das células microbianas, enquanto que, ao ser aplicada sobre o biofilme pré-formado gerou estimulação do desenvolvimento celular. Os isolados do grupo de *S. aureus*, sofreram redução das células microbianas dos biofilmes, tanto com aplicação do peptídeo antimicrobiano P34 antes da formação do biofilme, quanto sobre o biofilme pré-formado. Deste modo, este grupo não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34.

Espécie bacteriana	Condição avaliada		Espécie bacteriana	Condição avaliada	
	T1 (%)	T2 (%)		T1 (%)	T2 (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>S. aureus</i> F 2-1	22,19	45,69	<i>E. faecalis</i> A-8	2,39	-2,84
<i>S. aureus</i> F 2-3	15,42	6,92	<i>E. faecalis</i> C-8	22,4	2,81
<i>S. aureus</i> F 2-4	18,77	-1,77	<i>E. faecalis</i> C-11	31,44	-7,23
<i>S. aureus</i> F 3-3	19,8	15,07	<i>E. faecalis</i> E-2	23,49	6,89
<i>S. aureus</i> F 4-1	46,91	55,74	<i>E. faecalis</i> E-3	18,61	-5,84
<i>S. aureus</i> F 5-1	22,35	5,33	<i>E. faecalis</i> E-4	13,15	-5,02
<i>S. aureus</i> F 5-2	14,64	8,99	<i>E. faecalis</i> E-7	29,4	-5,97
<i>S. aureus</i> F 5-3	40,51	9,62	<i>E. faecalis</i> G-2	23,49	-4,63
<i>S. aureus</i> F 5-4	9,35	8,57	<i>E. faecalis</i> G-4	13,4	7,47
<i>S. aureus</i> F 5-5	8,81	1,55	<i>E. faecalis</i> G-6	29,96	-7,47
<i>S. aureus</i> F 8-3	12,18	17,65	<i>E. faecalis</i> G-8	6,62	-1,65
Média de inibição	21,0	15,70	Média de inibição	18,71	-2,13

Cada bactéria foi avaliada individualmente e os valores são expressos em porcentagem de inibição. Valores negativos (-) indicam estímulo na formação de biofilme. T1: Avaliação do potencial de inibição da formação do biofilme; T2: Avaliação do potencial de erradicação do biofilme pré-formado.

#### 4.6 Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes

Além da inibição e estimulação da carga microbiana aderida à superfície, foi possível também, verificar a atividade metabólica das células que compõe os biofilmes nas duas condições avaliadas. No teste de inibição da formação do biofilme, dos onze isolados de *S. aureus*, com exceção do isolado F3-3, que demonstrou estar mais metabolicamente ativo nesta condição (-

97%), todos os demais sofreram redução da atividade metabólica, com porcentagens que variam de 41% (F5-3) a 95% (F2-3). A aplicação da solução antimicrobiana sobre o biofilme pré-formado apresentou efeito de inibição metabólica que variou de 14% (F3-3) a 94% (F5-5). Entretanto, para dois dos onze isolados de *S. aureus* avaliados (F2-3 e F5-3), o resultado foi inferior quando comparado a aplicação do peptídeo antimicrobiano P34 antes da formação do biofilme (Tabela 6). O isolado F2-4 apresentou-se com atividade metabólica estimulada (-38%), este resultado está de acordo com o obtido pela técnica do cristal violeta (-1,77%) mostrando correspondência entre o aumento do número de células e do metabolismo do biofilme.

Quando avaliados os onze isolados de *E. faecalis*, todos apresentaram resultados negativos em ambas as condições testadas, ou seja, embora o teste do cristal violeta tenha demonstrado a inibição de alguns isolados, o restante das células microbianas que ficaram aderidas aos poços encontravam-se metabolicamente ativas e estimuladas quando comparadas com o grupo controle (Tabela 6). Este resultado está evidenciado principalmente quando testada a condição de aplicação da solução antimicrobiana sobre o biofilme pré-formado por esta espécie, onde, oito dos onze isolados apresentaram valores negativos no teste do cristal violeta (Tabela 6).

A cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 também foi avaliada em ambas condições, sendo que, a solução antimicrobiana testada conseguiu inibir o metabolismo celular em 42% quando aplicada anteriormente a formação do

biofilme, e 51% quando aplicada sobre o biofilme pré-formado. Não houve diferença significativa entre as condições testadas para esta cepa.

Os resultados da inibição da atividade metabólica apresentados na Tabela 6 foram submetidos à análise de variância, onde confirmou-se a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as condições testadas para o grupo dos isolados da espécie *E. faecalis*. Isto deve-se ao fato de que, para a maioria dos isolados, a estimulação da atividade metabólica foi maior quando a solução antimicrobiana foi aplicada anterior a formação do biofilme. Para o grupo da espécie *S. aureus* não houve diferença significativa.

**Tabela 6.** Avaliação da inibição da atividade metabólica dos biofilmes.

Espécie bacteriana	Condição avaliada		Espécie bacteriana	Condição avaliada	
	T1 (%)	T2 (%)		T1 (%)	T2 (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>S. aureus</i> F 2-1	46	59	<i>E. faecalis</i> A-8	-248	-27
<i>S. aureus</i> F 2-3	95	86	<i>E. faecalis</i> C-8	-143	-23
<i>S. aureus</i> F 2-4	81	-38	<i>E. faecalis</i> C-11	-222	-2
<i>S. aureus</i> F 3-3	-97	14	<i>E. faecalis</i> E-2	-155	-17
<i>S. aureus</i> F 4-1	46	70	<i>E. faecalis</i> E-3	-348	-32
<i>S. aureus</i> F 5-1	61	71	<i>E. faecalis</i> E-4	-135	-17
<i>S. aureus</i> F 5-2	66	64	<i>E. faecalis</i> E-7	-388	-29
<i>S. aureus</i> F 5-3	41	23	<i>E. faecalis</i> G-2	-382	-27
<i>S. aureus</i> F 5-4	44	88	<i>E. faecalis</i> G-4	-89	-22
<i>S. aureus</i> F 5-5	93	94	<i>E. faecalis</i> G-6	-135	-25
<i>S. aureus</i> F 8-3	64	90	<i>E. faecalis</i> G-8	-52	-23
Média de inibição	61	70	Média de inibição	-155	-23

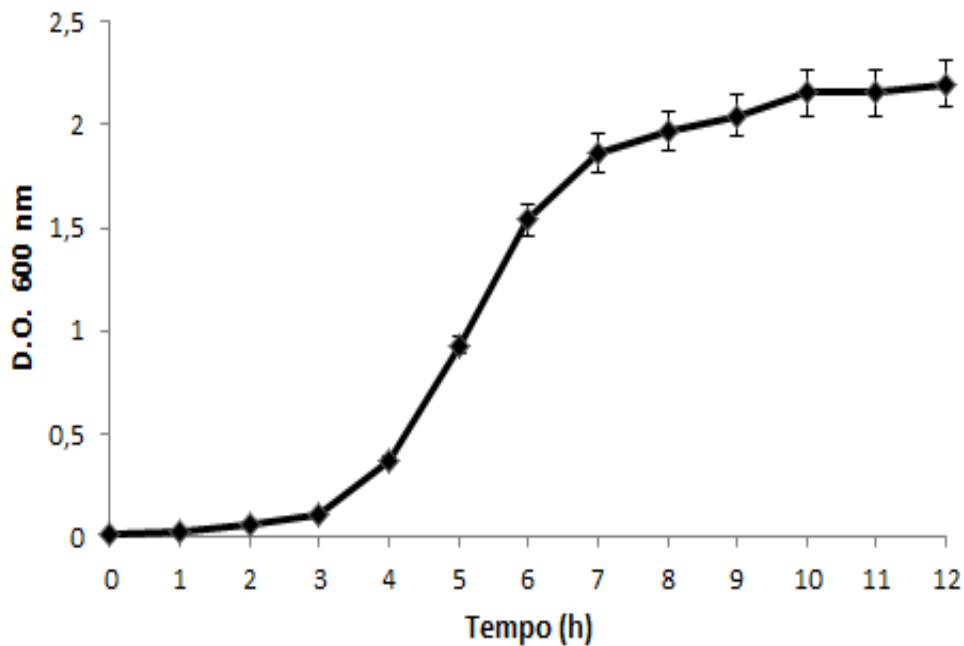
Cada bactéria foi avaliada individualmente e os valores são expressos em porcentagem de inibição da atividade metabólica. Valores negativos (-) indicam estímulo na formação de biofilme. T1: Avaliação de inibição da atividade metabólica com a substância antimicrobiana aplicada antes da formação do biofilme; T2: Avaliação do potencial de inibição da atividade metabólica sobre o biofilme pré-formado.

A partir dos resultados da atividade metabólica, foi selecionado o isolado de *S. aureus* (F4-1) para dar segmento as demais avaliações. A escolha deste isolado se deve ao fato de que, embora não possua resistência a antimicrobianos, possui genes para produção das enterotoxinas SEA, SEC e SED, que podem estar relacionadas a surtos de origem alimentar (Pinto, 2014).

#### 4.7 Curva de crescimento do isolado *Staphylococcus aureus*

##### F4-1

Com a realização da curva de crescimento, foi possível determinar o início da fase de crescimento exponencial do isolado de *S. aureus* F4-1, a qual ocorreu a partir das 3 h de incubação. Este resultado foi utilizado para dar segmento aos experimentos posteriores.

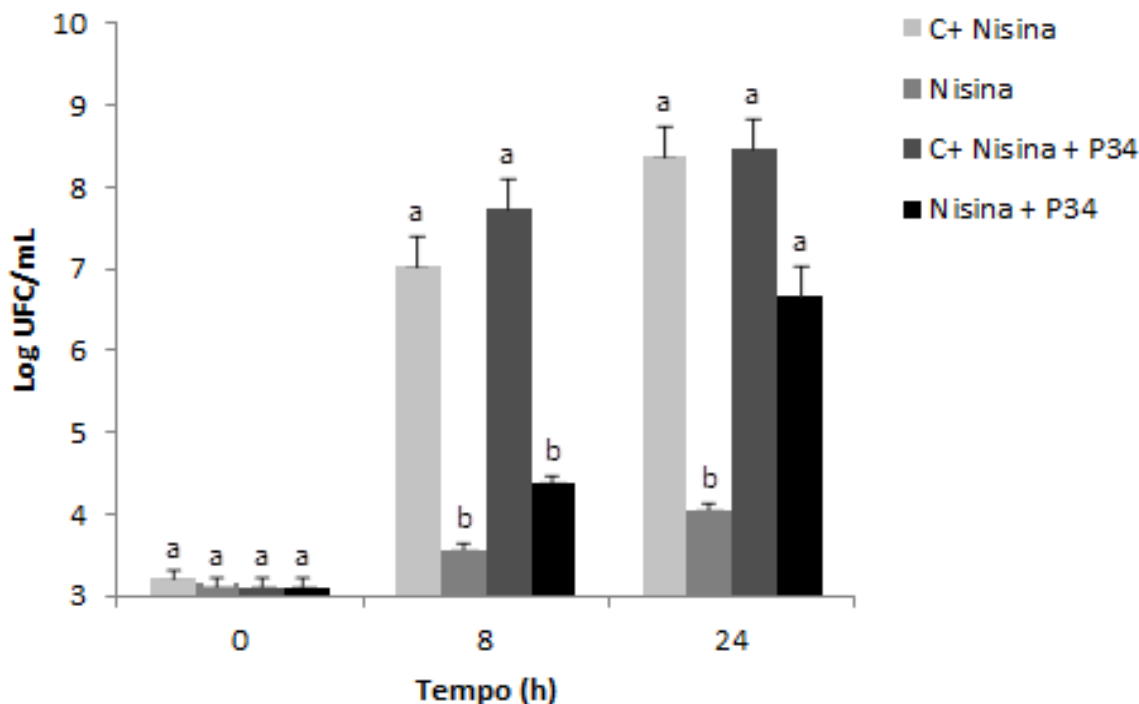


**Figura 3.** Curva de crescimento do isolado de *S. aureus* F4-1 monitorado durante 12 h em meio caldo BHI a 37°C. Os resultados representam a média da duplicata realizada.

#### **4.8 Avaliação do efeito da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 sobre o crescimento do isolado *Staphylococcus aureus* F4-1**

Na avaliação do desenvolvimento do isolado *S. aureus* F4-1, ao partir de uma concentração inicial de 3,23 log UFC/mL para a amostra controle e 3,17 log UFC/mL para a amostra tratada com nisina, foi possível observar que no tempo de 8 h, a nisina propiciou a redução de 3,48 log UFC/mL quando comparada ao seu controle não adicionado da solução. Ao mesmo tempo, a associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 partindo da concentração em torno de 3,09 log UFC/mL para amostra controle e amostra tratada, apresentou diminuição de 3,26 log UFC/mL (Figura 4). Ambas as condições avaliadas ao tempo de 8 h apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Às 24 h de avaliação, a concentração celular da amostra tratada com a nisina mostrou-se inferior em 4,34 log UFC/mL com relação ao seu controle, enquanto que, na amostra com associação de ambos antimicrobianos essa relação foi de 1,8 log UFC/mL. Os resultados apresentados na Figura 4 correspondem à média da duplicata realizada para as duas condições avaliadas.

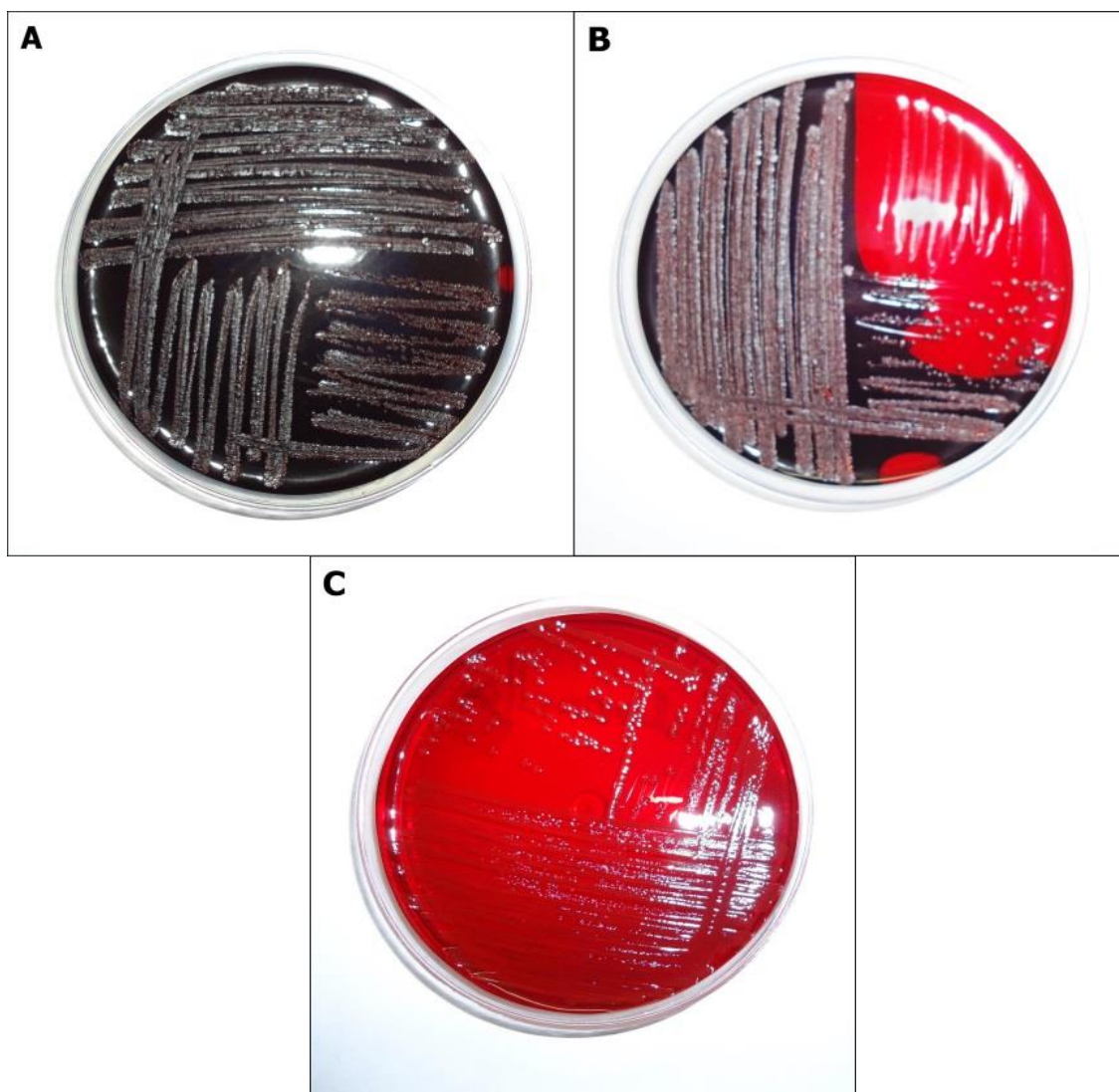




**Figura 4.** Avaliação da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34, frente ao isolado *S. aureus* F4-1, no decorrer de 24 h em meio caldo BHI a 37°C. Para um mesmo tratamento, letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle positivo (C+).

#### 4.9 Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas culturas *Staphylococcus aureus* F4-1 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 utilizadas no biofilme polimicrobiano

A capacidade de produção de exopolissacarídeos das espécies bacterianas avaliadas foi observada no ágar vermelho congo (CRA). A produção de colônias rugosas e pretas é indicativa da produção de exopolissacarídeos, entretanto, colônias incolores pertencem às cepas que não apresentam esta capacidade de produção (Figura 5).



**Figura 5.** Verificação da produção de exopolissacarídeos em meio CRA. A) controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984, B) *S. aureus* F4-1, C) *S. Enteritidis* ATCC 13076.

#### **4.10 Avaliação da formação de biofilme do *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A em meio de cultura caldo de carne de frango**

Ao avaliar a influência do meio de cultura sobre o biofilme monoespécie e polimicrobiano, foi possível observar que a composição do

meio exerce influência direta sobre o perfil de formação de biofilme. A combinação na proporção 1:1 do caldo TSB acrescido de 1% de glicose, com o caldo de carne de frango, evidencia que a diminuição da disponibilidade de glicose no meio afeta o desenvolvimento dos biofilmes produzidos pelas espécies de *Staphylococcus* sp.

Observou-se que o meio de cultura caldo TSB acrescido de 1% de glicose estimulou a formação do biofilme em relação ao meio de cultura formulado com caldo proveniente de carne de frango, alimento do qual foi isolado o *S. aureus* F4-1. Além disso, o meio de cultura caldo carne de frango mostrou diminuir a capacidade de formação de biofilme, reduzindo o *S. epidermidis* ATCC 35984 com perfil de forte formador em meio convencional a um não produtor de biofilme. O isolado *S. aureus* F4-1 teve seu perfil de formação alterado, porém, ainda foi capaz de produzir biofilme em meio de cultura não suplementado com glicose (Tabela 7). Conforme esperado, e condizente com o resultado obtido no item anterior (4.9), a cepa *S. Enteritidis* ATCC 13076 não foi capaz de formar biofilme em nenhum dos meios avaliados. A levedura *C. tropicalis* 72-A foi o único microrganismo que não sofreu influência nas condições avaliadas, mantendo-se como fraca formadora.

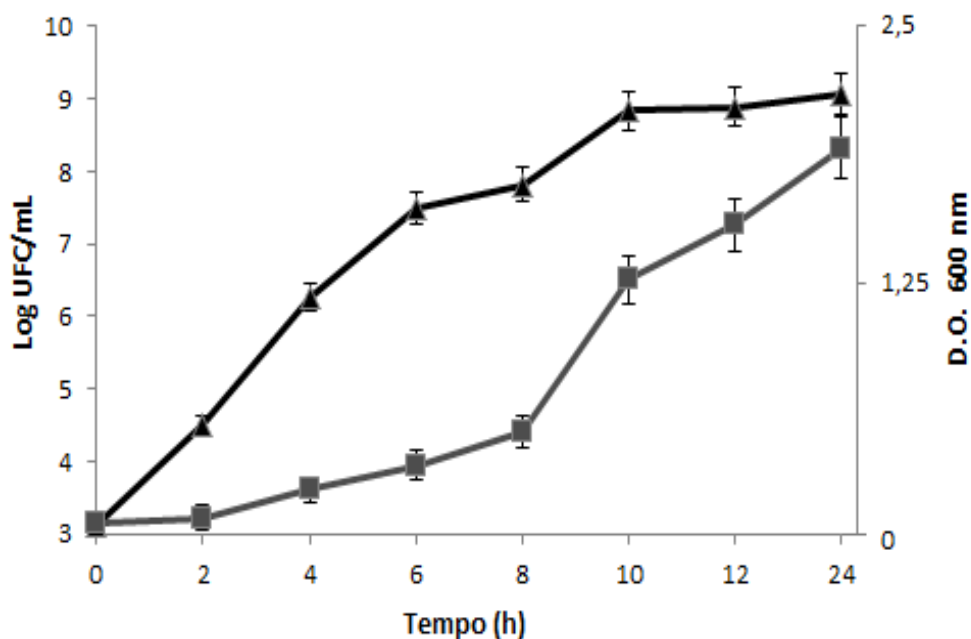
O biofilme polimicrobiano continha *C. tropicalis* 72-A, *S. aureus* F4-1 e *S. Enteritidis* ATCC 13076 em concentrações equivalentes, e também sofreu alteração no perfil de formação, passando de fraco formador em meio convencional a não formador em meio sem adição de glicose. Os resultados apresentados na Tabela 7 correspondem ao perfil verificado na realização da duplicata conforme os critérios estabelecidos por Stepanović et al., (2007).

**Tabela 7.** Classificação da formação de biofilme em diferentes meios de cultura.

<b>Microrganismo</b>	<b>TSB + 1% Glicose</b>	<b>TSB + Caldo de frango</b>	<b>Caldo de frango</b>
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	Forte	Moderado	Não produtor
<i>C. tropicalis</i> 72-A	Fraco	Fraco	Fraco
<i>S. aureus</i> F4-1	Forte	Moderado	Fraco
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	Não produtor	Não produtor	Não produtor
Biofilme polimicrobiano	Fraco	Fraco	Não produtor

#### **4.11 Cinética de crescimento dos isolados *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A, avaliados individualmente com o peptídeo antimicrobiano P34**

Considerando a seleção do isolado *S. aureus* F4-1 para a realização dos demais experimentos, esta cultura foi avaliada no decorrer de 24h com o peptídeo antimicrobiano P34. Ao aplicar a solução antimicrobiana sobre a cultura de células do isolado *S. aureus* F4-1 em uma concentração de 3,15 log UFC/mL, foi possível observar um efeito bacteriostático até as 6 h. Neste momento (6 h) observou-se que a amostra tratada encontrava-se com contagem de 3,95 log UFC/mL, enquanto que a amostra controle, neste mesmo período encontrava-se com contagem de 7,5 log UFC/mL. A partir das 6 h de incubação, verificou-se aumento no crescimento celular. Ao final de 24 h, a amostra controle encontrava-se com contagem de 9,07 log UFC/mL e a amostra teste com 8,32 log UFC/mL (Figura 6).



**Figura 6.** Avaliação cinética do isolado *S. aureus* F4-1 com o peptídeo antimicrobiano P34, durante 24 h em meio caldo BHI a 37°C. Amostra controle (triângulo) e a amostra tratada (quadrado).

Na avaliação dos demais isolados, quando submetidos à aplicação da solução antimicrobiana, observamos conforme a Tabela 8 que ambos não sofreram efeito bactericida e/ou bacteriostático. Sendo que, para a *S. Enteritidis* ATCC 13076, a alíquota das 24 h de incubação apresentou contagem de 9,07 log UFC/mL para a amostra controle e 8,36 log UFC/mL para a amostra tratada. O isolado de *C. tropicalis* 72-A obteve contagens de 7,36 log UFC/mL e 6,62 log UFC/mL para as mesmas condições.

A cultura *S. Enteritidis* ATCC 13076 e a *C. tropicalis* 72-A foram anteriormente avaliadas frente ao peptídeo antimicrobiano P34, através do teste de difusão em placas, onde, não apresentaram halo de inibição. De acordo com a Tabela 8, estas culturas quando submetidas às avaliações

cinéticas não demonstraram interferências no crescimento, este comportamento é similar ao apresentado no teste de difusão em placas. Os resultados apresentados nesta avaliação correspondem à média da duplicata realizada para cada microrganismo avaliado (Tabela 8).

**Tabela 8.** Cinética de crescimento do *S. aureus* F4-1, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A, frente ao peptídeo antimicrobiano P34 no decorrer de 24 horas.

Microrganismo	Tempo (h)	Controle	Tratado
<i>C. tropicalis</i> 72-A	0	3,60 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,59 ± 0,01 <sup>a</sup>
	8	5,74 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,55 ± 0,04 <sup>a</sup>
	24	7,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,62 ± 0,05 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> F4-1	0	3,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,02 <sup>a</sup>
	8	7,81 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,04 <sup>b</sup>
	24	9,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,36 ± 0,12 <sup>a</sup>
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	0	3,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,01 <sup>a</sup>
	8	7,76 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,70 ± 0,04 <sup>a</sup>
	24	9,07 ± 0,11 <sup>a</sup>	8,75 ± 0,08 <sup>a</sup>

Resultados da análise de variância. Para cada microrganismo e condição avaliada, letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.

#### 4.12 Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista de *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A

Quando as células microbianas dos três microrganismos foram avaliadas em suspensão de cultura mista (em meio de cultura caldo BHI), com presença ou ausência do peptídeo antimicrobiano P34, foi possível verificar que no decorrer de 24 h, o desenvolvimento da *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi superior quando comparada ao *S. aureus* F4-1 e a *Candida tropicalis* 72-A. Entretanto, ao comparar individualmente as contagens de cada espécie

microbiana com a contagem do respectivo controle sem adição da solução antimicrobiana, não verificou-se diferenças significativas de redução da contagem celular (Tabela 9).

**Tabela 9.** Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista com *S. aureus* F4-1, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A, em caldo BHI a 37°C no decorrer de 24 horas.

Microrganismo	Tempo (h)	Controle	Tratado
<i>C. tropicalis</i> 72-A	0	3,08 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,07 <sup>a</sup>
	8	4,75 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,77 ± 0,02 <sup>a</sup>
	24	6,61 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,59 ± 0,04 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> F4-1	0	3,49 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,07 <sup>a</sup>
	8	4,64 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,06 <sup>a</sup>
	24	6,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,70 ± 0,12 <sup>a</sup>
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	0	3,23 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,01 <sup>a</sup>
	8	7,51 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,80 ± 0,03 <sup>a</sup>
	24	9,14 ± 0,04 <sup>a</sup>	8,75 ± 0,05 <sup>a</sup>

Resultados da análise de variância. Para cada microrganismo e condição avaliada, letras iguais não diferem estatisticamente ( $p > 0.05$ ).

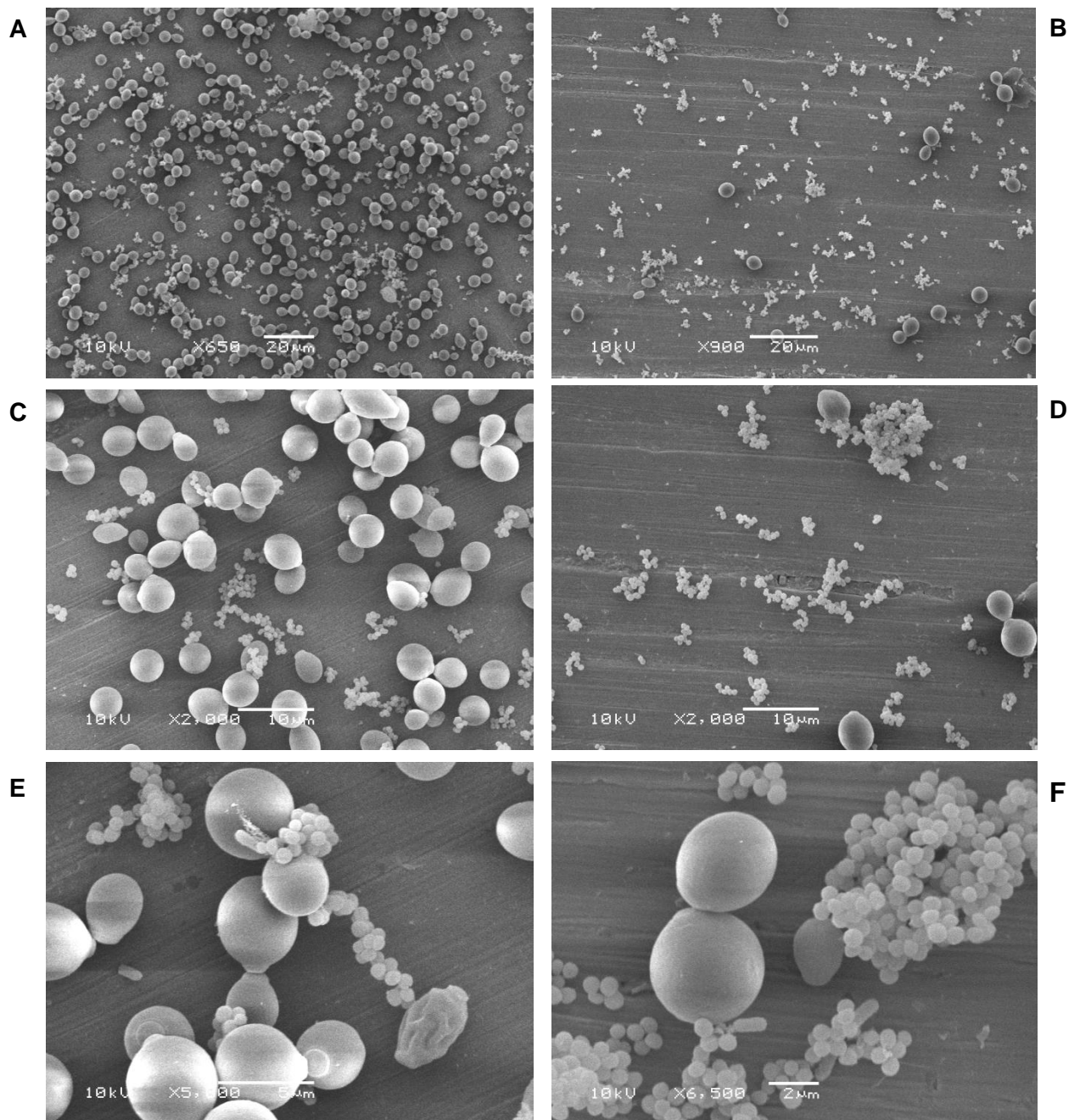
#### 4.13 Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme polimicrobiano

Sobre a superfície de aço inoxidável foi possível verificar diferença de padrão na disposição das células microbianas aderidas à superfície entre a amostra controle (Figura 7 a, c e e) e a amostra tratada com o peptídeo antimicrobiano P34 (Figura 7 c, d e f). Embora os microrganismos estivessem em concentrações igualitárias nas amostras, foi verificada menor frequência da presença da *S. Enteritidis* ATCC 13076 em ambas as condições, o que indica que sua incapacidade de adesão não sofreu influência na presença de outras espécies microbianas, este resultado já foi observado nos testes de avaliação

da adesão. Na amostra controle pode-se observar um biofilme irregular, sem grandes aglomerações celulares e com predomínio de células leveduriformes de *C. tropicalis* 72-A (Figura 7 a). Entretanto, na amostra tratada, a solução antimicrobiana testada reduziu a população de células leveduriformes em comparação à amostra controle (Figura 7 b e d). Além disso, houve uma mudança na disposição das células de *S. aureus* aderidas à superfície, onde, na amostra tratada apareceram em maiores aglomerados celulares em relação a amostra controle (Figura 7 e e f).

Além das células microbianas presentes, é possível visualizar a presença de ranhuras nos corpos de prova de aço inoxidável (Figura 7 d e f). Essas ranhuras dificultam a eficiência do processo de higienização da superfície, deste modo, servem como fonte de acúmulo de substrato, o que favorece a adesão de microrganismos e propicia a formação do biofilme.





**Figura 7.** Imagens do MEV para biofilme polimicrobiano com o *S. aureus* F4-1, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A, formados sobre superfície de aço inoxidável – (a, c e e) controle positivo; (b, d e f) superfície tratada com peptídeo antimicrobiano P34.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*

O presente estudo buscou reavaliar o potencial de formação de biofilmes pelas espécies *S. aureus* e *E. faecalis* isoladas de amostras alimentares. Estes isolados foram formadores de biofilme, embora, com diferenças no perfil de classificação para algumas linhagens. Os isolados de *S. aureus* provenientes de carcaça de frango foram também avaliados por Pinto (2014) e classificados como fortes formadores, porém, quando reavaliados neste estudo, quatro apresentaram-se como moderados formadores. Esta alteração de perfil de formação de biofilme ocorreu também com cinco isolados de *E. faecalis*, os quais foram previamente avaliados por Medeiros et al., (2014).

Alterações no perfil de formação de biofilme foram relatadas em um estudo realizado por Miladi et al., (2013), onde verificou-se aumento da produção de biofilme e da hidrofobicidade superficial de *L. monocytogenes* ATCC 19115 quando a amostra foi congelada a -20°C por até 10 meses. Este aumento foi atribuído a habilidade da *L. monocytogenes* em ajustar a fluidez da membrana quando submetida ao estresse do congelamento. Os isolados de *S.*

*aureus* e *E. faecalis* avaliados em nosso trabalho estavam estocados por um período superior a dois anos. Deste modo, comparativamente ao estudo de Miladi et al., (2013) também observamos diferenças no perfil de formação do biofilme. Embora não tenhamos estudado os mecanismos para avaliar o motivo da diferença quanto ao perfil de formação do biofilme, acredita-se que, para estas espécies, esta alteração se deve ao longo período de criopreservação, bem como, as condições da amostra quando congelada.

De modo geral, isolados de *Staphylococcus* sp. apresentam um perfil de formação de biofilme muito expressivo em indústrias de alimentos. Em estudo realizado por Ferreira et al., (2014) foi possível verificar a presença de genes envolvidos no processo de adesão, bem como, a produção de EPS por *Staphylococcus* sp. isolados de indústria de processamento de aves. Segundo Giaouris et al., (2013a), a aderência das células à carcaça, torna as células microbianas resistente aos procedimentos de lavagem e remoção de sujidades.

Em um trabalho realizado por Di Ciccio et al. (2015) avaliou-se a formação de biofilme de *S. aureus* isolados de diferentes superfícies industriais, alimentos e mãos de manipuladores. Os autores observaram que a formação de biofilme é influenciada pelas condições do ambiente industrial. Além disso, vários isolados foram produtores de biofilme em pelo menos um ensaio avaliado, inclusive o *S. aureus* proveniente das mãos do manipulador de alimentos. As condições higiênicas dos manipuladores de alimentos têm sido associadas à dispersão de cepas de *S. aureus* produtoras de biofilme (Gutiérrez et al., 2012; Souza et al., 2014). Em estudo realizado por Marino et al. (2011) foi observado que 92% dos isolados das mãos de manipuladores

apresentaram capacidade de formar biofilme. Este fator é preocupante, pois segundo Souza et al., (2014) pouco se sabe sobre o comportamento destas cepas quando expostas em ambientes similares ao encontrados nos diversos setores das indústrias de alimentos.

O conjunto de diversos fatores presentes no ambiente está relacionado com a habilidade da formação de biofilme e persistência bacteriana nas plantas de processamento.

Vários autores ao realizarem pesquisas com alimentos, bem como, em indústrias de alimentos têm reportado o isolamento de *E. faecalis* com habilidade em formar biofilme (Riboldi et al., 2009; Jahan & Holley 2014; Medeiros et al., 2014; Fernandes et al., 2015). De modo generalizado, a formação de biofilme por esta espécie bacteriana é influenciada por vários aspectos, como a temperatura, exposição a nutrientes e exposição à sanitizantes (Marinho et al., 2013; Seneviratne et al., 2013; Fernandes et al., 2015). Além disso, um estudo realizado por Jahan & Holley (2014) com isolados de *Enterococcus* sp. provenientes de carne crua e fermentada, evidenciou vários genes envolvidos na adesão microbiana, os quais eram mais frequentemente carregados pela espécie *E. faecalis* do que por outros *Enterococcus* sp. Segundo Jahan & Holley (2014), esta abordagem da grande variabilidade genética é o fator contribuinte da resistência e disseminação bacteriana de *E. faecalis* nos alimentos.

## **5.2 Atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano P34 contra células planctônicas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis***

O presente estudo avaliou a ação do peptídeo antimicrobiano P34 na concentração de 1.600 UA/mL frente à forma planctônica dos isolados de *S. aureus* e *E. faecalis*.

O espectro de ação do peptídeo antimicrobiano P34 foi avaliado por Motta et al., (2007a) com a mesma metodologia e grau de purificação empregada neste trabalho. Os autores ao avaliarem a atividade antimicrobiana frente a um isolado de *S. aureus*, não observaram halo de inibição no teste de difusão em placa. Entretanto, neste estudo, foi observado halo de inibição  $\geq 10$  mm em cinco dos onze isolados avaliados.

Embora o mecanismo de ação do peptídeo antimicrobiano P34 não esteja completamente elucidado, Motta et al., (2008) ao realizarem a microscopia eletrônica de transmissão em células de *L. monocytogenes* ATCC 7644 expostas a solução antimicrobiana, observaram a desestabilização da camada lipídica da membrana celular. Ao fazer a correlação dos dados apresentados por Motta et al., (2007a) com os obtidos no presente estudo, sugere-se que a diferença de susceptibilidade ao P34 apresentada pelos isolados de *S. aureus* possa estar relacionada com as características fenotípicas e genotípicas de cada microrganismo. Segundo Otto et al., (2012) a proporção dos ácidos teicóicos presentes na parede celular dos *Staphylococcus* sp também parece estar envolvida no processo de adesão bacteriana e de proteção contra ação dos peptídeos antimicrobianos.

O peptídeo antimicrobiano P34 foi mais eficiente quando avaliado sobre células planctônicas de *E. faecalis*, onde, todos isolados foram sensíveis a sua ação, apresentando halo de inibição  $\geq 12$  mm. Este comportamento foi semelhante ao observado por Lisboa et al., (2006) ao avaliarem o efeito de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* com concentração de 256 UA/mL sobre um isolado clínico de *E. faecalis*, onde apresentou um halo de inibição de 14 mm.

No entanto, Motta et al., (2007a) ao avaliarem o peptídeo antimicrobiano P34 com a mesma metodologia e grau de purificação empregada neste trabalho sob um isolado clínico de *E. faecalis*, não observaram presença de halo de inibição. Sugere-se que a diferença de comportamento observada por Motta et al., (2007a) em relação ao apresentado neste trabalho, possa ocorrer devido a características peculiares de cada isolado, e também, devido a sensibilidade dos isolados de *E. faecalis* utilizados neste estudo a antimicrobianos (Riboldi et al., 2009), sendo assim, mais propícios a apresentarem sensibilidade frente ao peptídeo antimicrobiano P34. Além disso, os resultados da atividade antimicrobiana obtidos sobre células planctônicas de *E. faecalis* podem estar relacionados com a ação anti-listeria observada por Motta et al., (2008) pois, ambas espécies microbianas são filogeneticamente relacionadas (Scallan et al., 2011). Até o momento não há um número expressivo de dados na literatura relacionando o *E. faecalis* e o peptídeo antimicrobiano P34.

### **5.3 Avaliação do potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 e da atividade metabólica dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis***

A substância antimicrobiana avaliada neste trabalho foi capaz de inibir a formação do biofilme e reduzir o biofilme pré-formado principalmente dos isolados de *S. aureus*, entretanto, para os isolados de *E. faecalis*, houve exceções quanto a estas habilidades.

A presença de um filme condicionante sobre a superfície é o estágio inicial da formação do biofilme (Breyers & Ratner, 2004) e serve para a adsorção de nutrientes e compostos orgânicos e inorgânicos que juntos auxiliam na adesão celular (Caixeta 2008; Sandasi et al., 201;). A adição do peptídeo antimicrobiano P34 antes da formação do biofilme pode eliminar parte das células planctônicas que formariam o biofilme e condicionar a superfície de modo a torná-la menos propícia à adesão celular.

Nos últimos anos, o uso de peptídeos antimicrobianos para condicionar superfícies de modo a prevenir a adesão microbiana demonstra ser uma abordagem útil em plantas de processamento de alimentos (Massani et al., 2008; Aminov et al. 2010; Héquet et al., 2011; Espita et al., 2012). Segundo Valle Gomes & Nitschke (2012), algumas moléculas antimicrobianas como a surfactina e os ramnolipídeos, tornam a superfície de materiais, como o poliestireno, menos hidrofóbica, e assim, reduzem a adesão celular. Deste modo, podem ser estudadas com a finalidade de controlar a adesão microbiana às superfícies e auxiliar na desestabilização de biofilmes. Recentemente, a imobilização de peptídeos antimicrobianos em biomateriais tem sido

investigada. Esses peptídeos apresentam vantagens como: propriedades bactericidas e fungicidas em baixas concentrações, menor propensão a promoção da resistência celular, e alta estabilidade com relação à alteração de temperatura e pH, mesmo quando imobilizados (Costa et al., 2011; Bagheri et al. 2012).

No presente estudo, foi necessário fazer a correlação dos ensaios do efeito antibiofilme e da atividade metabólica celular, para melhor compreensão do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre biofilmes monoespécie. Os ensaios do Cristal Violeta apontam que, de modo geral, esta substância pode gerar diminuição da adesão e da carga microbiana aderida a superfície. No entanto, conforme Koudhi et al. (2010), o ensaio de inibição realizado por esta técnica, cora todas as células aderidas, porém, não fornece informações sobre a viabilidade das células que ali estavam. Para isso foi realizado o ensaio MTT, o qual cora células viáveis aderidas à superfície.

As células microbianas em um biofilme diferem das células planctônicas devido à reduzida taxa metabólica, principalmente das células presentes na base da estrutura dos biofilmes, onde há limitada oferta de oxigênio e nutrientes. Segundo Lewis et al., (2012) o baixo metabolismo dessas células persistentes, garante a sua resistência ao tratamento com antimicrobianos, visto que, os antimicrobianos geralmente agem na fase de crescimento bacteriano, como síntese proteica, síntese de ácidos nucléicos e de parede celular.

Os resultados do ensaio MTT obtidos neste trabalho, comprovam que o peptídeo antimicrobiano P34 é capaz de inibir o metabolismo bacteriano



e reduzir significativamente a atividade metabólica dos isolados de *S. aureus*. Conforme Nawrocki et al., (2014) a diminuição do metabolismo celular pode ser explicada devido a maioria dos peptídeos antimicrobianos atuarem através da interação com a parede celular bacteriana, seguido de ruptura da membrana e morte celular. Essa explicação está de acordo com a observada por Motta et al., (2008) ao avaliarem o potencial de ação do peptídeo em questão sobre a parede celular de *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Contudo, apesar da maioria dos isolados de *E. faecalis* apresentarem inibição da formação do biofilme no teste do Cristal Violeta, os resultados do teste do MTT indicam que, o montante de células não inibidas pelo peptídeo antimicrobiano P34, apresentavam-se metabolicamente ativas, possivelmente pela estimulação gerada pela solução antimicrobiana aplicada. É possível que a estimulação celular tenha ocorrido devido a molécula antimicrobiana ter sido utilizada como substrato para a célula. Del Papa et al., (2007) relatam que um dos principais mecanismos de ação de *E. faecalis* contra peptídeos antimicrobianos é a produção de enzimas como metalopeptidases e proteases. A degradação enzimática resulta em perda da atividade antimicrobiana, gerando a hipótese de que, os compostos liberados no meio podem ser absorvidos pela célula e metabolizados. Além disto, Motta et al., (2007b) ao avaliarem a atividade do peptídeo antimicrobiano P34 frente as enzimas proteolíticas tripsina, papaína, pronase E, e proteinase K, na concentração de 2 mg/mL constataram perda do potencial antimicrobiano. Deste modo, sugere-se que a relação da produção de enzimas por *E. faecalis* possa resultar na ineficácia do antimicrobiano. Ainda, concordante com nosso

estudo, Negreiros et al., (2014) também verificaram estimulação metabólica dos mesmos isolados de *E. faecalis* ao aplicar como antimicrobiano o óleo essencial de *Heterothalamus* sp.

As propriedades antibiofilme dos peptídeos antimicrobianos parecem ser influenciadas por recursos estruturais como a carga microbiana, hidrofobicidade, e composição de aminoácidos. Essas influências não necessariamente coincidem com aquelas associadas com atividade antimicrobiana contra células planctônicas (Nawrocki et al., 2014).

A incapacidade em inibir o metabolismo celular dos isolados de *E. faecalis* pelo uso do peptídeo antimicrobiano P34, confirma que biofilmes são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que bactérias planctônicas.

#### **5.4 Avaliação do efeito da nisina e da associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 sobre o crescimento do isolado *Staphylococcus aureus* F4-1**

Neste estudo, a utilização da nisina frente à suspensão de células planctônicas do isolado *S. aureus* F4-1 foi capaz de propiciar a redução de 4,34 log UFC/mL quando comparada ao seu controle positivo ao final das 24 h de avaliação.

A nisina é uma bacteriocina naturalmente produzida por *Lactococcus lactis* em vários alimentos fermentados, especialmente em produtos lácteos. A nisina tem seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países e em 1988, o FDA conferiu-lhe o status de GRAS - (*Generally Recognized As Safe*), o que prevê a utilização deste aditivo sem causar nenhum dano a longo prazo, para a

saúde humana (Cotter et al., 2005). Esta bacteriocina é um peptídeo antimicrobiano, pertencente à classe I, e que possui ação principalmente sobre bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e inibição de esporos de *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp. (Arauz et al., 2009). Segundo Balciunas et al., (2013), o mecanismo de ação da nisina, tem como alvo a membrana que compõem a parede celular, através de um mecanismo de dupla ação que resulta na formação de poros na membrana e saída de compostos essenciais (K<sup>+</sup> íons, aminoácidos e ATP) através dos poros, gerando alterações na permeabilidade e, finalmente, a morte de celular.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o efeito bacteriostático provocado pela nisina frente ao isolado *S. aureus* F4-1 no decorrer nas primeiras 24 h de avaliação.

Ao avaliar o efeito da nisina sobre a concentração inicial de 5.0 log UFC/mL de *S. aureus* em amostra de leite, Felicio et al., (2015) verificaram que a utilização da nisina promoveu a extensão da fase lag do microrganismo em até 8 h, após este período, o microrganismo passou a se desenvolver. Este resultado foi semelhante ao encontrado em nosso estudo. O efeito de extensão da fase lag propiciado pela nisina sobre o *S. aureus* também têm sido relatado por outros autores (Pinto et al., 2011; Vongsawasdi et al., 2012). Sugere-se que este efeito pode estar associado a concentração celular da amostra, características fisiológicas e fatores de virulência do microrganismo avaliado, bem como, características físicas, como o tempo e a temperatura empregados no decorrer da avaliação.

A associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 manteve redução de 3,26 log UFC/mL até as 8 h de cultivo, e decaiu para 1,8 log UFC/mL ao final das 24 h de avaliação. Esta associação foi menos eficaz quando comparada ao uso da nisina. Quando Motta et al., (2007b) realizaram a caracterização parcial do peptídeo antimicrobiano utilizado neste estudo, com base na classificação de Klaenhammer (1993), sugeriu-se que esta substância do tipo bacteriocina, fosse pertencente a Classe I. Esta classe compreende peptídeos antimicrobianos termoestáveis e de baixo peso molecular, tendo a nisina como principal representante (Balciunas et al., 2013). Como descrito anteriormente, embora não completamente elucidado, é possível que o mecanismo de ação do peptídeo antimicrobiano P34 possa ocorrer de modo semelhante à ação da nisina. Sendo assim, sugere-se que a falta de sinergismo entre as duas substâncias possa ser gerada pela competitividade a um mesmo alvo de ação, o que ocasiona diminuição do efeito sobre as células de *S. aureus* F4-1.

Além disto, em um trabalho realizado por Cé et al., (2012), foi verificada a atividade antimicrobiana de filmes aplicados em alimentos, os quais continham a junção de quitosana com nisina, e quitosana com peptídeo antimicrobiano P34. Os resultados demonstram que para *S. aureus*, o desempenho da aplicação de quitosana associado o peptídeo P34 foi mais eficaz em comparação ao filme de quitosana adicionado de nisina. Este resultado sustenta a hipótese da possível competitividade entre a nisina e o peptídeo antimicrobiano P34 por um mesmo sítio de ação, dado que, o efeito sinérgico observado por Cé et al., (2012) foi possível devido às diferenças entre

a natureza química das substâncias e seus respectivos alvos na célula bacteriana.

Sant'Anna et al., (2013) avaliaram o efeito do peptídeo antimicrobiano P34 juntamente com a nisina sobre células de *L. monocytogenes* ATCC 7644. Os autores relatam aumento da atividade inibitória devido ao uso em associação. Segundo Nawrocki et al., (2014), os diferentes perfis de susceptibilidade a peptídeos antimicrobianos como o apresentado por Sant'Anna et al., (2013) em comparação ao nosso trabalho, pode estar relacionado a diversos fatores, como exemplo, a composição da membrana de cada microrganismo.

### **5.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas culturas *Staphylococcus aureus* F4-1 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 utilizadas no biofilme polimicrobiano**

O método do Ágar Vermelho Congo (CRA) é bastante utilizado para o estudo de biofilmes. Este método avalia a capacidade do microrganismo em produzir EPS como fator potencial para o desenvolvimento de biofilme (Jain & Agarwal, 2009). O método foi descrito por Freeman et al., (1989) e demonstra ser rápido e reprodutível. No entanto, a sensibilidade do método com base na avaliação visual das colônias tem sido alvo de estudos (Liberto et al., 2007; Hassan et al., 2011; Kaiser et al., 2013).

Jain & Agarwal (2009) verificaram a acurácia do ensaio em meio CRA para isolados de *S. aureus*, utilizando como comparação o método de microtitulação em placa. Ao avaliarem isolados comensais e patogênicos, os

autores relatam que o método em meio CRA apresentou grande sensibilidade na detecção de produção de biofilme por *S. aureus*.

Neste estudo, foi demonstrado que o isolado *S. aureus* F4-1, bem como, o controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 produziram exopolissacarídeos (Figura 6). Os *Staphylococcus* sp. podem mediar a adesão célula-célula usando um exopolímero denominado adesina intercelular polissacarídea (PIA). Este é o mecanismo utilizado na fase de acumulação do biofilme em *Staphylococcus* sp. onde as bactérias ficam envolvidas sobre a matriz autoproduzida (O'gara, 2007).

O método CRA ao detectar a produção de exopolissacarídeos, auxiliou na correlação quanto à adesão e formação do biofilme. Além disso, os resultados obtidos condizem com os dados do teste da formação de biofilme pelo método do Cristal Violeta. Para o isolado *S. aureus* F4-1 estas informações são também concordantes com a avaliação genotípica realizada por Pinto (2014).

#### **5.6 Avaliação da formação de biofilme do *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A em meio de cultura caldo de carne de frango**

As metodologias usualmente utilizadas para a detecção da formação de biofilme têm variado de acordo com o microrganismo avaliado e a composição dos materiais empregados (Jain & Agarwal 2009; Hassan et al., 2011; Awad et al., 2012, Kaiser et al., 2013). A metodologia semiquantitativa em microplacas tem sido amplamente empregada para detecção de biofilmes

*in vitro* (Stepanović et al., 2007; Jadhav et al., 2013; Pinto, 2014; Rossatto 2015). Entretanto, há a necessidade de realizar algumas modificações específicas, de modo a simular o máximo possível o ambiente encontrado em plantas de processamento de alimentos (Souza et al., 2014). Os EPS são importantes constituintes do biofilme, porém, a composição química desta matriz pode variar, conforme o meio. Conforme Wang et al., (2013) os EPS de um biofilme cultivado em meio suplementado com glicose são mais complexos do que os de biofilmes cultivados em meio simples como o meio caldo de carne.

Ao comparar os diferentes meios de cultura empregados neste estudo, é possível observar que a composição do meio tem influencia direta sobre a formação do biofilme. Para a metodologia com caldo TSB com 1 % de glicose, o isolado *S. aureus* F4-1 e o controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 foram fortes produtores de biofilme. Entretanto, esta capacidade foi alterada ao serem submetidos ao meio com caldo oriundo de carne de frango. Concordante com este trabalho, You et al., (2014) também observaram que *S. aureus* e *S. epidermidis* são capazes de formar biofilmes resistentes em presença de glicose. Os autores relatam que a formação de biofilmes em resposta à glicose pode ser mediada através do operon *ica*. Condizente com esta informação, Pinto (2014) ao avaliarem o isolado *S. aureus* F4-1, relataram a presença do gene *icaA*, Deste modo, sugere-se que o comportamento apresentado pelo isolado na presença e ausência de glicose possa estar relacionado as características genéticas propostas por You et al., (2014).

A cepa *S. Enteritidis* ATCC 13076 não foi capaz de formar biofilme em presença e ausência de glicose. Contudo, o isolado de *C. tropicalis* 72-A foi o único que não apresentou mudança no perfil da formação de biofilme. Há escassez de informações estabelecendo a relação entre o meio de cultura e a formação biofilme por esta espécie. Entretanto, Fujarte et al., (2015) ao avaliarem a influencia da glicose em biofilmes de *Candida* sp. descreve que *C. glabrata* é capaz de desenvolver biofilme em carência de condições nutricionais adequadas, mesmo em uma baixa concentração de glicose. Os autores propõem que esta condição provém do fato que *C. glabrata* foi adaptada a essas condições ao colonizar tecidos humanos. Essa relação também pode ser aplicada a *C. tropicalis* 72-A, pois este é um isolado clínico com alto perfil de resistência a antifúngicos (Bergamo et al., 2014).

Com base nos resultados de nosso estudo, preconiza-se que a detecção laboratorial do biofilme deve levar em considerações nutrientes disponíveis no ambiente e as espécies de microrganismos comumente presentes, para assim, obter resultados mais condizentes com a situação real encontrada nas plantas industriais de processamento de alimentos.

### **5.7 Cinética de crescimento dos isolados *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A, avaliados individualmente com o peptídeo antimicrobiano P34**

No presente estudo, é possível observar que o isolado *S. aureus* F4-1 quando avaliado frente ao peptídeo antimicrobiano P34 sofreu efeito bacteriostático em seu desenvolvimento até as 6 h. No entanto, este



comportamento não foi observado para as culturas *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *C. tropicalis* 72-A.

Peptídeos antimicrobianos como peptídeo antimicrobiano P34, são sintetizados nos ribossomos das células bacterianas, e, dependendo do microrganismo alvo, podem possuir efeitos bactericidas ou bacteriostáticos. Além disso, muitas vezes, estas moléculas apresentam estes efeitos sob um estreito espectro de bactérias (Nes et al., 2007; Balciunas et al., 2013; Güllüce et al., 2013). Lisboa et al., (2006) ao avaliarem o efeito de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* sobre células planctônicas de *L. monocytogenes* em concentração de  $10^6$  UFC/mL, também observaram efeito bacteriostático. De acordo com o estudo de Lisboa et al., (2006) e com os resultados de nosso trabalho, Deng et al., (2011), ao avaliarem a ação do peptídeo Subticin 112 produzido por *B. subtilis* frente a células de *S. aureus* CVCC 1885 *in vitro*, relataram que o composto apresentou efeito bacteriostático. Estes efeitos citados foram atribuídos à concentração e ao grau de pureza da bacteriocina, bem como, a concentração da célula indicadora.

Neste trabalho, o isolado *S. aureus* F4-1 havia apresentado halo de inibição quando submetido ao teste de difusão em placa, no entanto, quando avaliado em suspensão apresentou-se viável na amostra. Especula-se que esta diferença de comportamento, além das citadas acima, também pode ser atribuída às características e condições dos meios testados, como a agitação e a completa homogeneização da solução antimicrobiana no meio.

De acordo com Motta et al., (2007a), espectro de ação do peptídeo antimicrobiano P34 é limitado, tendo como alvo principalmente bactérias Gram-positivas e agindo contra bactérias Gram-negativas em presença de EDTA (Motta et al., 2008). Concordante com os resultados relatados por Motta et al., (2007a), neste estudo, também não foi observado qualquer efeito sobre o desenvolvimento da cepa *S. Enteritidis* ATCC 13076 e do isolado *C. tropicalis* 72-A. Em geral, a resistência a peptídeos antimicrobianos apresentadas pela maioria das espécies de *Salmonella* sp. se deve principalmente pela presença da membrana externa (Chalón et al., 2011; Band & Weiss, 2015). Segundo Brogden (2005) a célula reduz a fluidez da membrana externa, o que gera aumento nas interações hidrofóbicas e aumento da quantidade de Lipídeo A. Deste modo, a hidrofobicidade gerada, ocasiona diminuição da possibilidade de inserção do peptídeo antimicrobiano, bem como, a formação de poros na membrana, resultado na resistência da célula ao antimicrobiano.

É comum a resistência de células eucariotas a peptídeos antimicrobianos do tipo bacteriocinas. Lisboa et al., (2006) e Kaochamit et al., (2015), ao avaliarem a atividade de peptídeos antimicrobianos produzidos por diferentes espécies de *Bacillus* sp., não observaram inibição de *Candida* sp. e *Candida albicans*, respectivamente. Ainda, concordante com nosso estudo, quanto Motta et al., (2007a ) avaliaram o efeito do peptídeo antimicrobiano P34 contra células de *Candida* sp. também não foi observado efeito inibitório da cultura.

Devido ao mecanismo de ação do peptídeo antimicrobiano P34 não estar completamente elucidado, diferentes hipóteses podem ser associadas à

resistência apresentada por *C. tropicalis* 72-A. Em um estudo realizado por Veerman et al., (2007), verificou-se que a depleção de energia sobre a membrana de células de *C. albicans* em baixas temperaturas (4°C), altera a rigidez da membrana promovendo resistência a peptídeos antimicrobianos. Além da temperatura, fatores como o perfil de resistência apresentado pelo isolado, o meio de cultura utilizado e concentração e grau de purificação da substância podem estar relacionados.

#### **5.8 Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre cultura mista de *Staphylococcus aureus* F4-1, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Candida tropicalis* 72-A**

Na indústria alimentícia em geral, devido à variedade de superfícies que entram em contato com o alimento, é comum o desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos (Simões et al., 2010; Srey et al., 2013). Os efeitos das interações microbianas têm sido estudados, além disto, e a coexistência microbiana em um mesmo meio favorece interações sinérgicas que impactam a distribuição bacteriana. Estas interações multiespécies podem afetar a funcionalidade celular, a fisiologia e virulência microbiana (Gomes & Nitschke et al., 2012; Burmølle et al., 2014; Fernandes et al., 2015).

Na literatura atual, há escassez quanto a relatos da utilização individual de peptídeos antimicrobianos sobre culturas mistas de isolados alimentares. Tampouco, informações quanto ao peptídeo antimicrobiano P34. No entanto, semelhante ao nosso estudo, a impotência de diferentes compostos antimicrobianos quanto ao comportamento das espécies em

associação, seja em biofilmes ou meios mistos, também têm sido relatadas em outros trabalhos (Gomes & Nitschke et al., 2012; Waili et al., 2012; Giaoris et al., 2013b).

Em nosso estudo, observamos que não houve diferença no desenvolvimento microbiano da cultura mista tratada com o peptídeo antimicrobiano P34 em relação à cultura controle. A cepa *S. Enteritidis* ATCC 13076 e o isolado *C. tropicalis* 72-A da suspensão mista apresentaram desenvolvimento similar ao da avaliação individual. No entanto, o isolado *S. aureus* F4-1, quando submetido à cultura mista apresentou queda da taxa de crescimento celular, resultando em menor quantidade de células viáveis quando comparado a sua avaliação individual. Diferentes mecanismos podem ter contribuído para este comportamento, no entanto, a influência de outros microrganismos presentes no meio, pode ser dada como fator principal.

Semelhante ao nosso trabalho, Waili et al., (2012) ao avaliarem o sinergismo em cultura polimicrobiana de *S. aureus*, *Escherichia coli* e *C. albicans*, também observaram uma pequena redução no crescimento dos isolados quando cultivadas em conjunto. Esta redução foi especulada como o resultado da competição entre os isolados a uma quantidade limitada de nutrientes. Além disso, os autores Rendueles & Ghigo (2012) e Zhang et al., (2013) acrescentam que, alteração em fatores como a nutrição, exposição ao agente antimicrobiano, agregação bacteriana e exigências metabólicas dos organismos, afetam drasticamente a estrutura, dinâmica e, portanto, o comportamento daqueles que vivem em comunidade microbiana.

## **5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme polimicrobiano**

A fim de verificar a ação do peptídeo antimicrobiano P34 sobre um biofilme multiespécie, foi realizado um estudo de Microscopia Eletrônica de Varredura com o isolado *S. aureus* F4-1, considerado forte formador de biofilme, com a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076, não formadora de biofilme, e com a *C. tropicalis* 72-A, fraca formadora de biofilme e resistente a muitos antifúngicos. Segundo Trentin et al., (2011) a microscopia de um biofilme é uma técnica importante e que auxilia a aprimorar a compreensão do impacto qualitativo e quantitativo de antimicrobianos sobre os microrganismos.

Na micrografia exibida nas imagens b e d da Figura 7, é possível verificar a presença de irregularidades na superfície do corpo de prova. Conforme Awad et al., (2012) estas irregularidades microscópicas podem abrigar bactérias, ocasionando assim, um quadro de contaminação embutida a superfície do material, resistindo aos procedimentos de sanitização e tornando-se foco de disseminação microbiana.

A superfície de aço inoxidável tipo AISI 304 foi utilizada por ser comum em ambientes industriais e de processamento de alimentos. Este tipo de aço inoxidável possui uma resistência relativamente fraca à corrosão e natureza hidrofílica (Araújo et al., 2013), porém, quando condicionado com peptídeos antimicrobianos com propriedade biossurfactante, forma uma película orientado a cabeça hidrofílica para o meio e a cauda hidrofóbica para a superfície Meylheuc et al., (2006). Segundo Motta et al., (2008) o peptídeo antimicrobiano P34 tem natureza hidrofóbica, sugere-se então, que possam

ocorrer interações hidrofóbicas com as proteínas de membrana das células sensíveis.

Claramente, as micrografias confirmam a habilidade de *S. aureus* F4-1, e *C. tropicalis* 72-A em aderir a superfícies abióticas e formar um biofilme irregular sobre o aço inoxidável. No entanto, a presença de outros microrganismos não influenciou a aderência de *S. Enteritidis* ATCC 13076, sendo possível apenas, a visualização de algumas células isoladas.

A análise do biofilme tratado permitiu verificar alterações no perfil de adesão microbiana, sugerindo que, o efeito do peptídeo antimicrobiano P34 influencia a interação entre a célula e superfície. Esta observação pode ser devido à mudança na aderência das células do biofilme tratado com a substância antimicrobiana, o qual demonstrou menor adesão de células leveduriformes em relação à superfície controle.

A espécie *C. tropicalis* não têm sido estudada em biofilmes multiespécie. No entanto, há vários estudos sobre a interação de *C. albicans* com *S. aureus* (Harriot & Noverr 2009; Shirliff et al., 2009; Peters et al., 2010; Lindsay & Hogan 2014). Estes dois microrganismos são comumente encontrados em conjunto em diferentes tipos de infecções, onde mostram virulência aumentada e resistência quando infectam o hospedeiro (Harriot & Noverr 2009; Shirliff et al., 2009).

Mesmo o isolado clínico de *C. tropicalis* 72-A sendo um fraco formador de biofilme, na micrografia da amostra controle, é possível verificar grande quantidade de células leveduriformes e aglomerações de *S. aureus*. É presumível que o comportamento de *C. tropicalis* 72-A foi similar ao verificado

por Peters et al., (2010) que constatou que a forte interação entre estas espécies é devido ao tropismo de *S. aureus* para ligar-se a hifas de *C. albicans* e desenvolve biofilme. Esta ligação é mediada por proteínas dos filamentos, mas que também estão presentes em menor quantidade em células leveduriformes (Peters et al., 2012).

A micrografia da superfície tratada evidencia menor adesão de células leveduriformes. Sugere-se que o peptídeo antimicrobiano P34 seja capaz de formar uma película sobre a superfície do aço inoxidável, que de algum modo, interage com a superfície celular da levedura e diminui a adesão. A adesão do *S. aureus* F4-1 não foi influenciada, sendo este, um forte formador de biofilme, é possível dizer que peptídeo antimicrobiano P34 não apresentou interação sobre matriz extracelular polissacarídea secretada pelo isolado a ponto de inibir a formação do biofilme. Além disso, segundo Nawrocki et al., (2014) o *S. aureus* é capaz de produzir proteínas e secretar enzimas que realizam modificações na superfície celular e garantem a resistência a ação de peptídeos antimicrobianos.

## 6. CONCLUSÃO

Os isolados de *S. aureus* e *E. faecalis* provenientes de alimentos apresentaram habilidade de formar biofilme sobre a superfície de poliestireno da microplaca.

O peptídeo antimicrobiano P34 apresentou potencial antimicrobiano contra os isolados de *S. aureus* e *E. faecalis* provenientes de alimentos. No entanto, a capacidade antimicrobiana difere para culturas planctônicas e sésseis. Sendo que, a forma planctônica monoespécie foi mais sensível do que os biofilmes monoespécie avaliados.

O efeito antibiofilme foi verificado através da diminuição da adesão das células bacterianas e da erradicação do biofilme pré-formado dos isolados de *S. aureus*. Além disso, esta substância permitiu grande percentual de inibição da atividade metabólica destes isolados. Porém, grande parte dos isolados de *E. faecalis* apresentaram-se estimulados na presença do peptídeo antimicrobiano P34.

A associação da nisina com o peptídeo antimicrobiano P34 não apresentou efeito sinérgico sobre o isolado *S. aureus* F4-1, possivelmente, devido à similaridade do mecanismo de ação destes antimicrobianos.



A avaliação cinética mostrou que o peptídeo antimicrobiano P34 pode estender a fase lag de *S. aureus*, mas não apresenta interferência no desenvolvimento das células Gram-negativas e leveduriformes. Entretanto, não interfere no desenvolvimento de *S. aureus* quando em meio de cultura mista com outros microrganismos.

A composição do meio de cultura é fator essencial para a formação dos biofilmes, sendo a glicose uma importante fonte de nutriente para a promoção do biofilme de *S. aureus* F4-1 e *S. epidermidis* ATCC 35984.

Foi possível observar mudança na aderência das células leveduriformes e bacterianas dos biofilmes polimicrobianos submetidos à Microscopia Eletrônica de Varredura, indicando que as espécies avaliadas se comportam de maneira distinta quando em presença do peptídeo antimicrobiano P34.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho acrescentam informações para novos estudos, de modo a explorar o potencial antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 sobre diferentes espécies bacterianas e fúngicas. Ainda são necessários maiores estudos quanto à caracterização do peptídeo, como o sequenciamento da região N-terminal e o uso de ressonância nuclear magnética, para assim, melhorar a compreensão do mecanismo de ação em células planctônicas e sésseis de diferentes microrganismos.

Para tanto, segure-se novas abordagens, dentre elas:

- Finalizar os estudos de caracterização do composto antimicrobiano.
- Verificar os mecanismos genéticos que possam ser influenciados sob a ação do peptídeo antimicrobiano P34 em células de *S. aureus* e *C. tropicalis*.
- Analisar possíveis alterações nas características das superfícies abióticas e microbianas.
- Aplicar o peptídeo antimicrobiano P34 sobre diferentes superfícies presentes em indústrias de processamento de alimentos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNELA, K.; LUNDE´N, J.; KORKEALA, H. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **LWT – Food Science and Technology**, v.40, p.1041-1048, 2007.

ANTONELLO, V.S.; ZENKNER, F.M.; FRANÇA, J. et al. *Enterococcus gallinarum meningitis* in na immunocompetent host: a case report. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.52, n.2, p.111-112, 2010.

ALLISON, D.G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v.9, n.2, p.139-150, 2003.

AMINOV, R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v.1, p.1-7, 2010.

ARAUJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v.36, n.6, p.848-858, 2013.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G. et al. Nisin biotechnological production and aplicattion: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.146-154, 2009.

ARCURI, E.F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, v.9, p.40-45, 2000.

AUGUSTIN, M.; ALI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.18, p.55-64, 2004.

AWAD, A.M.; GHAZY, E.A.; ABO EL-ENIN S.A. et al. Electropolishing of AISI-304 stainless steel for protection against SRB biofilme. **Surface & Coatings Technology**, v.206, p.3165-3172, 2012.

BAGHERI, M.; BEYERMANN, M.; DATHE, M. Mode of action of cationic antimicrobial peptides defines the tethering position and the efficacy of biocidal surfaces. **Bioconjugate Chemistry**, v.23, n.1, p.66-74, 2012.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.1, p.1-10, 2000.

BALCIUNAS, E.M.; MARTINEZ, F.A.C.; TODOROV, S.D. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v.32, p.134-142, 2013.

BAND, V.I.; WEISS, D.S. Mechanisms of antimicrobial peptide resistance in Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v.4, p.18-41, 2015.

BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S.J. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: P.R. MURRAY, E.J. BARON, M.A. PFALLER, J.H. JORGENSEN, M.L. LANDRY. **Manual of clinical microbiology**. 9<sup>a</sup>ed. p.390-411, 2007.

BERGAMO, V.Z.; DONATO, R.K.; DALLA LANA, D.F. et al. M. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v.60, n.1, p.66-71, 2014.

BOARI, C.A.; ALVES, M.P.; TEBALDI, V.M.R. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.886-895, 2009.

BOLES, B.R.; HORSWILL, A.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**. v.4, n.4, p.e1000052, 2008.

BRASIL. **ANVISA** (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbcc6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbcc6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 20 nov. 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde** (1996). Portaria DETEN/MS nº 29 de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão do uso da Nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d7b1f68045a94e339c0d9fa9166895f7/Portaria+n+29+de+22+de+janeiro+de+1996.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde** (2009). Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2014.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; McQUILLAN, A.J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 254-262, 2006.

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

BROGDEN, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews**, v. 3, p.208-250, 2005.

BURMØLLE, M.; REN, D.; BJARNSHOLT, T. et al. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?. **Trends in Microbiology**, v.22, n.2, p.84-91, 2014.

CAIXETA, D.S.; SCARPA, T.H.; BRUGNERA, D.F. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.1, p.142-150, 2012.

CASAL, M.M.; CAUSSE, M.; SOLIS, F. et al. Investigación de las resistências a antimicrobianos em *Enterococcus faecalis*. **Especial Quimioterapia**, v.22, n.3, p.117-119, 2009.

CASSENEGO, A.P.V.; D'AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L. et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *enterococci* isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.480-488, 2011.

CASSENEGO, A.P.V.; ELLWANGER, J. D'AZEVEDO, P.A. et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de suabes cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.12, p.1433-1440, 2013.

CÉ, N.; NOREÑA, C.P.Z.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. **CyTA - Journal of Food**, v.10, n.1, p.21-26, 2012.

CENTER, K.J.A.C.; REBOLI, R.; HUBLER, G.L. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4660-4665, 2003.

- CHALÓN, M.C.; ACUÑA, L.; MORERO, R.D. et al. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods Are they the definite hurdle? **Food Research International**, v.45, p.735-744, 2012.
- CHEN, J.; ROSSMAN, M.L.; PAWAR, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT-Food Science and Technology**, v.40, p.249-254, 2007.
- CHEN, W.; LUO, L. Classification of antimicrobial peptide using diversity measure with quadartic discriminant analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v.78, n.1, p.94-96, 2009.
- CHIA, T.W.R.; GOULTER, R.M.; MCMEEKIN, T. et al. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v.26, n.8, p.853-859, 2009.
- CHMIELEWSKY, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, n.1, p.22-30, 2003.
- CITAK, S.; VARLIK, O.; GUNDOGAN, N. *Slime* production and DNase activity of *Staphylococci* isolated from raw milk. **Journal of Food Safety**, v.23, p.281-288, 2009.
- COOPER, I.R. Microbial biofilms: case reviews of bacterial and fungal pathogens persisting on biomaterials and environmental substrata. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p.807-817, 2010. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microbiology2/807-817.pdf>> Acesso em 23 jun. 2014.
- COSTA, F.; CARVALHO, I.F.; MONTELARO, R.C. et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 1431-1440, 2011.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.
- CRAGO, B.; FERRATO, C.; DREWS, S.J. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. **Food Microbiology**, v.32, n.1, p.202-205, 2012.
- CULLEBRAS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; PICAZZO, J.J. et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinopristin-dalfopristin: level of quinopristin-

dalfopristin resistance is not dependent on *erm* (B) attenuator region sequence. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v.66, p.73-77, 2010.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.261-289, 2004.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v.8, p.280-295, 1998.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, p.11-16, 2006.

DEL PAPA, M.F.; HANCOCK, L.E.; THOMAS, V.C. et al. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal of Bacteriology*, v.189, p.8835-8843, 2007.

DENG, K.; SU, L-F.; ZHANG, R-J. Bacteriostatic activity of bacteriocin Subtilin112 against *Staphylococcus aureus* CVCC 1885 *in Vitro* and *in Vivo*. **Agris**, v.44, n.13, p. 2830-2837, 2011.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the *van* alphabet and identification of *enterococci* and *staphylococci* at the species level by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.5857-5860, 2004.

DERESINSKI S. Meticillin resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, p.562-573, 2005.

DE VITA, M.D.; WADHERA, R.K.; THEIS, M.L. et al. Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. **Journal of Foodservice**, v.18, p.76-79, 2007.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v.50, p.930-936, 2015.

DONATO, S.T; SIDRIM, J.J.C (orient). **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente a Biologia Molecular em identificações discrepantes**. 86 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, Brasil. 2007.

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A.K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.19-24, 2005.

DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1438-1443, 2004.

DYKES, G.A.; SAMPATHKUMAR, B.; KORBER, D.R. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.1-10, 2003.

ESPITIA, P.J.P.; SOARES, N.F.F.; COIMBRA, J.S.R. et al. Bioactive Peptides: Synthesis, oroperties, and applications in the packaging and preservation of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p. 187-204, 2012.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature; genus *Enterococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

FELICIO, B.A.; PINTO, M.S.; OLIVEIRA, F.S. et al. Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.7, p.4364-4369, 2015.

FERNANDES, M.S.; YORIKA, K.D.; YOSHITERU, K.A. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v.200, n.4, p.5-12, 2015.

FERREIRA, A.A.; TETTE, P.A.S.; MENDONCA, R.C.S. et al. Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. **Food Science and Technology**, v.34, n.4, p.710-716, 2014.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em materia-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.291-296, 2005.

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



FRACALLANZA, S.A.P.; SCHEIDEGGER, E.M.D.; SANTOS, P.F.D. et al. Antimicrobial resistance profiles of *enterococci* isolated from poultry, meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.853-858, 2007.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H. et al. *Enterococci* in food: a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2, p.105-122, 2003.

FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.365-370, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: **Meeting Report**. Rome: Microbiological Risk Assessment Series No.14, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Code**: Recommendations of the United States Public Health Service. Washington: United States Department of Health a Human Services, 1997.

FORSYTHE, S.J. **The Microbiology of Safe Food**. 2<sup>a</sup> ed. Chichester: Wiley Blackwell, p.496, 2010.

FOSTER, T.J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.6, n.12, p.484-8, 1998.

FOULQUIÉ MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E. et al. The role and application of *enterococci* in food and health. **International journal of food microbiology**, v.106, n.1, p.1-24, 2006.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, p.872-87, 1989.

FUJARTE, I.S.S.; ROMERO, E.L.; LÓPEZ, G.E.R. et al. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. **BioMed Research International**, v.2015, p. 1-15, 2015.

FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, p.34-40, 2003.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.

GARCIA-ALMENDAREZ, B.E.; CANN, I.K.O.; MARTIN, S.E. et al. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v.19, p.670-680, 2008.

GIAOURIS, E.; CHORIANOPOULOS, N.; DOULGERAKI, A. et al. Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. **PLoS One**, v.8, n.10, p.1-14, 2013b.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M. et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v.S0309-1740, n.13, p.00217-9, 2013a.

GILBERT, P.; MC BAIN, A.J.; RICKARD, A.H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, n. 4, p.245-248, 2003.

GILMORE, M.S. Preface. In GILMORE MS; CLEWELL DB; IKE Y. editors. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

GIRAFFA, G. *Enterococci* in foods. **FEMS Microbiology**. v.26, p163-171, 2002.

GJALTEMA, A.; VINKE, J.L.; VAN LOOSDRECHET, M.C.,M. et al. Abrasion of suspended biofilm pellets in airlift reactors: importance of shape structure and particle concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.53, p.88-99, 1997.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food microbiology**, v.25, p. 668-675, 2008.

GOMES, B.C.; FRANCO, B.D.G.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. in foods. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p.1119-1125, 2010.

GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v.25, p.441-447, 2012.

GORWITZ, R.J.; KRUSZON-MORAN, D.; MCALLISTER, S. K. et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. **Journal of Infectious Disease**, v.197, n.9, p.1226-34, 2008.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y.Y. 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.

GUERRIERI, E.; NIEDERHAUSERN, S.; MESSI, P. et al. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. **Food Control**, v.20, p.861-865, 2009.

GÜLLÜCE, M.; KARADAY, M.; BARIŞ, Ö. Bacteriocins: promising natural antimicrobials. **Molecular Microbiology Group, Bacteriology and Molecular Biology Research Laboratory-Turkey**, p. 1016-1027, 2013.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food Industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.24, p.8547-8554, 2012.

HABIMANA, O.; HEIR, E.; LANGSRUD, S. et al. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.13, p. 4557-4559, 2010.

HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.9, p.3914-3922, 2009.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v.24, n.4, p.380-392, 2007.

HASSAN, A.; USMAN, J.; KALEEM, F. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v.15, n.4, p.305-311, 2011.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.4, n.36, p.815-36, 2012.

HÉQUET, A.; HUMBLLOT, V.; BERJEAUD, J.M. et al. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.84, p.301-309, 2011.

HOUDT, R.V.; MICHELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.4, p.1117-1131, 2010.

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

JAHAN, M.; HOLLEY, R.A. Incidence of virulence factors in *enterococci* from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25 °C and 37 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v.170, p.65-69, 2014.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of *Enterococci*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.462-478, 1994.

KAISER, T.D.L.; PEREIRA, E.M.; SANTOS, K.R.N. et al. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.75, n.3, p.235-239, 2013.

KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.15, n.5, p.308-320, 2004.

KHOCHAMIT, N.; SIRIPORNADULSIL, S.; SUKONB, P. et al. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. **Microbiological Research**, v.170, p.36-50, 2015.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.

KNETSCH, M.L.W.; KOOLE, L.H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. **Polymers**, v.3, n.1, p.340-366, 2011.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro, MEDSI, p.589-659, 2001.

KOUIDHI T.; BAKHROUF, A.B.Z. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. **Anaerobe**, v.16, p.566-571, 2010.

KUEHNERT, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; HILL, H.A. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. **Journal of Infectious Disease**, v.193, n.2, p.172-179, 2006.

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.

KUMAR, S.; PARVATHI, A.; GEORGE, J. et al. A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.527-53, 2009.

KURODA, M.; ITO, R.; TANAKA, Y. et al. *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.377, n.4, p.1102-1106, 2008.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M.A.; HEIR, E. et al. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p.283-290, 2003.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p.229-233, 2006.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

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.51, n.1, p.97-113, 2004.

LEQUETTE, Y.; BOELS, G.; CLARISSE, M. et al. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. **Biofouling**, v.26, n.4, p. 421-431, 2010.

LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.211, p.121-133, 2012.

LIBERTO, M.C.; MATERA, G.; QUIRINO, A. et al. Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. **Microbiological Research**, v.164, n.5, p.522-528, 2007.

LINDSAY, A.K.; HOGAN, D.A. *Candida albicans*: Molecular interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Fungal Biology Reviews**, v.28, p.85-96, 2014.

LISBOA, M.P.; BONATTO, D.; BIZANI, D. et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, v.9, n.2, p.111-118, 2006.

LÓPEZ, M.; SÁENZ, Y.; ROSO-BEZARES, B. et al. Detection of *Van A* and *Van B2* - Containing *enterococci* from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains CC17 and the new singleton ST425. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.172-178, 2009.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v.339, p.520-532, 1998.

MARCHAND, S.; DE BLOCK, J.; DE JONGHE, V. et al., Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *P. lundensis* and *P. fragi*, predominant milk spoilers isolate from Belgian raw milk samples. **Environmental Microbiology**, v.11, n.2, p.467-482, 2009.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J.M. et al. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.177-182, 2008.

MARIN, C.; HERNANDIZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry Science**, v.88, n.2, p.424-431, 2009.

MARINHO, A.R.; MARTINS, P.D.; DITMER, E.M. et al. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.2, p.423-426, 2013.

MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I. et al. Safety-related properties of *staphylococci* isolated from food and food environments. **Journal of Applied Microbiology**. v.110, n.2, p.550-561, 2011.

MARTINS, P.D.; DE ALMEIDA, T.T.; BASSO, A.P. et al. Coagulase-positive *staphylococci* isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.9, p.771-776, 2013.

MASSANI, M.B.; FERNANDEZ, M.R.; ARIOSTI, A. et al. Development and characterization of an active polyethylene film containing *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. **Food Additives and Contaminantes**, v.25, n.11, p.1424-1430, 2008.

MAYR-HARTING, A.; HEDJES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. In: Norris JB, Ribbons D. **Methods in microbiology**, v. 7, p.315–412, 1972.

MEDEIROS, A.W.; PEREIRA, R.I.; OLIVEIRA, D.V. et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p.327-332, 2014.

MEYLHEUC, T.; METHIVIER, C.; RENAULT, M. 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*. **Colloid and Surface B: Biointerfaces**, v.52, n.2, p. 128-137, 2006.

MILADI, H.; AMMAR, E.; SLAMA, R.B. et al. Influence of freezing stress on morphological alteration and biofilm formation by *Listeria monocytogenes*: relationship with cell surface hydrophobicity and membrane fluidity. **Archives of Microbiology**, v. 195, p.705-715, 2013.

MILLES, A.A.L.; MISRA, S.S. The estimation of bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-749, 1938.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2760-2764, 1998.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by *enterococci*. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1581-1588, 2007.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.63–71, 2002.

MOTTA, A.S.; CANNAVAN, F.S.; TSAI, S.M. et al. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. **Archives Microbiology**, v.188, p.367-375, 2007a.

MOTTA, A.S.; FLORES, F.S.; SOUTO, A.A. et al. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p.275-284, 2008.

MOTTA, A.S.; LORENZINI, D.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. **Current Microbiology**, v.54, p.282-286, 2007b.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Staphylococcus* e microrganismos relacionados. In: **Microbiologia Médica**, 5ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap.22, p.215-230, 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Staphylococcus* e cocos Gram-positivos relacionados. In: **Microbiologia Médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro, Mosby, p.209-223, 2009.

NAWROCKI, K.L.; CRISPELL, E.K.; MCBRIDE, S.M. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **Antibiotics**, v.3, p.461-492, 2014.

NEGREIROS, M.O. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. sobre *Enterococcus faecalis***. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2015.

NES, I.F.; YOON, S.S.; DIEP, D.B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. **Food Science and Biotechnology**, v.16, p.675-690, 2007.

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilms: "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v.76, n.2, p.149-163, 2007.

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

NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of *staphylococcal* virulence. **Molecular Microbiology**, v.48, n.6, p.1429-49, 2003.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in *staphylococci*. **Annual Reviews of Genetics**, v.42, p.541-564, 2008.

O'GARA J.P. *Ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.270, n.2, p.179-188, 2007.

ONOFRE, S.B.; COSTA, G.A. Presence of *Staphylococcus aureus* in the nasal cavity of children attending a public daycare center in Francisco Beltrão - Paraná - Brazil. **Advances in Infectious Diseases**, v.3 n.2, p.89-94, 2013.



OOGAI, Y.; MATSUO, M.; HASHIMOTO, M. et al. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.22, p. 8097-8105, 2011.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews Microbiology**, v.54, p.49-79, 2000.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. **Seminars in Immunopathology**, v.34, n.2, p.201-214, 2012.

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

OULAHAL-LAGSIR, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M. et al. “*Escherichia coli*-milk” biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes. **Biofouling**, v.19, p.159-168, 2003.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, n.9, p.577-588, 2007.

PARK, S.I.; DAESCHEL, M.A.; ZHAO, Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. **Journal of Food Science**, v.69, n.8, p. 215-221, 2004.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Socio microbiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, p.27-33, 2005.

PETERS, B.M.; JABRA-RIZK, M.A.; SCHEPER, M.A. et al. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* - *Candida albicans* dual-species biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.59, p.493-503, 2010.

PETERS, B. M.; OVCHINNIKOVA, E.S.; KROM, B.P. et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology**, v.158, p.2975-2986, 2012.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. A review. **Toxins**, v.2, p.2177-2197, 2010.

PINTO, J.B. **Expressão e caracterização do polimorfismo genético do sistema *quórum sensing agr*; suscetibilidade aos antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos e alimentares de *Staphylococcus aureus*.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande

do Sul, 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2014.

PINTO, M.S.; DE CARVALHO, A.F.; PIRES, A.C.S. et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v.21, p.90-96, 2011.

POETA, P.; COSTA, D.; SÁENZ, Y. et al. Characterization on antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal *Enterococci* of wild animals in Portugal. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, n.9, p.396-402, 2005.

POULSEN, L.L.; BISGAARD, M.; SON, N.T. et al. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.7, 2012. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/7/11-1754\\_article](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/7/11-1754_article)> Acesso em: 12 jun. 2014.

RASSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiol**, v. 61, n.1, p.81-85, 2000.

RENDUELES, O.; GHIGO, J.M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.5, p.972-989, 2012.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; D'AZEVEDO, P.A. et al. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.125-128, 2009.

ROCAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.JR.; SANTOS, K.R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of Endodontics**, v.30, p.315-320, 2004.

ROGERS, K.L.; FEY, P.D.; RUPP, M.E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.23, n.1, p.73-98, 2009.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C. et al. *Staphylococcus* species. In: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, 2<sup>a</sup>ed. Wiley-Blackwell, cap.14, p179-187, 2011.

ROSSATTO, F.C.P. **Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus* sp. e diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2015.

SALABERRY, S.R.S.; SAIDENBERG, A.B.S.; ZUNIGA, E. et al. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastites. **Microbial Pathogenesis**, v.85, p.35-39, 2015.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A.M. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied microbiology**, v. 50, p.30-35, 2010.

SANT'ANNA, V.; QUADROS, D.A.F.; MOTTA, A.S. et al. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p.1163-1167, 2013.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J. et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases Journal- CDC**, v.17, n.3, p.7-15, 2011.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M.T. et al. Formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advanced in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n.6, p.580-592, 2011.

SENEVIRATNE, C.; YIP, J.W.Y.; CHANG, J.W.W. et al. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. **Archives of Oral Biology**, v. 58, p.1327-1334, 2013.

SHIKONGO-NAMBABI, M. Control of bacterial contamination during marine fish processing. **Journal of Biology**, v.3, n.1, p.1-17, 2011.

SHIRTLIFF, M.E.; PETERS, B.M.; JABRA-RIZK, M.A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.299, n.1, p.1-8, 2009.

SIDHU, M.S.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from food industry. **Microbial Drug Resistance**, v.7, p.73-83, 2001.

SILLANKORVA, S.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J. et al. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage PhiS1: the influence of temperature, host growth phase and media. **FEMS Microbiology Letters**, v.241, n.1, p.13-20, 2004.

SILVA, D.S.; DE CASTRO, C.C. SILVA, F.S. et al. Antiviral activity of a *Bacillus* sp. P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.3, p.1089-1094, 2014.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; MACHADO, I. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants - evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v.84, p.338-345, 2006.

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

SIMÕES, M.; VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In Proceedings of the international conference processes in biofilms: **Fundamentals to Applications**, p.58-62, 2009.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v.14, n.9, p.389-397, 2006.

SOFOS, J.N.; GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. **Meat Science**, v.86, n.1, p.2-14, 2010.

SOUZA, E.L.; MEIRA, Q.G.S.; BARBOSA, I.M. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p.67-75, 2014.

SPEZIALE, P.; PIETROCOLA, G.; RINDI, S. et al. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. **Future Microbiology**, v.4, p.1337-1352, 2009.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HÁ, S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v.31, p.572-585, 2013.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V. et al. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by *staphylococci*. **APMIS**, v.115, p.891-899, 2007.

STEPANOVIĆ, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.428-432, 2004.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v.9, n.5, p.222-227, 2001.

TORDOROV, S.D.; WACHSMAN, M.; TOME, E. et al. Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, v.27, p.869-879, 2010.

TRENTIN, D.D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327-35, 2011.

TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W. et al. J. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**, v.8, n.6, p.e0066257, 2013.

TSUNEDA, S.; AIKAWA, H.; HAYASHI, H. et al. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, v.223, p.287-292, 2003.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIQUEL, H. et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocines in *Enterococcus* from artesian foods of animals origin. **Food Control**, v.20, n.4, p.381-383, 2009.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.24, p.604-620, 2006.

VAUCHER, R.A.; MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Evaluation or the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. **Cell Biology International**, v. 34, p. 317-323, 2010.

VEERMAN, E.C.I.; VALENTIJN-BENZ. M.; NAZMI, K. et al. Energy depletion protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides by rigidifying its cell membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.26, p.18831-18841, 2007.

VIEIRA, M.J.; MELO, L.; PINHEIRO, M.M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, v.7, p.67-80, 1993.

VONGSAWASDI, P.; NOPHARATANA, M.; SUPANIVATIN, P. et al. Effect of nisin on the survival of *Staphylococcus aureus* inoculated in fish balls. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v.5, n.1, p.52-60, 2012.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, 3366-3370, 2002.

- WAILI, N.A.L.; GHAMDI, A.A.L.; ANSARI, M.J. et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v.9, n.9, p.793-800, 2012.
- WALENCKA, E.; ROSALSKA, S.; SADOWLSKA, B. et al. The influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on *Staphylococcal* adhesion and biofilm formation. **Folia microbiologica**. v.53, n.1, p.61-66, 2006.
- WALLIN-CARLQUIST, N.; MARTA, D.; BORCH, E. et al. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p.69-74, 2010.
- WANG, H.; DING, S.; WANG, G. et al. *In situ* characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.167, p.293-302, 2013.
- WERTHEIM, H.F.; VOS, M.C.; OTT, A. et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet**, v.364, n.9435, p.703-705, 2004.
- WHIPPS, J.M.; HAND, P.; PINK, D.A.C. et al. Chapter 7: human pathogens and the phyllosphere. **Advances in Applied Microbiology**, v.64, p.183-221, 2008.
- WINKELSTRÖTER, L.K.; GOMES, B.C.; THOMAZ, M.R.S. et al. Lactobacillus sakei 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v.22, p.1404-407, 2011.
- YARWOOD, J.M.; BARTELS, D.J.; VOLPER, E.M. et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology** v.186, p.1838-1850, 2004.
- YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, n.11, p.1620-1525, 2003.
- YOU, Y.; XUE, T.; CAO, L. et al. *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. **International Journal of Medical Microbiology**, v.304, p.603-612, 2014.
- ZAHOOR, S.; BHATIA, A. Bacteria: Silent Killers in Food. **Science Reporter**, p.33-34, 2007.

ZHANG, W.; SILEIKA, T.; PACKMAN, A.I. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.84, n.2, p.344-354, 2013.

ZOLETTI, G.O.; SIQUEIRA, J.F.JR.; SANTOS, K.R. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. **Journal of Endodontics**, v.32, p.722-726, 2006.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.125-148, 1994.

ZOUHIR, A.; HAMMAMI, R.; FLISS, I. et al. A New Structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. **Protein Journal**, v.29, p.432-439, 2010.

ZOU, L.K.; WANG, H.N.; ZENG, B. et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologic**, v.34, p.73-80, 2011.