

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA – FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS -
PPGCV

**CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR CEPAS DE *Salmonella*
enterica subsp. *enterica* PROVENIENTES DE FÁBRICA DE RAÇÃO SUÍNA E
AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILMES**

VANESSA LAVINIKI

PORTO ALEGRE, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA – FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS -
PPGCV

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR CEPAS DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PROVENIENTES DE FÁBRICA DE RAÇÃO SUÍNA E AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAS SOBRE BIOFILMES

Autor: Vanessa Laviniki*

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciências Veterinárias, Especialidade na área de Bacteriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

PORTO ALEGRE, 2018.

*Médica Veterinária MSc

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Laviniki, Vanessa

Capacidade de formação de biofilmes por cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes de fábrica de ração suína e ação de óleos essenciais sobre biofilmes. / Vanessa Laviniki. -- 2018.

101 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Biofilme. 2. *Salmonella*. 3. Fábrica de Ração. 4. Óleos essenciais. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Título.

Vanessa Laviniki

Capacidade de formação de biofilmes por cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes de fábrica de ração suína e ação de óleos essenciais sobre biofilmes.

Aprovado em 26 de março de 2018.

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora e Presidente da Comissão

Dr. Samuel Paulo Cibulski

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Membro da Comissão

Dra. Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Membro da Comissão

Dra. Débora da Cruz Payão Pellegrini

Universidade Federal do Pampa – Curso de Medicina Veterinária
Membro da Comissão

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Salete e Inácio Laviniki,
pelo apoio incondicional...*

Agradecimentos

Agradeço a professora Dra. *Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso* pela orientação, ensinamentos e principalmente pela compreensão e paciência que tiveste comigo durante estes quatro anos de doutorado em que passamos juntas.

Ao Prof. *Dr. Alexandre José Macedo* por compartilhar seus conhecimentos em meus momentos de dúvidas.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS: *Gustavo Sambrano, Tatiana Vieira, Gabriela Werlang, Caroline Pissetti, Cláudia Navarrete, Agnes Souza, Karoline Zenato* e *Thaís Ausani* por compartilharmos experiências e momentos de descontração.

À dona Berna, pelo carinho e amizade.

Aos colegas *Eduardo de Freitas Costa* e *Ana Paula Serafini Poeta* pelo auxílio com as análises estatísticas.

Ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da UFRGS pela permissão pelo uso do leitor de ELISA.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*) e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS (*PPGCV*) pela bolsa de estudo durante o período de doutorado.

Aos meus pais *Inácio* e *Salete*, que mesmo estando longe, pelo apoio e compreensão durante estes anos. Serei eternamente grata a vocês por sempre me incentivarem a batalhar por meus sonhos e estarem ao meu lado.

À todos, obrigada!

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR CEPAS DE *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PROVENIENTES DE FÁBRICA DE RAÇÃO SUÍNA E AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILMES.

Autora: Vanessa Laviniki¹

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

RESUMO

A ração animal tem sido considerada como um importante veículo para introdução de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* em granjas de suínos. Em fábricas de ração, a principal fonte de contaminação por *Salmonella* é a entrada de ingredientes contaminados ou a persistência de cepas no ambiente de processamento. Além disso, *Salmonella* possui a habilidade de formar biofilme em diversas superfícies abióticas, o que pode contribuir para sua persistência nesses ambientes. Neste sentido, os objetivos deste estudo foram: *i.* determinar fenotipicamente a formação de biofilme em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes de fábrica de ração suína; *ii.* confirmar a presença dos principais genes associados aos fenótipos de formação de biofilme; *iii.* avaliar o efeito do óleo essencial de orégano (*Oreganum vulgare*), óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e seus compostos majoritários carvacrol e timol, na inibição da formação de biofilme e *iv.* avaliar o efeito de óleo essencial de orégano (*Oreganum vulgare*), óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), seus compostos majoritários carvacrol e timol e ácidos orgânicos (acético e láctico) na remoção de biofilme maduros de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Sendo assim, 54 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas a partir de quatro fábricas de ração, pertencentes a diferentes sorovares, foram avaliadas quanto a sua capacidade de formação de biofilme através de ensaios fenotípicos de morfologia celular, formação de película na interface ar-líquido e formação de biofilme em microplacas de poliestireno. Além disso, pesquisou-se a presença de genes responsáveis pela formação de biofilme e avaliou-se os efeitos antibacteriano e antibiofilme de diferentes agentes antimicrobianos através de ensaios em microplacas de poliestireno, contagem de UFC em cupons de flandres e microscopia confocal. Todas as cepas apresentaram morfotipo *rdar* a 28° e morfotipo *saw* a 37°C. Destas 81,48 % (44/54) pertenceram aos perfis fenotípicos 1, 3 e 4, os quais são moderadamente formadores de biofilme a 28°C, não formam biofilme a 37°C e diferem quanto a produção de película na interface ar-líquido. Enquanto que 14,81 % (9/54) pertenceram aos perfis 2, 5, 6, 7 e 8. Os genes pesquisados (*csgD*, *fimA*, *adrA* e *bapA*) foram encontrados em todas as cepas. Após os ensaios fenotípicos para formação de biofilme, quatro cepas pertencentes ao sorovar Montevideo e que demonstraram possuir fenótipo para formação de biofilme *in vitro* foram usadas para estudar o efeito antimicrobiano e antibiofilme de diferentes agentes antimicrobianos. O óleo essencial de orégano, óleo essencial de tomilho e o composto majoritário timol foram capazes de inibir o crescimento de células planctônicas de todas cepas estudadas com CIM de 0,05 %, enquanto que o composto majoritário carvacrol foi capaz de inibir o crescimento com CIM de 0,025 %. Contudo, em concentrações sub-inibitórias (CIM/2) estes agentes foram capazes de reduzir a quantidade de biofilme formado por todas cepas de *Salmonella*, exceto a formação de biofilme por *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na presença de óleo de tomilho. Somente os óleos essenciais de orégano e tomilho em concentrações de 0,1 % foram

¹ Tese de Doutorado, Doutorado em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. (102p) Março, 2018.

capazes de reduzir a biomassa de biofilmes maduros nos ensaios em microplacas de poliestireno. Enquanto que, os óleos essenciais e compostos majoritários em concentrações de 0,1 % e ácidos orgânicos em concentrações de 2,5 % foram capazes de reduzir a biomassa de biofilmes maduros de 1 até 3 log UFC/cupom em ambas cepas testadas nos ensaios em cupons de flandres. Nas imagens de microscopia confocal, os efeitos de redução de biomassa de biofilmes maduros tratados com os óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos também foram observados. De acordo com os resultados encontrados, foi possível confirmar que as cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isoladas de fábrica de ração possuem características fenotípicas para formar biofilme *in vitro*. Além disso, os óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos podem ser alternativas úteis como coadjuvantes nos programas de controle de *Salmonella* em ambientes de fábrica de ração para suínos.

Palavras-chaves: biofilme, fábrica de ração, *Salmonella*, agentes antimicrobianos.

THE ABILITY OF BIOFILMS FORMATION BY *Salmonella enterica* subsp. *enterica* STRAINS ISOLATED FROM SWINE FEED MILLS AND ACTION OF ESSENTIAL OILS OVER BIOFILMS.

Author: Vanessa Laviniki²

Adviser: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

ABSTRACT

Animal feed has been considered as an important vehicle for the introduction of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in pig farms. In feed mills, the main source of *Salmonella* contamination is the entry of contaminated ingredients or the persistence of strains in the processing environment. In addition, *Salmonella* has the ability to form biofilm on several abiotic surfaces, which may contribute to its persistence in these environments. In this sense, the objectives of this study were: *i.* to phenotypically determine the formation of biofilms in strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from a feed mill; *ii.* confirm the presence of the main genes associated with biofilm formation phenotypes; *iii.* to evaluate the effect of the oregano essential oil (*Oreganum vulgare*), thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) and its major compounds carvacrol and thymol, in inhibiting the formation of biofilm and *iv.* to evaluate the effect of the oregano essential oil (*Oreganum vulgare*), thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), its major compounds carvacrol and thymol, and organic acids (acetic and lactic acid) in the removal of mature biofilms of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. Thus, 54 strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates from four feed factories belonging to different serovars were evaluated for their ability to biofilm through phenotypic cell morphology assays, pellicle formation at the air-liquid interface and biofilm formation in polystyrene microplates. In addition, the presence of genes responsible for biofilm formation was investigated and the antibacterial and antibiofilm effects of different antimicrobial agents were evaluated through polystyrene microplate assays, UFC count in tinplate coupons and confocal microscopy. All strains presented morphotype *rdar* at 28 ° and morphotype *saw* at 37 ° C. These 81.48% (44/54) belonged to the phenotypic profiles 1, 3 and 4, which are moderately biofilm forming at 28 ° C, do not biofilm at 37 ° C and differ in the pellicle production at the air- liquid. While 14.81% (9/54) belonged to profiles 2, 5, 6, 7 and 8. The genes studied (*csgD*, *fimA*, *adrA* and *bapA*) were found in all strains. After phenotypic assays for biofilm formation, four strains belonging to the Montevideo serovar and that demonstrated to possess biofilm formation phenotype *in vitro* were used to study the antimicrobial and antibiofilm effect of different antimicrobial agents. Oregano essential oil, thyme essential oil and thymol major compound were able to inhibit the planktonic cell growth of all strains studied with MIC of 0.05%, while the major compound carvacrol was able to inhibit growth with MIC of 0.025%. However, at subinhibitory concentrations (MIC / 2) these agents were able to reduce the amount of biofilm formed by all strains of *Salmonella*, except the formation of biofilm by *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 in the presence of thyme oil. Only the essential oils of oregano and thyme at concentrations of 0.1% were able to reduce the biomass of mature biofilms in polystyrene microplate assays. While essential oils and major compounds at concentrations of 0.1% and organic acids in concentrations of 2.5% were

¹ Doctoral Thesis, Doctor of Veterinary Science, Department of Preventive Veterinary Medicine, Graduate Program in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. (p.102), March, 2018.

able to reduce the biomass of mature biofilms of 1 to 3 log CFU / coupon in both strains tested in the tin coupons. In the confocal microscopy images, the biomass reduction effects of mature biofilms treated with essential oils, major compounds and organic acids were also observed. According to the results, it was possible to confirm that the strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates from feed factory have phenotypic characteristics to form biofilm in vitro. In addition, essential oils, major compounds, and organic acids may be useful alternatives as adjuvants in *Salmonella* control programs in pig factory environments.

Keywords: biofilm, feed mill, *Salmonella*, antimicrobial agents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fluxograma de fábrica de ração: 1) Poço de recebimento de matéria-prima; 2) Bomba pneumática; 3) Poço de ingestão de sacos; 4) Elevadores; 5) Silos de armazenamento de matéria-prima; 6) Balança; 7) Moedores; 8) Compartimento para premix; 9) Misturador; 10) Condicionador de prensa de pelete; 11) Resfriador de pelete; 12) Silo de armazenamento de ração; 13) Caminhão à granel. (Adaptada de EFSA, 2008) **20**
- Figura 2-** Estágios de formação de biofilme bacteriano: 1) Estágio planctônico; 2) Adesão; 3) Micro-colônia; 4) Macro-colônia e 5) Dispersão (Adaptada de MONDS & O'TOOLE, 2009)..... **28**
- Figura 3-** Regulação da formação de biofilme mediada pelo gene *csgD* em *Salmonella* Typhimurium (Adaptada de LIU et al., 2014) **37**
- Figura 4-** Principais alvos para combate de biofilmes microbianos: inibição da formação do biofilme (etapa 1 e 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3) (Adaptada de CHUNG & TOH, 2014). **41**
- Figura 5-** Morfotipo em cepas de *Salmonella*. (A) morfotipo *saw* após 24 horas de incubação a 37°C; (B) morfotipo *rdar* após 96 horas de incubação a 28°C em ágar Lúria-Bertani com baixo teor de sal e suplementado com 40 µg/mL de Vermelho Congo e 20 µg/mL de Coomassie Brilliant Blue. (Fonte: arquivo pessoal)..... **62**
- Figura 6-** Verificação da amplificação dos produtos da Reação da Cadeia de Polimerase em gel de agarose a 2% com marcador molecular Ladder de 100 pb (canaleta M), cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (SM24, SM46, SM34 e SM11), controle negativo sem DNA (C-). **66**
- Figura 7-** Imagens compostas e ortogonais de microscopia de escaneamento confocal a laser de biofilmes maduros de *Salmonella* Montevideo SM34 após tratamento diferentes agentes antimicrobianos usando coloração fluorescente (BacLight). **73**
- Figura 8-** Imagens compostas e ortogonais de microscopia de escaneamento confocal a laser de biofilmes maduros de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 após tratamento com óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos usando coloração fluorescente (BacLight)..... **75**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Caracterização quanto a origem, sorovar e perfil de macro restrição (pulsotipo) de cepas de *Salmonella* proveniente de fábricas de ração para suínos **49**
- Tabela 2** - Sequência de Oligonucleotídeos utilizados neste estudo **54**
- Tabela 3** - Concentrações de óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos testadas. **56**
- Tabela 4** - Diferentes perfis fenotípicos para formação de biofilme observados em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* oriundas de fábricas de ração para suínos. **63**
- Tabela 5** - Perfil de macro restrição e perfis fenotípicos para formação de biofilme em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* oriundas de fábrica de ração suína. **64**
- Tabela 6** - Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de orégano, tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol para células planctônicas de cepas de *Salmonella* Montevideo..... **67**
- Tabela 7** - Efeito de concentrações sub-inibitórias dos óleos essenciais de orégano, tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol na inibição da formação de biofilme em cepas de *Salmonella*..... **69**
- Tabela 8** - Efeito de concentrações sub-inibitórias e letais de agentes antimicrobianos na redução de biofilmes maduros em cepas de *Salmonella* Montevideo e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028..... **69**
- Tabela 9** - Efeito antibiofilme de óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos na redução de biofilme maduro formados em cupons de flandres por *Salmonella* Montevideo SM34 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. **71**
- Tabela 10** - Parâmetros avaliados nas imagens de microscopia confocal de biofilmes formados em cupons de flandres por *Salmonella* Montevideo SM34 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 após tratamento com diferentes agentes antimicrobianos. **72**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Características do Gênero <i>Salmonella</i>	18
2.2 <i>Salmonella</i> em fábrica de ração animal	19
2.3 Biofilme	27
2.4 Formação de Biofilme por <i>Salmonella</i>	29
2.5 Genes envolvidos na formação de biofilme em <i>Salmonella</i>	35
2.6 Estratégias para inibição da formação de biofilme	40
3. OBJETIVOS	48
3.1 Geral	48
3.2 Específicos	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Cepas bacterianas:	49
4.2 Ensaio fenotípicos para a avaliação da formação de biofilme	51
4.2.1 Formação de película na interface ar-líquido em caldo:	51
4.2.2 Identificação do morfotipo:	51
4.2.3 Formação de biofilme em placas de poliestireno:	52
4.3 Extração de DNA genômico e ensaios de PCR	53
4.4 Estudo do efeito de diferentes agentes antimicrobianos na formação de biofilme e em biofilmes maduros	55
4.4.1 Agentes antimicrobianos:	55
4.4.2 Teste dos agentes antimicrobianos	56
4.4.3 Teste de susceptibilidade bacteriana de células planctônicas aos diferentes agentes antimicrobianos	57
4.4.4 Efeito de concentrações não bactericidas dos agentes antimicrobianos na inibição de formação de biofilme	57
4.4.5 Efeito de concentrações não bactericidas e letais na redução de biofilme maduro	58
4.4.6 Efeito dos diferentes agentes antimicrobianos na redução de biofilmes maduros em cupons de flandres	59
4.5 Microscopia de escaneamento confocal a laser	60

5. RESULTADOS.....	62
5.1 Ensaios fenotípicos para a avaliação da formação de biofilme	62
5.2 Ensaios de Reação da Cadeia de Polimerase	65
5.3 Estudo do efeito de diferentes agentes antimicrobianos na formação de biofilme	66
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne suína, no ano de 2016, foi de aproximadamente 109 milhões de toneladas, concentrando-se, em sua maior parte, na China, países da União Europeia e Estados Unidos. O Brasil ocupa o quarto lugar nesse ranking, com uma produção de 3.731 milhões de toneladas. A suinocultura brasileira concentra-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, sendo que o estado de Santa Catarina é responsável por 26,35 % da produção, seguido do Rio Grande do Sul (20,66 %) e Paraná (22, 29 %). Do volume total de carne suína produzida pelo país, 732,9 mil toneladas foram destinadas para o mercado exterior em 2016 (ABPA, 2017). Entretanto, a conquista de mercado externo exige que a indústria brasileira esteja em conformidade com regulamentos nacionais e internacionais, os quais preconizam a produção de alimentos seguros sem a presença de microrganismos patogênicos, como por exemplo, do gênero *Salmonella*.

Em 2008, a *European Food Safety Authority* (EFSA) elaborou um relatório sobre a avaliação de riscos microbiológicos em alimentos destinados a animais de produção e considerou a presença de *Salmonella* sp. como sendo um dos maiores perigos microbiológicos em rações, seguido por *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Clostridium* sp.

A alimentação fornecida aos animais tem sido considerada um importante veículo para a introdução de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos (BINTER et al., 2011). Sendo que, a contaminação por *Salmonella* em dietas animais pode ocorrer durante o processo de fabricação, através da utilização de ingredientes contaminados ou pela persistência de estirpes no ambiente (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010; PELLEGRINI et al., 2015; PRUNIĆ et al., 2016). Estudos recentes têm relacionado a presença de *Salmonella* principalmente com ingredientes como farinha de peixe, farinha de carne e ossos, farinha de carne, farinha de penas, farinha de sangue, soja e trigo (BURNS et al., 2015; HSIEH et al., 2016, YANG et al., 2017).

A contaminação de ingredientes com *Salmonella* é dependente de muitos fatores, incluindo a fonte deste ingrediente. A contaminação pode ocorrer durante a colheita, processamento, armazenamento destes produtos ou durante o processamento destes ingredientes na fábrica de ração (WIERUP & KRISTOFFERSEN, 2014). Na fábrica de ração, além dos ingredientes, a contaminação por *Salmonella* pode ocorrer através do contato com fezes de animais sinantrópicos (aves e roedores), através de funcionários

pelo uso de sapatos ou equipamentos contaminados, como por exemplo, luvas e vassouras utilizadas para limpeza do ambiente de processamento e também por falhas nos programas de controle e monitoramento da qualidade microbiológica e contaminação por *Salmonella* (NESSE et al., 2003; MORITA et al., 2006).

No Brasil, em 2016, a demanda de produção de dieta animal para atender a cadeia produtiva de suíno foi de 11,8 milhões e toneladas (SINDIRAÇÕES, 2017). Sendo *Salmonella* o maior risco para a alimentação animal, a indústria brasileira através da Instrução Normativa nº 4 (BRASIL, 2007), regulamentou as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores de alimentação animal. Os principais controles para *Salmonella* podem ser divididos em três categorias: esforços para prevenir a entrada de contaminação nas instalações; trabalhar para reduzir a multiplicação microbiana nas instalações e procedimentos concebidos para eliminar o agente patogênico. A prevenção é feita através do controle de poeira, gerenciamento do fluxo de equipamentos e funcionários, controle de roedores, prevenção de contaminação a partir de aves silvestres e garantir a higienização dos veículos de transporte. Reduzir a multiplicação de *Salmonella* no ambiente de fábricas de ração envolve descobrir os nichos de crescimento microbiano e condições que reduzam o crescimento. Já a eliminação de *Salmonella* pode envolver processos térmicos (peletização) ou adição de químicos (aditivos) nas dietas (JONES et al., 2011).

O tratamento térmico (peletização) é uma opção atrativa para eliminação de *Salmonella* porque não requer a introdução de compostos estranhos à dieta animal, mas é um processo que é dependente da temperatura, tempo de aquecimento e do microrganismo alvo. Entretanto, a peletização é uma técnica de eliminação pontual (apenas uma etapa) e não evita a recontaminação da ração através da contaminação cruzada com poeira ou equipamentos contaminados durante a embalagem, armazenagem e o transporte de ração (HUSS et al., 2015). Binter e colaboradores (2011) demonstraram que até 86 % das amostras processadas termicamente coletadas de refrigeradores de peletes foram positivas para *Salmonella*. Sendo assim, a descontaminação do ambiente da fábrica pode desempenhar um papel fundamental no rompimento do ciclo de recontaminação por *Salmonella*.

O uso de métodos não térmicos pode ser uma alternativa para controle de *Salmonella* em fábricas de ração. A adição de agentes químicos nas dietas, tais como ácidos orgânicos, formaldeído, ácidos graxos de cadeia média, óleos essenciais e bisulfato de sódio (COCHRANE et al., 2016), têm como principal vantagem seu efeito

antimicrobiano residual, que pode persistir após o armazenamento, auxiliando na proteção do alimento contra a recontaminação. Entre os aditivos alimentares mais comuns estão os ácidos orgânicos, particularmente o propiônico, fórmico, láctico e acético. A efetividade na redução da concentração de *Salmonella* em rações por ácidos orgânicos já foi reportada por diversos estudos (AMADO et al., 2013; KOYUNCU et al., 2013; MENCONI et al., 2013). Outros aditivos químicos utilizados no controle de *Salmonella* são os óleos essenciais, tais como o óleo essencial de orégano e alecrim, os quais podem reduzir a carga bacteriana em 1 a 2 log UFC/g em alimentos (GUNDUZ et al., 2010).

Diversos estudos têm sugerido que a persistência de *Salmonella* em ambientes de fábrica de ração se dá pela capacidade deste microrganismo de formar biofilme (VESTBY et al., 2009a; STEENACKERS et al., 2012). A formação de biofilme em *Salmonella* tem sido avaliada *in vitro*, principalmente por métodos fenotípicos, como a morfologia da colônia e adesão em superfícies abióticas (STEPANOVIC et al., 2000; RÖMLING et al., 2003). Uma vez que, comunidades que vivem em biofilme protegem-se de fatores de estresse ambiental (dessecação, pH, temperatura), desinfetantes e antimicrobianos, *Salmonella* pode sobreviver por prolongados períodos, que vão de meses até anos no meio ambiente e em rações estocadas em temperatura ambiente (DAVIES & WRAY, 1997).

Diversas pesquisas têm demonstrado a capacidade de formação de biofilme por *Salmonella* provenientes de alimentos (tomate, produtos cárneos, vegetais e sucos) ou do ambiente da indústria de alimentos (ABBAN et al., 2012; ČABARKAPA et al., 2015; LAMAS et al., 2016), assim como o uso de substâncias naturais como alternativa para controle destes biofilmes (PARK et al., 2012; KHAN & LEE, 2016; AMRUTHA et al., 2017). Entretanto, poucas pesquisas têm avaliado a capacidade de formação de biofilme em *Salmonella* provenientes de fábricas de ração e o efeito que estas substâncias naturais têm na formação destes biofilmes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme por cepas de *Salmonella* provenientes de fábrica de ração e o uso de substâncias naturais para controle destes biofilmes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, e compreende bacilos Gram-negativos (tipicamente de 0,5 mm por 1-3 mm), não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, positivos na prova da catalase e negativos na prova da oxidase, geralmente móveis com flagelos peritríquios, exceto os sorovares Gallinarum e Pullorum (D'AOUST, 2000; ADAMS & MOSS, 2008). Utilizam citrato como única fonte de carbono e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina. São produtores de ácido sulfídrico (H₂S), não hidrolisam ureia e reduzem nitrato a nitrito. Geralmente fermentam arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose e xilose, e não fermentam lactose (HOLT et al., 1994). O crescimento tem sido observado a partir de temperaturas um pouco acima de 5°C até 47°C, porém seu crescimento ótimo ocorre em temperaturas de 35-37°C e em pH 6,5-7,5. Sobrevivem ao congelamento e a desidratação por longos períodos de tempo, quando em presença de matéria orgânica (GRIFFITH et al., 2006).

Métodos moleculares têm mostrado que o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie anteriormente denominada *Salmonella subterranea* foi excluída do gênero *Salmonella* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al.; 2014). A espécie *S. bongori* possui apenas uma subespécie *bongori* (V), enquanto que *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (III), *diarizonae* (IV), *houtenae* (V) e *indica* (VI). Estas espécies e subespécies são divididas com base em suas propriedades bioquímicas ou similaridade genética. A subespécie *enterica* engloba mais de 99,5% dos isolados de microrganismos pertencentes ao gênero *Salmonella* (GRIMONT & WEILL, 2007). Os sorovares pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* são tipicamente designados por um nome, geralmente relacionado ao local geográfico onde o sorotipo foi isolado pela primeira vez (ISSENHUTH-JEANJEAN et al.; 2014)

Além da classificação em espécie e subespécie, existe a classificação das cepas em sorotipos ou sorovares. Essa classificação é feita com base no esquema Kauffmann & White, no qual são identificados os antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Nos sorovares Thyphi, Parathyphi e Dublin há ainda o antígeno capsular único (Vi), o qual contribui para a identificação e virulência dos mesmos (D'AOUST, 1994). Os antígenos O são lipopolissacarídeos termoestáveis da parede celular, designados por números

arábicos. Os antígenos H, por sua vez, são constituídos por proteínas termolábeis, sendo algumas vezes produzidas em duas diferentes fases (1 e 2). São designados pelas letras minúsculas do alfabeto (fase 1) e por números arábicos (fase 2), a letra z é utilizada com expoente numérico (FERREIRA & CAMPOS, 2008). Os sorovares imóveis de *Salmonella*, Pullorum e Gallinarum, podem ser diferenciados dos demais sorovares pela ausência do antígeno flagelar (H) detectado com antissoro poli H ou pelo resultado negativo no teste de motilidade (BACK, 2010).

Os sorovares de *Salmonella* podem, ainda, ser classificados em grupos de acordo com a sua adaptação ao hospedeiro. Dessa forma, os sorovares podem ser divididos em três grupos: (i) sorovares hospedeiro-específico que normalmente causam doença sistêmica em um número limitado de espécies filogeneticamente relacionadas. Assim, os sorovares Thyphi, Gallinarum e Abortusovis, são exclusivamente associados com doenças sistêmicas em humanos, aves e ovelhas, respectivamente; (ii) sorovares hospedeiro-restrito, que estão associados a uma espécie de hospedeiro, e raramente podem afetar outras espécies, como por exemplo, Dublin e Choleraesuis que causam doenças sistêmicas graves em bovinos e suínos, respectivamente; (iii) sorovares ubiqüitários, tais como Thyphimurium e Enteritidis que estão relacionados com a maioria de casos de toxi-infecções alimentares por *Salmonella* em humanos e podem eventualmente causar doença clínica em animais (BARROW et al., 2010).

Os sorovares de *Salmonella* ocorrem em todo mundo, podendo infectar mamíferos, aves e répteis. O microrganismo habita o trato intestinal de animais e é excretado principalmente nas fezes. A maioria dos sorovares de *Salmonella* causa infecção assintomática e os animais tornam-se portadores excretores contribuindo para a contaminação do ambiente e disseminação do microrganismo. *Salmonella* pode sobreviver por nove meses ou mais no ambiente, em locais como solo, água, partículas fecais e alimentação animal, especialmente em farinha de sangue e ossos e farinha de peixe (MARKEY et al., 2013).

2.2 *Salmonella* em fábrica de ração animal

Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2008), *Salmonella* foi identificada como sendo o maior perigo microbiológico em rações, podendo ser regularmente isolada a partir de ingredientes vegetais, animais infectados e ambientes de

processamento. Na prática é difícil saber quando ou como *Salmonella* foi introduzida em uma planta de processamento de ração. A maioria dos ingredientes, tanto de origem animal como vegetal, utilizados na fabricação da ração, está propensa à contaminação por *Salmonella* (DAVIES et al., 2004). A contaminação de grãos, por exemplo, pode ocorrer durante o cultivo, colheita, armazenamento e transporte. Efluentes, produtos de esgoto e resíduos fecais podem contaminar o cultivo através da irrigação ou adubação, ou *Salmonella* pode ser acidentalmente introduzida por contato com fezes de animais (pássaros, roedores e insetos) ou equipamentos contaminados utilizados na colheita e armazenamento dos grãos (WALES et al., 2010). *Salmonella* pode sobreviver por períodos prolongados, que vão de meses até quatro anos, em rações estocadas a temperatura ambiente (D'AOUST & SEWELL, 1986; DAVIES & WRAY, 1997).

Na fábrica de ração, a principal fonte de contaminação por *Salmonella* é a entrada de ingredientes contaminados. Os ingredientes podem chegar às fábricas já contaminados ou podem ser contaminados em áreas expostas, como recebimento de matéria-prima, armazenamento e expedição (Figura 1), geralmente pelo contato com fezes de animais (aves e roedores). Tem sido sugerido que a fonte de *S. Agona* e *S. Montevideo* em áreas de processamento de farinha de peixe são gaivotas, enquanto que *S. Typhimurium* poderia resultar de aves infectadas (NESSE et al., 2003). *Salmonella* também pode ser isolada da poeira da fábrica de ração, que é constituída de matéria orgânica e muito comum de ser encontrada nas áreas de processamento, podendo servir como fonte de contaminação para o produto final (JONES & RICHARDSON, 2004).

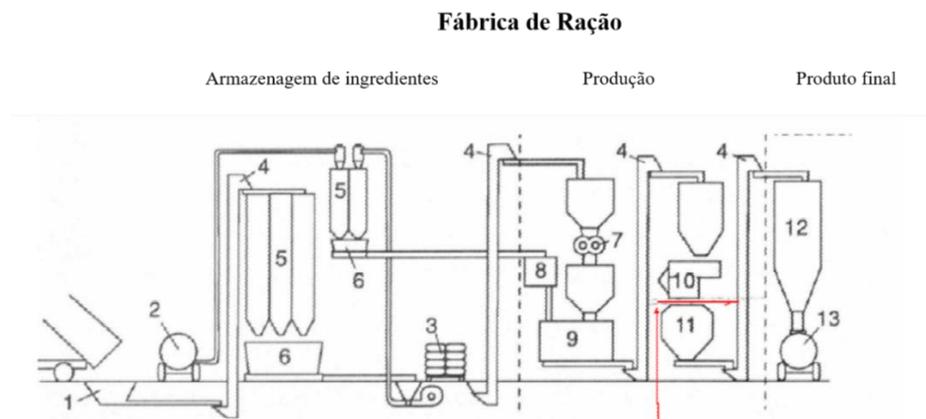


Figura 1- Fluxograma de fábrica de ração: 1) Poço de recebimento de matéria-prima; 2) Bomba pneumática; 3) Poço de ingestão de sacos; 4) Elevadores; 5) Silos de armazenamento de matéria-prima; 6) Balança; 7) Moedores; 8) Compartimento para premix; 9) Misturador; 10) Condicionador de prensa de pelete; 11) Resfriador de pelete; 12) Silo de armazenamento de ração; 13) Caminhão à granel. (Adaptada de EFSA, 2008)

Os seres humanos também podem contribuir para a disseminação de *Salmonella* dentro da fábrica, através de sapatos e equipamentos, como por exemplo luvas e vassouras (MORITA et al., 2006). Os vetores animais, como os roedores, podem ser infectados a partir de matérias-primas contaminadas, atuando indiretamente como fonte de contaminação cruzada ou recontaminação dos ingredientes (BINTER et al., 2011). O estudo de Davies & Wales (2013) avaliou a presença de *Salmonella* em roedores de uma fábrica de ração e relatou que estes animais permaneceram excretando *Salmonella* Derby e *Salmonella* Bovismorficans por 10 meses.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pela regulamentação e fiscalização do setor de produtos destinados à alimentação animal. Em 2007, o MAPA aprovou a Instrução Normativa 4 (IN 4) que regulamenta as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação (BPF) para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e um roteiro de inspeção destas fábricas. Segundo a IN 4, o estabelecimento não deve aceitar nenhuma matéria-prima ou ingrediente que contenha parasitas, microrganismos, substâncias tóxicas ou estranhas, que não possam ser reduzidas a números aceitáveis na industrialização e o produto final deve atender aos padrões de identidade e qualidade específicos.

Para garantir a qualidade e inocuidade da matéria-prima e produto final os estabelecimentos produtores de dieta animal devem estabelecer medidas eficazes para evitar a contaminação por contato direto e indireto em todas as etapas do processo e fluxo de produção, considerando instalações, equipamentos, pessoal, utensílios, uniformes e embalagens. Estas medidas compreendem a implementação de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Operacionais Padrão (POP) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). As BPF são documentos que descrevem situações reais das operações e procedimentos realizados pelos estabelecimentos e engloba o roteiro de inspeção onde os principais itens a seguir são avaliados: limpeza/higienização de equipamentos, instalações e utensílios; controle integrado de pragas e vetores, controle higiênico dos colaboradores e controle do processo de produção, armazenamento e expedição (SILVA & CORREIA, 2009).

Os POPs são documentos que descrevem a conduta operacional na unidade e contribui para garantir as condições higiênico-sanitárias necessárias durante o processamento e industrialização de rações, complementando as BPF. Segundo a IN 4, devem ser implementados nos estabelecimentos os seguintes POPs: Qualificação de

fornecedores e controle de matéria-prima e de embalagens; Limpeza/Higienização de instalações, equipamentos e utensílios; Higiene e saúde pessoal; Potabilidade da água e higienização de reservatório; Prevenção da contaminação cruzada; Manutenção e calibração de equipamentos e instrumentos; Controle integrado de pragas; Controle de resíduos e efluentes; Programa de rastreabilidade e recolhimento de produtos (Recall) (BRASIL, 2007).

O APPCC é um sistema elaborado para identificar perigos específicos e definir ações de controle, visando assegurar a qualidade e a inocuidade dos alimentos. Para a implantação de um programa de APPCC em uma fábrica de ração, é necessário elaborar um plano de ação que constitui, primeiramente, em análise de risco dos produtos expostos no local de processamento. Esta análise de risco define os perigos potenciais à qualidade da ração, associada às situações relacionadas a doenças de origem alimentar e pela determinação dos efeitos destes fatores na saúde do consumidor (CORADI et al., 2009). Os perigos podem ser de origem: (i) físico (metais, vidro, insetos, fragmentos de madeira, fragmentos sólidos, etc), químico (resíduos inorgânicos ou orgânicos, como por exemplo sais de mercúrio ou chumbo, praguicidas, hormônios e antimicrobianos) e biológico (microrganismos patogênicos ou produtores de toxinas, como por exemplo, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp.) (SBCTA, 1995).

Os maiores componentes usados na produção de dieta animal são cereais (47%), resíduos de óleos vegetais (27%), co-produtos da indústria de alimentos (13% - exemplo, farinha de peixe, farinha carne e ossos), minerais (3%), aditivos e vitaminas (EFSA, 2008). Logo, podemos considerar que a matéria-prima é um perigo, passando a ser um risco para a contaminação de rações, do ambiente de processamento e aos animais que irão consumir esta ração. Desta forma, pode-se definir que a matéria-prima é um risco de contaminação e a recepção da matéria-prima é considerada um ponto crítico de controle. Em uma fábrica de ração, pode-se definir como principais pontos críticos de controle os seguintes: (i) recepção, beneficiamento e estocagem a granel; (ii) recebimento e estocagem de líquidos; (iii) ensilagem; (iv) dosagem; (v) moagem; (vi) mistura; (vii) peletização; (viii) resfriador; (ix) expedição; (x) transporte e (xi) sistema de transporte interno da fábrica (CORADI et al., 2009). Após a identificação do ponto crítico de controle é preciso estabelecer, prevenir e controlar os limites desejáveis para que não interfiram na qualidade do produto final (LAMMERDING, 1997).

O monitoramento contínuo do processo de fabricação de rações dentro do programa de APPCC e a adoção de ações corretivas na detecção de contaminações são importantes para a prevenção de entrada de patógenos na produção animal, seguidamente, na cadeia de produtos de origem animal (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010).

Os dados de prevalência de *Salmonella* em matérias-primas são geralmente baseados na presença ou ausência de *Salmonella* em 25 gramas de amostra, sendo rara a sua quantificação. O tamanho (peso e volume) das alíquotas coletadas normalmente é arbitrário, podendo variar de 25 a 500 g, bem como sua frequência e intensidade (número de amostras por ponto) que é amostrada (DAVIES et al., 2004; BINTER et al., 2011). Portanto, os dados de prevalência de *Salmonella* em matérias-primas e rações são dificilmente comparáveis entre os diferentes estudos, devido às diferenças na amostragem e nos métodos de análise empregados.

Embora a ração animal e seus ingredientes sirvam como veículo de transmissão de *Salmonella* para diferentes animais e indiretamente para humanos, diversos estudos têm relatado baixos níveis de detecção e, portanto, uma baixa prevalência deste microrganismo (inferior a 10%) em rações e seus ingredientes (DAVIES et al., 2004). Isto, porque a distribuição das células bacterianas ocorre de uma forma heterogênea na amostra contaminada, tornando a amostragem e sua representatividade um ponto crítico (ESFA, 2008). Alguns países da União Europeia relataram que os níveis de contaminação de ingredientes para ração variam de 0 % a 6%, sendo que estes dados são variáveis e restritos principalmente aos países do Norte Europeu (EFSA, 2006).

No Brasil, existem poucos estudos relacionados a prevalência de *Salmonella* em matérias-primas, rações e em ambientes de fábrica de ração. Um estudo conduzido por Albuquerque e colaboradores (1999) avaliou os níveis de contaminação por *Salmonella* em ingredientes (136 amostras), rações (43; sendo 5 para suínos e 38 para aves) e suabes de piso, equipamentos e silos (110 amostras) em uma fábrica de ração situada no interior de São Paulo. Houve uma prevalência de 19,85 % (27/136) amostras positivas para *Salmonella* em ingredientes, 4,65 % (2/43) em rações e não houve amostras positivas para os suabes. Entretanto, em 2006 o Sindicato Nacional de Indústria e Alimentação Animal (Sindirações) redefiniu o seu programa de certificação, alinhando com os mais recentes tópicos e tendências da produção internacional de alimentos, adotando o conceito “*Feed & Food Safety*”- Gestão de Alimento Seguro. O programa agora é apresentado em três opções de certificação: (i) certificação em Boas Práticas de Fabricação; (ii) certificação em Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle e (iii) certificação com Equivalência

Internacional. Além disso, o programa tem como base a documentação publicada pelo Ministério da Agricultura e por outros organismos nacionais e internacionais regulamentadores e certificadores e estabelece os requisitos gerais para a gestão da segurança de produtos para a alimentação animal, considerando a necessidade da proteção à saúde dos animais e do homem (SINDIRAÇÕES, 2008).

Após a implementação do programa “*Feed & Food Safety*” e da IN 4, um estudo realizado por Pellegrini e colaboradores (2015), avaliaram 1269 amostras oriundas de várias etapas do processamento de ração em quatro fábricas na região sul do país, onde observou-se que a prevalência de *Salmonella* foi de 4,96 % (69/1269) de amostras positivas. Podendo observar uma diminuição da prevalência de *Salmonella* em ingredientes e em fábricas de ração, quando se comparado aos resultados obtidos por Albuquerque e colaboradores (1999).

Burns e colaboradores (2015) avaliaram a ocorrência de *Salmonella* e contagem de enterobactérias em rações para suínos e seus ingredientes, onde encontrou-se a prevalência de 0,6% (2/338) de amostras positivas para *Salmonella* em ingredientes e 0,95% (3/317) em rações prontas para o consumo. A contaminação foi encontrada em farelo de soja, trigo, ração peletizada e ração farelada. O único sorovar isolado foi a variante monofásica de *S. Typhimurium* (4, [5] 12: i:-) e através de análise de variância multi locus (MLVA) foram observados apenas dois perfis. Observando-se os resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que houve falha nos programas de controle de patógenos, uma vez que, tanto nos ingredientes como produto final isolou-se o mesmo microrganismo.

Já em um estudo para avaliar o risco de ingredientes para ração e caminhões como fontes de contaminação de *Salmonella* para suínos, observou-se que 0,7 % (4/549) das amostras de suabe dos caminhões e 23,5 % (4/17) das amostras de ingredientes foram positivas para *Salmonella*. Destas amostras, apenas duas foram positivas tanto no caminhão como no ingrediente. Os ingredientes contaminados foram farinha de carne e ossos, farinha de peixe, farinha de ossos, farinha de carne e farelo de soja. Os sorovares encontrados neste estudo foram *S. Oranienberg*, *S. Montevideo*, *S. Orion* e *S. Infantis* (FEDORKA-CRAY et al., 1997).

Diversas pesquisas têm relacionado sorotipos específicos de *Salmonella* presentes em matérias-primas ou em rações prontas. Portanto, a identificação do sorovar é uma ferramenta importante e necessária para que se possa rastrear a fonte de contaminação (EFSA, 2008). Um estudo epidemiológico, realizado na Espanha, em

fábricas de ração, avaliou isolados de *Salmonella* obtidos de ingredientes vegetais para alimentação animal, e distinguiu 32 sorovares diferentes de *Salmonella enterica*. Dentre estes, *S. California*, *S. Lexington*, *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Mbandaka*, *S. Tennessee*, *S. Senftenberg*, *S. Montevideo*, *S. Typhimurium* entre outros. O sorovar mais prevalente foi *S. California* (45% de todos os isolados), um sorovar raramente isolado de animais ou infecções humanas (ALVAREZ et al., 2003). Wierup & Häggblom (2010), avaliaram soja e outras proteínas vegetais como fonte de contaminação de *Salmonella* na produção de suínos. Um total de 28 diferentes sorovares de *Salmonella*, incluindo uma estirpe não tipável, foram isolados.

No Reino Unido, um estudo comparativo investigou a contaminação por *Salmonella* em fábricas de ração comerciais para aves e em nível de granja. As amostras coletadas nas fábricas de ração foram poeira, material derramado e agregado em todas as etapas do processamento de ração (silos de ingredientes, poço de recebimento de matéria-prima, elevadores, balança, prensa de peletes, resfriadores, etc.) e nas áreas da granja as amostras coletadas eram provenientes de fezes, poeira, cama e suabes das gaiolas e bebedouros. Quando disponível, foram também coletadas amostras de fezes de roedores e animais domésticos. Mais de 18 sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* foram identificados. *S. Typhimurium* DT41, geralmente associada à pássaros silvestres, foi isolada de uma amostra oriunda da área de secagem de grão em uma das granjas estudadas. Entretanto, *S. Enteritidis* (geralmente persistente em granjas de poedeiras) foi isolado nos lotes de galinhas poedeiras, mas também em pássaros e roedores presentes nas áreas circunscritas a fábrica de ração. Permitindo assim, observar as limitações nos procedimentos de monitoria existentes, uma vez que, os ingredientes para preparo de dietas animais tanto dos estabelecimentos comerciais como das granjas estavam contaminados e assim poderiam servir como fonte endêmica de contaminação ou fonte de recontaminação para estes locais (DAVIES & WALES, 2010).

Sorovares de *Salmonella*, incluindo *S. Agona*, *S. Montevideo* e *S. Senftenberg* são conhecidos por sobreviver e persistir em ambiente de fábrica de ração por anos (NESSE et al., 2003). Consequentemente, a indústria tem aplicado diversas medidas de controle baseadas no monitoramento microbiológico do ambiente de produção e de seus produtos, além de métodos de descontaminação da matéria-prima. As medidas de controle mais importantes para a fabricação de alimento destinado ao consumo animal isento de contaminações são o tratamento térmico, geralmente em conjunto com procedimentos de granulação, extrusão, peletização e torrefação, e também a prevenção

de recontaminação após os processos de descontaminação (EFSA, 2008). O tratamento térmico consiste na pulverização de vapor para elevar a temperatura do produto, geralmente para *Salmonella* a temperatura utilizada é de 80-85°C, por um tempo predefinido onde espera-se a redução de até 3 log do microrganismo. Entretanto, poucos estudos, que relatam a presença de *Salmonella* em rações e na fábrica, tentam explicar os mecanismos que este microrganismo utiliza para persistir por tanto tempo no ambiente ou em alimentos.

Os ambientes de processamento das fábricas de ração são conhecidos por possuir variações de temperatura e umidade o que poderia potencialmente induzir *Salmonella* a um estado celular viável, mas não cultivável (HABIMANA et al., 2014). Todavia, em certas superfícies de produção, a condensação causada pela variação da temperatura pode proporcionar umidade suficiente para nichos bacterianos, nos quais *Salmonella* e outros microrganismos tendem a crescer e formar biofilme (HABIMANA et al., 2010).

A formação de biofilme tem sido relacionada com a persistência de *Salmonella* nas fábricas de ração, uma vez que o biofilme protege os microrganismos de fatores de estresse ambiental (dessecação, pH, temperatura), desinfetantes e antimicrobianos. Vestby e colaboradores (2009a) investigaram se a habilidade de formar biofilme em temperatura ambiente por isolados de *Salmonella* poderia contribuir para a sua persistência no ambiente de fábricas de ração. Um total de 116 cepas de *Salmonella enterica* sorovares Agona (n = 39), Montevideo (n = 30), Senftenberg (n = 34) e Typhimurium (n = 13), oriundas de produtos final e ambientes da fábrica de ração, foram estudados. Primeiramente, estas cepas foram analisadas através da técnica de macro restrição do DNA total, seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE), onde identificou-se os grupos clonais para cada um dos quatro sorovares estudados. Após foram selecionadas as cepas representantes de perfis classificados como persistente e não persistente para cada sorovar estudado. Os resultados mostraram que os sorovares Agona e Montevideo, os quais possuíam perfil persistente, foram bons formadores de biofilme em placas de poliestireno e que rapidamente formam biofilme (película) na interface ar-líquido. Enquanto que, o sorovar Senftenberg e o sorovar Typhimurium, os quais possuíam perfil não persistente, foram moderadamente formador e fracamente formador de biofilme, respectivamente. Assim, os resultados sugerem que a habilidade de formar biofilme em temperatura ambiente está correlacionada com a persistência de *Salmonella* em farinha de peixe e seu ambiente de produção, não excluído outros fatores, como por exemplo, falha nas rotinas de controle do APPCC, outras características do

microrganismo e também fatores ambientais que possam contribuir para a persistência do microrganismo (condições favoráveis de temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes).

A ração animal e seus ingredientes são conhecidos por possuírem uma baixa atividade de água (0,4 a 0,65) e *Salmonella* tem sido um importante fator de risco para as fábricas de ração devido a sua prevalência em ingredientes e sua capacidade de sobreviver em alimentos com baixa atividade de água e respectivos locais de produção por longos períodos de tempo (PODOLAK et al., 2010). Finn e colaboradores (2013), avaliaram as características fenotípicas relacionadas à sobrevivência em ambientes com baixa umidade de 46 isolados de *Salmonella* provenientes de ambientes de produção de ração. A maioria dos isolados apresentaram diferentes fenótipos associados à sobrevivência em locais com baixa umidade, tais como produção de celulose, suscetibilidade a biocidas e aumento da formação de biofilme por isolados com maior tolerância ao cloreto de potássio e glicerol.

2.3 Biofilme

Biofilmes são comunidades estruturadas de células bacterianas embebidas em uma matriz polimérica extracelular que podem estar aderidas a superfícies abióticas ou bióticas. O crescimento em biofilme é considerado um mecanismo de proteção que permite que os microrganismos sobrevivam em ambientes hostis (JAQUES et al., 2010), representando, provavelmente, o modo predominante de existência microbiana na natureza, com estimativas sugerindo que mais de 90 % de bactérias existem como parte de biofilmes (PETROVA & SAUER, 2012).

A formação e a estrutura do biofilme são influenciadas por numerosas variáveis, incluindo espécie, superfície, disponibilidade de nutrientes e outras condições ambientais (DAVIES, 2003). O desenvolvimento do biofilme ocorre em pelo menos cinco estágios (Figura 2): (i) planctônico; (ii) adesão; (iii) micro-colônia; (iv) macro-colônia e (v) dispersão (STOODLEY et al., 2002; MONDS & O'TOOLE, 2009).

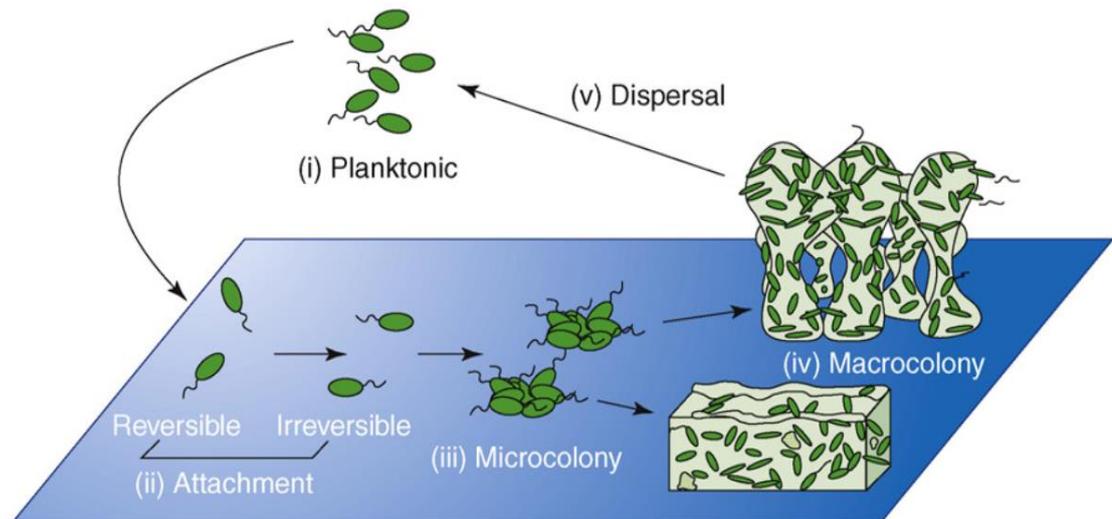


Figura 2- Estágios de formação de biofilme bacteriano: 1) Estágio planctônico; 2) Adesão; 3) Micro-colônia; 4) Macro-colônia e 5) Dispersão (Adaptada de MONDS & O'TOOLE, 2009)

A adesão à superfície é uma das fases mais importantes, pois diferencia a vida planctônica da vida em biofilme. A fase de adesão tem sido muitas vezes dividida em estágio “reversível” e “irreversível”, em reconhecimento ao fato de que a adesão inicial à superfície é frequentemente fraca, com ativação de mecanismos necessários para que as células façam uma transição para uma forma mais estável com a superfície (MONDS & O'TOOLE, 2009). Apêndices celulares tais como flagelo, pili e fimbrias estão envolvidos na adesão reversível. Após este estágio as células sofrem adesão irreversível (TOYOFUKU et al., 2015).

A formação de discretos agrupamentos celulares é referido como formação de micro-colônia (~ 100 células), a qual pode acontecer tanto por crescimento clonal das células aderidas ou por translocação ativas das células sobre a superfície. As micro-colônias se desenvolvem para formar as macro-colônias (grandes agregados bacterianos envoltos por matriz extracelular, que podem atingir uma altura > 100µm). As macro-colônias consistem de torres tipo “cogumelos” separadas por espaços vazios repletos de fluídos (canais de água); entretanto, estruturas alternativas (por exemplo, estruturas planas) são também possíveis. As células são mantidas dentro da macro-colônia por uma matriz de exopolissacarídeo, que consiste de restos de células mortas e DNA extracelular (STOODLEY et al., 2002; MONDS & O'TOOLE, 2009). Finalmente, as macro-colônias podem se dissolver libertando as células do biofilme. Essas células dispersas exploram outros nichos e aderem novamente à outra superfície. O retorno das células para a forma

planctônica completa o ciclo de desenvolvimento do biofilme e inicia outro ciclo de vida (MONDS & O'TOOLE, 2009; TOYOFUKU et al., 2015).

A maioria dos biofilmes são formados por mais de 90% de matriz e menos de 10% de microrganismos. A matriz é um material extracelular produzido pelos microrganismos que formam o biofilme e é constituída por diferentes tipos de biopolímeros, conhecidos como substância polimérica extracelular (EPS) (FLEMMING & WINGENDER, 2010). O EPS pode ser altamente diverso em sua composição química, podendo ser constituído de proteínas substituíveis ou insubstituíveis, polissacarídeos, ácidos nucleicos e fosfolipídeos (STOODLEY et al., 2002) e é responsável por diversas funções: adesão, agregação celular, coesão do biofilme, retenção de água, barreira protetiva, sorção de compostos orgânicos e inorgânicos, atividade enzimática, fonte de nutriente, troca de material genético, doador e receptor de elétrons, exportador de componentes celulares, dissipador do excesso de energia e sítio de ligação de enzimas (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

As micro-colônias que constituem o biofilme podem ser compostas por populações de uma única espécie ou por comunidades de múltiplas espécies, dependendo das condições ambientais em que são formadas. Cada grupo celular desempenha um papel diferente no desenvolvimento do biofilme e isso exige uma comunicação célula-célula (*Quorum sensing*), a qual permite as bactérias coordenarem as suas atividades (DAVEY & O'TOOLEY, 2000).

2.4 Formação de biofilme por *Salmonella*

Salmonella possui habilidade de formar biofilme, o que contribui para colonização no hospedeiro ou na sua persistência no meio ambiente (STEENACKERS et al., 2012). Muitos estudos têm demonstrado que *Salmonella* possui habilidade para formar biofilme em diversas superfícies, como, por exemplo, em aço inoxidável, plástico, cimento, borracha e vidro (JOSEPH et al., 2001; STEPANOVIC et al., 2004; GIAOURIS & NYCHAS, 2006), os quais são comumente encontrados em fazendas, abatedouros, indústria de processamento de alimentos e em fábricas de ração. Entretanto, *Salmonella* também é capaz de formar biofilme em superfícies bióticas, como plantas, células epiteliais e cálculos biliares (ALTHOUSE et al., 2003; TSOLIS et al., 2008; BERGER et al., 2010).

Abban e colaboradores (2012) avaliaram o comportamento de adesão de *Escherichia coli* K12 e *Salmonella* Typhimurium P6 frente a três superfícies (alumínio, aço inoxidável e um material de fibra plástica reforçada), nas quais os alimentos entram em contato durante seu transporte, tanto na presença como ausência de resíduos (extrato aquoso de filé de frango e caldo Lúria-Bertani) e compararam o comportamento de adesão com as características das superfícies (taxa de rugosidade e hidrofobicidade). As bactérias se aderiram rapidamente em todas as superfícies abióticas e observou-se que a taxa de adesão foi menor nas superfícies que apresentavam resíduos, mas que sua remoção foi mais difícil. Na presença de resíduos a adesão foi menor, pois sua presença aumenta a hidrofobicidade da superfície, e quanto mais hidrofóbico o material maior é a dificuldade do microrganismo se aderir. Além disso, os microrganismos mostraram predileção por aderir em áreas do material que continham mais resíduos, provavelmente pela disponibilidade de nutrientes e os resíduos podem funcionar como uma camada adesiva, tornando o microrganismo mais fortemente aderido à superfície e com isso sua remoção torna-se mais difícil.

Em um estudo conduzido por Adetunji e Odetokun (2012), isolados de *Salmonella* sp. produziram mais biofilme que isolados de *Escherichia coli* O157:H7 em todas as condições testadas: temperatura (11°C e 28 °C), meio de cultura (caldo triptona de soja – TBS, TSB + 0,5% de glicose, TSB + 1% de glicose, TSB + 2% de sangue ovino e TSB + 5% de sangue ovino) e superfície (vidro e cimento). Houve maior formação de biofilme na superfície de cimento do que no vidro, devido ao cimento possui menor hidrofobicidade, o que facilita a adesão bacteriana e posterior formação de biofilme. Com o aumento da disponibilidade de nutrientes houve aumento na formação de biofilme por ambas cepas testadas. Embora tenha havido maior formação de biofilme em meios contendo glicose do que meios contendo sangue ovino, isto porque meios contendo altas concentrações de glicose aumentam a produção de EPS. A respeito da temperatura de incubação, houve maior produção de biofilme em temperatura ambiente (28 °C) do que em temperatura de refrigeração (11°C). O aumento da produção de *curli* em *Escherichia coli* pode ser responsável pela maior formação de biofilme, uma vez que a *curli* melhora a habilidade de *E. coli* formar biofilme e sua expressão é maior em temperatura ambiente. Já *Salmonella* exibe comportamento multicelular associado com a formação de biofilme em várias temperaturas de incubação. O comportamento multicelular é regulado por condições ambientais que visam o promotor *agfD* (também conhecido como *csgD*) e sua expressão leva a produção de polímeros, fimbria *curli* e celulose os quais formam a matriz

extracelular. Níveis mais altos de expressão de *agfD* são observados em temperatura ambiente (28°C).

Em um estudo conduzido no Brasil para avaliar a capacidade de formação de biofilme por *Salmonella* isoladas de carnes de aves proveniente de supermercados e açougues, observou-se que 98,3 % (171/174) dos isolados foram capazes de formar biofilme em pelo menos uma das superfícies: vidro, policloreto de polivinila (PVC) e aço inoxidável. Destes isolados, a maioria foi fracamente aderente e um pequeno grupo de isolados foi fortemente produtor de biofilme. Das superfícies analisadas, a que demonstrou uma maior resistência à formação de biofilme foi o vidro. Este estudo relatou a dependência da formação de biofilme às condições de temperatura e ao tipo de material da superfície de contato (OLIVEIRA et al., 2014).

A adesão à superfície e formação do biofilme protege as células bacterianas contra uma ampla gama de desafios ambientais, incluindo radiação ultravioleta, toxicidade do metal, pH e alterações osmóticas, desidratação, resposta imunológica do hospedeiro, agentes antimicrobianos e desinfetantes. Lianou e Koutsoumanis (2012) observaram a variabilidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella enterica* sobre várias condições de pH (3,8-7,0), osmolaridade (0,5-8,0% de NaCl) e temperatura (4-37°C). Observou-se que à medida que as condições ambientais se tornavam menos favoráveis aos microrganismos, havia maior variabilidade na formação de biofilme. Nem todos os isolados estudados foram capazes de formar biofilme e as condições que favoreceram a sua formação foram pH 7,0, concentrações de 4,5% de cloreto de sódio e temperatura de 25°C.

Os biofilmes de *Salmonella* são envolvidos por uma matriz extracelular que, em grande parte, é constituída por dois componentes principais: a fimbria *curli* e celulose e em menor quantidade por proteína associada ao biofilme (Bap), antígeno capsular O, lipopolissacarídeo e DNA extracelular (LIU et al., 2014). A fimbria *curli* é expressa em resposta a limitação de nutrientes, sob condições de baixa osmolaridade e baixas temperaturas de crescimento, bem como em fase de crescimento estacionária (JAIN & CHEN, 2007) e é importante durante a formação do biofilme, por promover a interação inicial entre célula-superfície e subsequente interação célula-célula. Além disso, a fimbria *curli* é importante nos processos como colonização do hospedeiro, persistência, motilidade e invasão (STEENACKERS et al., 2012). A celulose desempenha um papel estrutural por conferir força mecânica e proteção química ao biofilme (ZOGAJ et al., 2001), sendo também importante na fase de adesão inicial e/ou formação de micro-

colônia (SIMM et al., 2014). Juntos, estes dois componentes desempenham um papel importante na manifestação de diferentes comportamentos morfológicos observados em *Salmonella* e na formação de biofilme em superfícies abióticas e resistência ao estresse. O comportamento multicelular em *Salmonella* é caracterizado pela transição da forma livre, crescimento planctônico, para a forma sésil, comunidade bacteriana envolta por uma densa matriz extracelular composta por macromoléculas, tais como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Embora o biofilme represente um grande desafio para as áreas microbiológicas e de higiene, até agora os métodos para analisar a formação e desenvolvimento de biofilme não estão padronizados. Diferentes métodos têm sido empregados para avaliar biofilmes qualitativamente e quantitativamente (PANTANELLA et al., 2013). Várias novas metodologias têm sido recentemente desenvolvidas para, ou adaptadas para, estudos de biofilme, o que tem contribuído para uma compreensão mais profunda sobre a fisiologia, estrutura e composição do biofilme. Existem métodos para crescimento e caracterização de biofilme (ensaios em microplacas, dispositivo de Robbins, dispositivo de Calgary), métodos para avaliar a força e extensão da adesão, e técnicas para mensurar biomassa, viabilidade e composição da matriz do biofilme (métodos de microscopia, métodos moleculares, métodos físicos, métodos químicos) (AZEREDO et al., 2017). Entretanto, o ensaio de cristal violeta, formação de película na interface ar-líquido e o ensaio em placas de Vermelho Congo (VC) comumente são os mais empregados na avaliação da formação de biofilme por *Salmonella* (STEENACKERS et al., 2012). A formação de película na interface ar-líquido em condições de crescimento em caldo Lúria-Bertani (LB) e ensaios em placas de LB suplementadas com Vermelho Congo são utilizados para a avaliação dos componentes que constituem a matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella*.

Ensaio em placas de VC, o qual é um método rápido e fácil, permite análises semiquantitativas da formação de biofilme em superfície sólida. Com este método é possível selecionar genes e compostos que afetam a formação do biofilme e realizar análises detalhadas da regulação de certos componentes da matriz do biofilme e suas contribuições para a formação de biofilme em condições específicas. A coloração resulta a partir da ligação do diazocorante VC em ambos maiores componentes da matriz extracelular; a fímbria *curli* e celulose (CIMDINS & SIMM, 2017). Estes ensaios, frequentemente caracterizam os isolados de *Salmonella* em cinco tipos morfológicos: (i) *rdar*, (vermelho, seco e áspero) caracterizado, entre outros fatores, pela produção de uma

matriz extracelular adesiva constituída de fimbria *curli*, celulose e outros polissacarídeos e proteínas; (ii) *bdar* (marrom, seco e áspero) que expressa somente *curli*; (iii) *pdar* (rosa, seco e áspero) que expressa somente celulose; (iv) *saw* (branca e mucóide) que não expressa nem *curli* nem celulose (RÖMLING et al., 2005) e (v) *sbam* (marrom e mucóide) que não expressa fimbria *curli* e celulose, mas superexpressa polissacarídeo capsular (MALCOVA et al., 2008).

O comportamento multicelular *rdar* é altamente conservado entre isolados do gênero *Salmonella* e descrito como um morfotipo que pode persistir por longos períodos no meio ambiente, fornecendo uma maior resistência à dessecação e à desinfecção (RÖMLING et al., 2005; WHITE et al., 2006; SEIXAS et al., 2014). É sugerido que este morfotipo seja uma adaptação para sobreviver fora do hospedeiro (CHIA et al., 2011). Normalmente, este morfotipo é expresso somente em condições ambientais específicas como temperatura ambiente (abaixo de 30°C) em placas de ágar contendo meio rico e sem sal (limitação de nutrientes, baixa osmolaridade) ou a 37°C em meios com deficiência de ferro. Além disso, células que expressam essa morfologia de colônia são, também, frequentemente caracterizadas por aglutinação celular em meio líquido, formação de película na interface ar-líquido, formação de biofilme em superfícies abióticas (STEENAKERS et al., 2012).

Estudos têm demonstrados que células do morfotipo *rdar* apresentam maior resistência ao peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e a vários agentes desinfetantes, bem como uma maior capacidade de adesão a superfícies abióticas (LANDON et al., 2012; STEENAKERS et al., 2012). O morfotipo *rdar* é mais prevalente em isolados associados com salmoneloses humana (SEIXAS et al., 2014) e a maioria das cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de pacientes, alimento, animais e fábricas de ração têm habilidade de expressar o morfotipo *rdar* em temperatura ambiente, indicando a importância da formação de biofilme para a colonização e persistência em diferentes ambientes naturais (SIMM et al., 2014).

O morfotipo *bdar* é mais raro e tem sido sugerido que está ligado a grupos de *Salmonella* que não necessitem sobreviver longos períodos no meio ambiente e são potencialmente comensais em seus hospedeiros (CHIA et al., 2011). Vestby e colaboradores (2009 b) avaliaram a distribuição de morfotipos em isolados de *Salmonella* de farinha de peixe e do ambiente de produção, com ênfase em potenciais diferenças entre os morfotipos em relação à sobrevivência no meio ambiente. Foram avaliados 148 isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorovares Agona (n = 47), Montevideo (n = 38),

Senftenberg (n = 42) e Typhimurium (n = 21), e um total de 74% (110/148) apresentaram morfotipo *rdar* e 26% (36/148) dos isolados apresentaram morfotipo *bdar*. Foi observado que o morfotipo *rdar* é mais tolerante a dessecação e depleção de nutrientes do que o morfotipo *bdar*.

Já o morfotipo *saw* é mais invasivo, indicando que a perda de *curli* e celulose poderia melhorar a capacidade das bactérias para evadir as defesas do hospedeiro e causar infecções sistêmicas (STEENAKERS et al., 2012). Um estudo sobre *Escherichia coli*, isolada do trato intestinal, observou que aqueles microrganismos que expressavam o morfotipo *rdar* apresentavam alta habilidade para formar biofilme, enquanto que aqueles que expressavam o morfotipo *saw* demonstravam menor habilidade para formar biofilme (BOKRANZ et al., 2005).

Salmonella pode formar diferentes tipos de biofilme dependendo das condições ambientais existentes, os quais são descritos a seguir: (i) película na interface ar-líquido, (ii) anel na interface ar-líquido e (iii) botão na interface sólido-líquido. A primeira forma, tipo película na interface ar-líquido, é observada em condições de cultivo em meios ricos em nutrientes e de baixa osmolaridade (LB sem sal) incubados a temperatura ambiente, onde há a expressão de fimbria *curli* e celulose. A segunda forma, tipo anel na interface ar-líquido, é observada em condições de cultivo em meios deficientes em nutrientes (ATM) e temperatura de crescimento a 37°C, onde o principal componente da matriz do biofilme é celulose. Além disso, biofilme tipo anel também pode ser observado em ensaios de formação de biofilme em microplacas de poliestireno (SOLANO et al., 2002). Já a terceira forma, é observada em condições de crescimento em meio mínimo (MM) onde há a formação de um botão na interface sólido-líquido (GARCIA et al., 2004; PAYTUBI et al., 2017).

A formação de película na interface ar-líquido, em meio LB com diferentes condições de crescimento, é amplamente utilizado para avaliar a habilidade de formação de biofilme em *Salmonella*, sendo que a formação de biofilme pode ser visualizada como uma película de células fortemente associadas às paredes do vidro na interface ar-líquido e que não pode ser facilmente desfeita por agitação. Uma variedade de forças atrativas está provavelmente envolvida entre o biofilme e o vidro, como por exemplo, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (SOLANO et al., 1998 e 2002). A colonização na interface ar-líquido em ambiente aquoso pode ser vantajosa para bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, pois a interface ar-líquido fornece à bactéria acesso a ambas as fases, gasosa (oxigênio) e líquida (água e nutrientes). Crescimento em meio rico de baixa osmolaridade,

temperatura baixa (25°C) e incubação estática, são as condições descritas para que *Salmonella* forme biofilme na interface ar-líquido (PAYATUBI et al., 2017). Estudos de microscopia eletrônica de varredura de películas formadas por *Salmonella* na interface ar-líquido mostram que as células estão envoltas por uma substância extracelular amorfa como nas células que colonizam placas de ágar. Entretanto, observou-se uma maior formação de matriz de fibras de ligação na película, resultando em estrutura muito mais aderente e que parece manter as células unidas (ANRIANY et al., 2001; SPIERS et al., 2003).

Eguale e colaboradores (2014) relataram que a maioria dos isolados estudados formou biofilme, tanto a 20°C como a 37°C. A formação de biofilme a 20°C foi apresentada por aqueles isolados que expressaram o morfotipo *rdar*, enquanto que a 37°C o biofilme foi expresso por isolados do morfotipo *saw*. Embora houvesse formação de biofilme em ambas as temperaturas, a 20°C a formação de biofilme foi mais robusta (total de biomassa de biofilme maior). Todos os isolados que expressaram morfotipo *rdar* formaram películas espessas e estáveis na interface ar-líquido, enquanto que a película produzida pelos morfotipos *sbam* e *bdar* foram frágeis e facilmente dispersas. Esse fato demonstra que a celulose não é uma exigência básica para a formação do biofilme a 20°C ou a 37°C, mas é importante para a expressão do morfotipo *rdar* e formação de uma película intacta. A co-expressão de *curli* e celulose são importantes para a formação de película por cepas selvagens, enquanto que cepas laboratoriais do morfotipo *rdar* estão associadas principalmente com a expressão de *curli*.

2.5 Genes envolvidos na formação de biofilme em *Salmonella*

Com o declínio da disponibilidade de nutrientes, as células de *Salmonella* começam sua transição a partir da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária e começam a formar biofilme, que é regulado por uma complexa rede de muitos componentes, incluindo fator sigma, fatores transcricionais, vários ribonucleotídeos mensageiros e pequenos RNAs (sRNAs) (GERSTEL & RÖMLING, 2003; LIU et al., 2014).

Em *Salmonella* a fimbria *curli* são amilóides das principais subunidades protéicas CsgA e CsgB (CIMDINS & SIMM, 2017) é codificada por dois operons o *csgBAC* e *csgDEFG* (STEENAKERS et al., 2012). O primeiro gene do operon *csgDEFG*,

o *csgD* (previamente denominado *agfD*, *thin aggregative fimbriae* gene D), é um gene chave para a formação de biofilme por *Salmonella* e é o principal contribuinte para o desenvolvimento do morfotipo *rdar* (CASTAÑEDA et al., 2015).

CsgD, ativador transcricional pertencente à família LuxR, é central na regulação da transição entre a formação de biofilme e a virulência. A expressão de *csgD* é muito complexa e é geralmente regulada por uma variedade de estímulos ambientais (temperatura, osmolaridade, disponibilidade de nutrientes, etanol, ferro, pH e tensão de oxigênio), diversas proteínas (OmpR) e fatores sigma (RpoS) influenciam na sua transcrição, e, conseqüentemente, a expressão do morfotipo *rdar* (GERSTEL & RÖMLING, 2003; AHMAD et al., 2017).

OmpR (*outer membrane protein R*) foi um dos primeiros genes descobertos como requerido para a transcrição de *csgD* (RÖMLING et al., 1998). OmpR um regulador resposta no sistema regulatório de dois componentes EnvZ/OmpR, é fosforilado em resposta a estímulos ambientais, tais como, osmolaridade e pH e liga-se ao promotor *csgD* para melhorar a sua expressão (LIU et al., 2014; SIMM et al., 2014). RpoS e Clr são outras proteínas reguladoras da formação de biofilme em *Salmonella*. O gene *rpoS* codifica um fator sigma (σ^S) que regula a transcrição de genes importantes para a resposta ao estresse e sobrevivência durante a fase estacionária (HENGGE-ARONIS, 2002).

O fator sigma RpoS (σ^S) regula a expressão de *csgD*, ativando sua expressão no final da fase exponencial e começo da fase estacionária a temperatura ambiente, períodos nos quais a expressão de *rpoS* é máxima. Portanto, o fator sigma RpoS constitui um fator crucial para o desenvolvimento do morfotipo *rdar* em *S. Typhimurium* e *Escherichia coli* (MONTEIRO et al., 2012). Durante o crescimento de colônias *rdar* a expressão de *rpoS* provou ser máxima entre 3 e 5 dias, mas permaneceu detectável até 47 dias (WHITE et al., 2006). Além disso, cepas de *S. Typhimurium rpoS* mutantes mostraram morfotipo alterados em placas de ágar Vermelho Congo (RÖMLING et al., 2003).

A proteína Crl é um regulador transcricional de ligação do DNA, necessária para o desenvolvimento do morfotipo *rdar* (ROBBE-SAULE et al., 2006). Experimentos com mutantes demonstram que Crl exerce sua função juntamente com o RpoS (STEENAKERS et al., 2012).

Como regulador transcricional mestre, o CsgD, é a principal unidade integrante e de controle para a formação de biofilme em *Salmonella* (Figura 3), devido a sua regulação da expressão de substâncias associadas à matriz extracelular do biofilme. (GERSTEL & RÖMLING, 2003). *In vitro*, CsgD não fosforilado se liga diretamente a

região promotora do operon *csgBAC*, *csgB*, e ativa transcricionalmente a síntese de *curli* (SIMM et al., 2014).

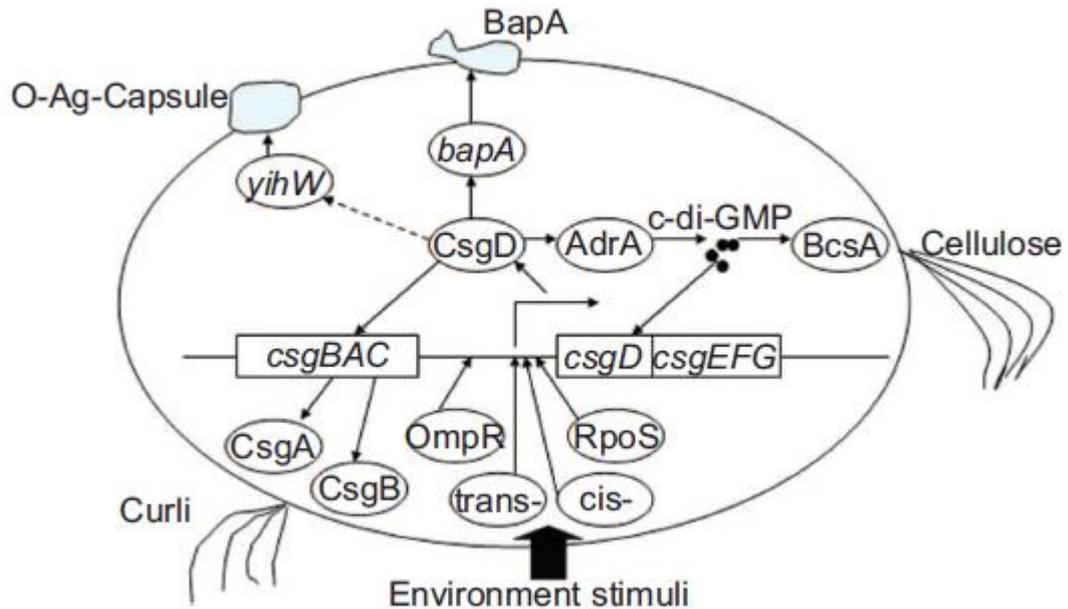


Figura 3- Regulação da formação de biofilme mediada pelo gene *csgD* em *Salmonella* Typhimurium (Adaptada de LIU et al., 2014)

Solano e colaboradores (2002), demonstraram que um mutante do gene *csgD* não foi capaz de formar película em condições de meio rico em nutrientes (LB), mas mostrou formação de biofilme em condições de meio deficiente em nutrientes (ATM). Experimentos baseados em um modelo de formação de biofilme em cultura de fluxo contínuo em vidro usando, cepas mutante de *csgD*, revelou que esse gene é requerido para a maturação do biofilme, mas parece ser dispensável para o estabelecimento de micro-colônias isoladas (GRANTCHAROVA et al., 2010).

O gene *csgD* também controla positivamente a expressão do gene diguanilato ciclase *adrA* pela ligação direta com a região promotora *upstream* do gene *adrA*, que regula positivamente a síntese de celulose via produção de uma molécula sinalizadora secundária c-di-GPM, um ativador alostérico da síntese de celulose (Figura 3) (SIMM et al., 2014). Além disso, o *csgD* regula negativamente fatores que inibem a formação de biofilme (CASTAÑEDA et al., 2015).

Genes envolvidos na biossíntese de celulose em *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, são organizados em dois operons transcritos de forma divergentes, *bcsABZC* e *bcsEFG* (ZOGAJ et al., 2001; SOLANO et al., 2002). A presença do operon

bcs não é restrita a *Salmonella* e grupos de genes homólogos estão presentes em todas as espécies investigadas na família *Enterobacteriaceae* (ZOGAJ et al., 2003). Os operons *bcsA*, *bcsB* e *bcsZ* codificam uma subunidade catalítica da síntese de celulose, uma subunidade regulatória que se liga a um ativador ácido digualínico cíclico, c-di-GPM, e a uma endonuclease, respectivamente. O segundo operon, *bcsG* também mostra homologia para genes de endonucleases. Genes *bcs* parecem ser constitutivamente transcritos e, conseqüentemente, sua transcrição não é dependente de CsgD e AdrA (GARCIA et al., 2004).

A síntese de celulose é, desta forma, modulada pela ação oposta de duas enzimas, digualinato ciclase (DGC) e c-di-GPM diesterase (PDEA), controlando os níveis de c-di-GPM na célula. A identificação de dois domínios adjacentes designados como GGDEF e EAL compartilhados por todas as isoenzimas DGC e PDEA sugerem que um ou ambos domínios estão envolvidos na atividade digualinato ciclase (AUSMEES et al., 2001).

O gene *adrA* é um membro da família de proteínas GGDEF que está envolvido na modulação dos níveis de c-di-GPM, especialmente sua atividade digualinato ciclase gera c-di-GPM. A biossíntese de celulose é parcialmente regulada por concentrações intracelulares de c-di-GPM, as quais interagem com as proteínas BCS localizadas no interior da membrana para ativar a biossíntese de celulose (DAVIDSON et al., 2008). A super-expressão de c-di-GPM em *S. Typhimurium* resulta em elevada expressão de *csgD*, formação de *rdar* biofilme e alta produção de celulose, bem como a inibição da motilidade e propriedades de virulência (SIMM et al.; 2014). Estudos têm descrito que a celulose é essencial para a formação de biofilme em ambientes com deficiência de nutrientes (SOLANO et al., 2002; GARCIA et al., 2004) e, é uma importante substância polimérica, pois se entrelaça a outros componentes extracelulares para formar estruturas tridimensionais e promover ligação célula-célula e proteger as células de condições desfavoráveis (LIU et al., 2014).

Adicionalmente a *curli* (*csgD*), o genoma de *S. Typhimurium* contém outros 12 operons possivelmente envolvidos na formação de biofilme (MCCLELLAND et al., 2001). As fimbrias do tipo 1, por exemplo, são estruturas proteínáceas filamentosas, as quais promovem a adesão bacteriana ao tecido hospedeiro e estão presentes na superfície de muitos gêneros de *Enterobacteriaceae*. Essas fimbrias pertencem a uma família de fimbrias da classe das chaperonas que são codificadas pelo cassete gênico *fimABCDEFGHIK*, com o gene *fimA* sendo a maior subunidade estrutural

(KUZMINSKA-BAJOR et al., 2015). A expressão do gene *fimA* mostra-se envolvido na formação de biofilme e parece ser pouco expresso em biofilmes maduros. Isso sugere que o gene *fimA* pode estar envolvido, especialmente na adesão de células planctônicas à superfície ou nos primeiros estágios de formação do biofilme (ROBIJINS et al., 2014). Monteiro e colaboradores (2012) demonstraram que as fimbrias de tipo 1 são importantes nas primeiras 24 horas de formação de biofilme por *Salmonella*. Após esse período, a sua função adesiva é assumida pela fimbria *curli*.

Estudos de microscopia confocal demonstram que mutantes de genes estruturais da fimbria tipo 1 (Δ *fimAICDHF*) aumentam a formação de biofilme em superfícies recobertas com colesterol, mostrando sua importância para a adesão e/ou persistência de *Salmonella* em cálculos biliares. Esse aumento na formação de biofilme pode ser reflexo de um mecanismo compensatório, como *Salmonella* possui vários tipos diferentes de fimbrias, a ausência de fimbrias tipo 1 faz com que a expressão de outras fimbrias seja maior. Durante a formação de biofilme em superfícies recobertas com colesterol, pôde-se observar que houve aumento na expressão da principal subunidade de fimbria *curli* *csgA*. (GONZALES- ESCOBEDO & GUNN, 2013). Stahlhut e colaboradores (2012) avaliaram a formação de biofilme em isolados de *Klebsiella pneumoniae* em cateteres urinários, demonstrando que na deleção do gene *fimA* ou *fimH* há atenuação na formação de biofilme neste dispositivo em comparação com um isolado selvagem, mas que existem mecanismos compensatório entre estes genes. Entretanto, quando houve deleção de ambos genes a formação de biofilme caiu drasticamente e a alta expressão dos genes após 70 horas de formação do biofilme fornece evidências de que *Klebsiella pneumoniae* requer qualquer um dos genes durante a fase de maturação do biofilme e não somente na fase de adesão.

A formação de biofilme é um processo complexo da interação das células com as superfícies de contato, e muitos genes estão envolvidos neste processo. Os genes de adesão envolvendo *adrA*, *bapA*, *csgD*, *csrA* e *rpoS* poderiam ser indispensáveis para a adesão inicial e maturação do biofilme a medida que promovem as interações célula-célula (STEENAKERS et al., 2012).

Além da fimbria *curli* e celulose, a matriz extracelular do biofilme de *Salmonella* é constituído por proteínas associadas ao biofilme (Bap). O BapA é uma proteína rica em treonina que é essencial para a agregação bacteriana e subsequente formação de película na interface ar-líquido em meio Lúria-Bertani. O BapA é codificado pelo gene *bapA* e é secretado na superfície das células por um sistema de secreção tipo 1 geneticamente

ligado ao *BapBCD* (LIU et al., 2014). E sua expressão é coordenada com a expressão de *curli* e celulose, através da ação de *CsgD* (LATASA et al., 2005).

Um estudo realizado por Latasa e colaboradores (2005), a supressão de *BapA* causou perda da capacidade de formar biofilme na interface ar-líquido, ao passo que a superexpressão de uma cópia cromossômica de *BapA* aumentou a formação da massa do biofilme em *Salmonella* Enteritidis. Por outro lado, em um estudo conduzido por Jonas e colaboradores (2007), onde avaliou-se o papel da fímbria *curli*, celulose e *BapA* em biofilmes através de microscopia de força atômica, observou-se que a capacidade de formar biofilme e o morfotipo de colônia não foram alterados em mutantes *BapA*.

Um estudo comparou a expressão de genes de adesão (*adrA*, *bapA*, *csgD*, *crsA* e *rpoS*), quorum sensing (*luxS* e *sdiA*) e de virulência (*invA*, *sipB* e *sipC*) em biofilmes formados por *Salmonella* em cupons de aço inoxidável sob condições laboratoriais semelhantes às condições de ambiente de processamento de alimento e em meios de cultura, caldo tripsina de soja (TSB) e caldo de descongelamento de carne de frango (MTLB). Os níveis relativos de expressão dos genes de adesão (*adrA*, *bapA*, *csgD*, *crsA* e *rpoS*) foram influenciados pelo tipo de meio de cultura, indicando que o mecanismo de formação de biofilme é, de alguma forma, associado com o ambiente de crescimento das células. Houve uma expressão relativamente baixa dos genes de adesão nas células do biofilme em comparação às células planctônicas em 3 dias de incubação, isto provavelmente, deve-se à fase rudimentar do desenvolvimento do biofilme, quando a capacidade de adesão resulta principalmente das características da superfície das células em vez de EPS. Além disso, os níveis de *csgD* e *csgB* em TSB aumentaram acentuadamente nos dias 5 e 7 de incubação, de acordo com o desenvolvimento de um biofilme maduro. No entanto, *csgD* e *csgB* de células de biofilme cultivadas em MTLB apresentaram maior expressão a 3 dias de incubação do que a 7 dias, o que pode estar associado a alta concentração de ferro presente no meio de MTLB, uma vez que a falta de ferro pode prolongar a fase lag de expressão de *csgD* e *adrA*. Neste estudo, *bapA* mostrou uma maior expressão em biofilmes cultivados em meio TBS do que em MTLB (WANG et al., 2016)

2.6 Estratégias para inibição da formação de biofilme

O modo de vida em biofilmes contribui para o sucesso na sobrevivência de microrganismos em ambientes hostis, possibilitando que os mesmos demonstrem maior resistência frente a mudanças ambientais que seus homólogos de vida livre. Em diversos microrganismos de importância médica e econômica, como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, há estudos descrevendo sua habilidade de formar biofilme (STEENACKERS et al., 2012; BHATTACHARYA et al., 2015; FIEDLER et al., 2015; SHARMA et al., 2016), o que possivelmente confere a estes microrganismos maior resistência a antimicrobianos, desinfetantes e estratégias convencionais de limpeza.

Uma ampla gama de fatores (tipo de superfície, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, espécie microbiana, temperatura, pH, etc.) contribuem para a diversidade de biofilmes, os quais são diferentes entre si. Entretanto, até agora não existe um sistema exclusivo que seja capaz de remover todos os biofilmes. Sendo assim, diversos estudos têm sido desenvolvidos para se conhecer os fatores que afetam a resistência de biofilmes de *Salmonella* spp. contra sanitizantes, o que pode vir a ser útil no desenvolvimento de novas estratégias para inibir a formação ou erradicar/remover estes biofilmes do ambiente industrial (AKBAS, 2015; OH et al., 2017; SPERANZA et al., 2017).

Estas estratégias baseiam-se em dois aspectos principais: (a) inibição da formação do biofilme e (b) a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (Figura 4).

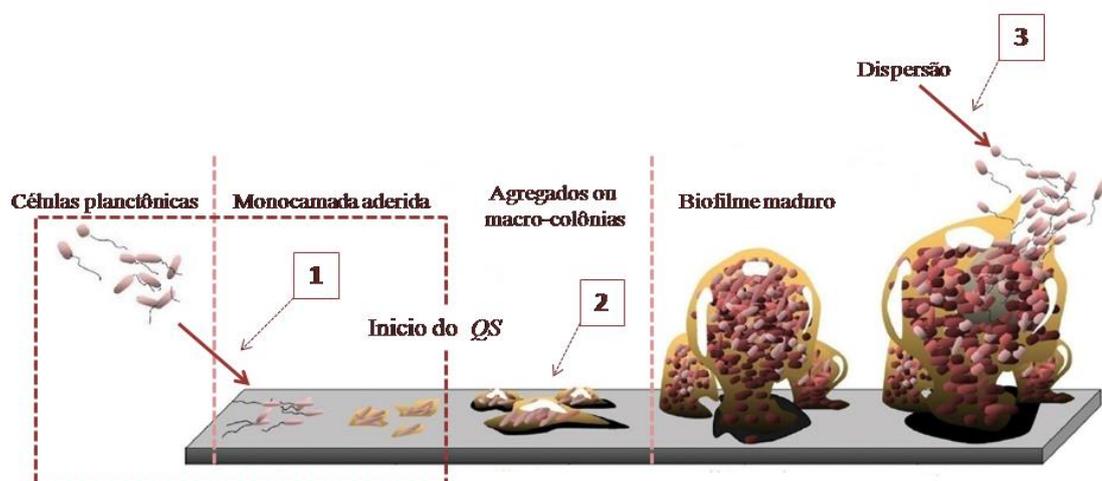


Figura 4- Principais alvos para combate de biofilmes microbianos: inibição da formação do biofilme (etapa 1 e 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3) (Adaptada de CHUNG & TOH, 2014).

A inibição da formação do biofilme pode ser obtida através do bloqueio de adesão microbiana à superfície ou por meio da interrupção da comunicação celular (*Quorum sensing*) (BELOIN et al., 2014). O bloqueio da adesão microbiana pode ser obtido através de abordagens: (i) bioquímicas, as quais utilizam substâncias bactericidas ou com propriedades antiadesivas para modificar a superfície abiótica (revestimento); (ii) físico-químicas que modificam as características da superfície, como por exemplo, a hidrofobicidade; e (iii) biológicas, que utilizam competição bacteriana (biosurfactantes) ou moléculas que inibem ou interferem em algum processo metabólico do microrganismo, como por exemplo, a síntese de flagelo ou gliconeogênese (YANG et al., 2012).

A interrupção da comunicação celular pode ser obtida pelo uso de moléculas inibidoras do sistema *QS* (*QSI*), as quais competem com o receptor das moléculas sinalizadoras, ou de enzimas conhecidas como *Quorum Quenching* (*QQ*), as quais degradam as moléculas de sinalização, podendo bloquear a comunicação bacteriana (BLACKLEDGE et al., 2013; KHAN & LEE, 2016). Desta maneira, a produção de EPS, bioluminescência, virulência, entre outras atividades são inibidas, o que compromete a manutenção da estrutura tridimensional do biofilme (RICHARDS & MELANDER, 2009; MACEDO E ABRAHAM, 2009; YANG et al., 2012).

A erradicação ou tratamento de biofilmes já formados, quando possível, ocorre basicamente através da morte das células do biofilme ou indução da dispersão destas células. O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e melhoria de penetração deste na matriz de EPS, bem como a terapias com fagos, são abordagens utilizadas para promover a morte celular. Entretanto, estas estratégias não erradicam o biofilme já formado (YANG et al., 2012).

Na indústria de alimentos, os tratamentos de limpeza e desinfecção adquirem grande importância, a fim de prevenir ou erradicar/remover o biofilme. Os procedimentos de limpeza devem efetivamente remover os detritos alimentares ou outras sujidades que podem conter microrganismos ou promover o crescimento microbiano, através de água fria ou quente, seguido de aplicação de agentes químicos, enxaguamento e saneamento (FRANK, 2000). Entretanto, em ambientes de processamento de alimentos destinados à alimentação animal, além das medidas de higienização do ambiente é amplamente utilizado o tratamento térmico como método de descontaminação do produto final (rações peletizadas). Contudo, este processo é dependente de vários fatores como temperatura,

tempo de tratamento e microrganismo alvo para que seja potencialmente efetivo na eliminação ou redução à níveis aceitáveis do patógeno (HUSS et al., 2015).

Em alguns casos, o tratamento químico da ração pode oferecer uma medida alternativa de proteção. Tratamento de ingredientes ou rações compostas com misturas de ácidos orgânicos ou com produtos à base de formaldeído em concentrações adequadas, podem ser eficazes na redução da contaminação por *Salmonella* e outros microrganismos. Além disso, o tratamento químico tem um efeito protetor residual na ração, o que ajuda a reduzir a re-contaminação e também ajuda a reduzir a contaminação de equipamentos (moedores, esteiras, misturadores, etc.) e do ambiente em geral (EFSA, 2008).

Os ácidos orgânicos podem ser tão eficazes quanto os desinfetantes químicos, além disso, pode também ajudar a reduzir o uso de agentes químicos, consumo de água e custo de energia (AKBAS, 2015). O uso de ácidos orgânicos também pode ser uma alternativa de tratamento para o controle da formação de biofilme (BORGES et al., 2012). Ácidos orgânicos fracos têm sido descritos como agentes antibacterianos seguros e são amplamente utilizados como aditivos alimentares e protetivos de agentes farmacêuticos. Além disso, os ácidos orgânicos são mais eficazes do que os ácidos inorgânicos para inibir o crescimento e metabolismo de uma ampla variedade microrganismos patogênicos e deteriorantes (NOSTRO et al., 2013).

O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos pode depender de vários fatores, como composição da cadeia lateral, hidrofobicidade ou comprimento da cadeia. É conhecido que ácidos orgânicos fracos são lipofílicos, podendo penetrar a membrana plasmática e acidificar o citoplasma da célula (AKBAS, 2015). Assim, a ação dos ácidos orgânicos sobre os microrganismos é explicada pela capacidade destes ácidos (forma não dissociado) livres de atravessar a membrana celular, dissociarem-se no interior celular mais alcalino, acidificando o citoplasma celular e resultando em uma redução do pH celular interno (VAN IMMERSSEL et al., 2006; NOSTRO et al.; 2013). As bactérias mantêm um pH neutro no citoplasma, exportando para fora da célula o excesso de prótons, este processo consome energia (ATP) e resulta em esgotamento de energia. Os ácidos orgânicos podem inibir a função da membrana e o transporte de nutrientes, prevenir a síntese de macromoléculas e desnaturação de DNA (AKBAS, 2015).

Entretanto, demonstrou-se que o efeito inibitório dos ácidos orgânicos está principalmente relacionado com a quantidade de ácido não dissociado, a qual é influenciada pelo pH, temperatura e a constante de dissociação do ácido (pKa). Quando o pH é equivalente a constante pKa, a proporção de ácido na forma dissociada e não

dissociada é igual. Se o pH do meio diminui, a concentração de formas não dissociadas do ácido aumenta e, então, sua atividade é aumentada (DIBNER & BUTTIN, 2002).

Estudos estão sendo feitos para elucidar a ação de ácidos orgânicos no controle de *Salmonella* e sua ação frente a formação de biofilme por este microrganismo (PARK et al., 2012; ALMASOUD et al., 2015; AMRUTHA et al., 2017). Entre os ácidos orgânicos estudados, estão os ácidos acético, láctico, málico, cítrico, tartárico e peracético.

Um estudo sobre o efeito inibitório dos ácidos orgânicos láctico e málico em autoindutores de *Quorum sensing* do tipo 2 (AI-2) em *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Typhimurium, observou que o ácido láctico sozinho (concentração de 4%) ou em combinação com o ácido málico (ác. Láctico 4% + ác. Málico 4%) foram capazes de inibir a ação de AI-2 em 80% em ambos microrganismos. Além disso, o tratamento combinado de ácido málico e acético (4% w/v de cada ácido) reduziu significativamente a formação de biofilme em *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium (ALMASOUD et al., 2016).

Ácido málico foi considerado eficaz para inibir a formação de biofilme por *Salmonella* Typhimurium em cenouras e outras superfícies de contato com alimentos. Enquanto que, os ácidos cítrico, málico e tartárico apresentaram forte atividade antibacteriana a 75 mM contra agentes patogênicos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium (SINGLA et al., 2014). O uso de ácido láctico (2% w/v), mostrou ser mais efetivo na inativação de microrganismos quando comparado com ácido acético e cítrico. Além disso, ácidos láctico, acético e cítrico mostraram-se efetivos na redução da formação de biofilme, produção de EPS, motilidade e redução na atividade de AI-2 em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp (AMRUTHA et al., 2017).

Um estudo que foi realizado para determinar o efeito de sanitizantes aerossolizados na inativação de biofilmes de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium formados em cupons de aço inoxidável e policloreto de polivinila (PVC), mostrou que biofilmes tratados com 100 ppm de hipoclorito de sódio e ácido peracético por 50 minutos reduziram significativamente as células do biofilme nos três patógenos comparado ao tratamento controle. Inicialmente *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium formaram biofilmes nos cupons com uma densidade de celular de 6,44, 7,09 e 6.18 log UFC/cupom, respectivamente. Após o tratamento com 100 ppm de hipoclorito de durante 50 minutos, a densidade celular dos biofilmes de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e

Salmonella Typhimurium foram reduzidas para 2,56, 0,50 e 2,46 log UFC/cupom, respectivamente. Já o tratamento com 100 ppm de ácido peracético por 50 minutos a redução foi de 4,37 log UFC/cupom para *S. Typhimurium*, 4,58 log UFC/ cupom para *Listeria monocytogenes* e abaixo dos limites detectáveis (1,48 log UFC/cupom) para *Escherichia coli*. Entretanto, a exposição a 200 e 400 ppm de ácido peracético mostrou ser mais efetivo na redução das células do biofilme nos três patógenos (PARK et al., 2012).

O efeito dos ácidos orgânicos em outros microrganismos, além de *Salmonella*, também tem sido reportado. O uso de ácido acético e ácido lático para redução do pH de um meio de cultura para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentou efeito redutor na formação de biofilme por estes microrganismos. Após 6 horas de exposição a pH 5 a redução da formação de biofilme foi de 58-60%; já em pH 6 a redução foi de 10-15% (NOSTRO et al., 2013). Ácido furílico e gálico mostraram efeito inibitório no crescimento de células planctônicas, redução na formação de biofilme e inibição na motilidade em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (BORGES et al., 2012).

Além dos ácidos orgânicos, muitos pesquisadores têm estudado a ação de extratos de plantas e seus óleos essenciais como agente antibiofilme, os quais são conhecidos por representar uma vasta e sustentável fonte de compostos de baixo peso molecular com várias atividades biológicas, incluído a inibição de coagregação interespécies, prevenção da adesão bacteriana e inativação de biofilmes maduros mono ou multiespécies (KHAN & LEE, 2016).

Os óleos essenciais são complexas misturas de substâncias aromáticas e voláteis produzidos pelo metabolismo secundário das plantas em resposta a fitopatógenos e insetos. São obtidos a partir de várias partes da planta (flores, brotos, sementes, galhos, casca, madeira, frutos e raízes) por métodos de extração, fermentação ou expressão e destilação a vapor. Possuem múltipla ação antimicrobiana, como por exemplo, antibacteriana, antifúngica e antiviral (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012).

Os mecanismos de ação, descritos na literatura, dos compostos antimicrobianos de óleos essenciais e/ou óleos essenciais brutos em células planctônicas são: permeabilização da membrana celular, despolarização da membrana plasmática, dano ao polimorfismo lipídico, interação com proteínas da membrana de bactérias Gram-negativas, alteração dos processos do sistema respiratório, coagulação do material

citoplasmático, depleção intracelular de ATP e supressão da produção de toxinas microbianas (SAVIUC et al., 2015). Entretanto, tem sido proposto que o modo de ação dos óleos essenciais nas células do biofilme é pela interrupção do *quorum sensing* ou pela interação com a camada de lipídeos da membrana citoplasmática, resultando em dano e perda da integridade da membrana celular, com subsequente extravasamento de material celular (SONI et al., 2013; KHAN & LEE, 2016).

Diferentes pesquisadores têm se dedicado a elucidar o efeito de diferentes óleos essenciais na formação de biofilme por *Salmonella*. Geralmente, os óleos essenciais com maior atividade antimicrobiana (concentrações menores de 1% vol/vol) são o óleo de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), cujos principais componentes são compostos fenólicos como carvacrol, cinamaldeído, eugenol e timol, respectivamente (RAUT & KARAPPAYIL, 2014).

Ensaio de redução de 2-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-3,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT) mostraram que o óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cinamaldeído em uma concentração de 312 µg/mL diminuíram a formação de biofilme em *Salmonella* Saintpaul em 50%. Interessantemente, o efeito de concentrações de 624 µg/mL de ambos compostos teve efeito similar à concentração de 312 µg/mL. Observou-se também, que o número de células viáveis em biofilmes de *Salmonella* Saintpaul em cupons de aço inoxidável (aproximadamente 8 logs UFC/cm²) foi significativamente reduzido após o tratamento dos cupons por 1 hora com concentrações de 312 µg/mL e 624 µg/mL de óleo essencial de canela e cinamaldeído. Além disso, concentrações sub-inibitórias (234, 156, and 78 µg/mL) do óleo essencial de canela e cinamaldeído também reduziram a contagem de células viáveis nos cupons de aço inoxidável. A maior redução foi observada com 156 µg/mL e 234 µg/ml, na qual foi observada uma diminuição de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos na contagem bacteriana (PIOVEZAN et al., 2014).

Keelara e colaboradores (2016), avaliaram a formação de biofilme em isolados de *Salmonella* provenientes do ambiente e sua susceptibilidade à antimicrobianos naturais, como o cinamaldeído e esporan (mistura de eugenol, timol e extrato de alecrim). Uma concentração de 1000 ppm de cinamaldeído e de esporan reduziram significativamente a formação de biofilme por *Salmonella*, e o efeito bactericida destes antimicrobianos aumentou com o aumento de suas concentrações. O uso de uma concentração de 2000 ppm de ambos antimicrobianos reduziu a população de *Salmonella*

em 6 ciclos logarítmicos a partir de sua população inicial de 7-7.5 UFC/cm² e em concentrações de 3000 ppm *Salmonella* foi indetectável.

Os óleos essenciais de satureja das montanhas, tomilho e alecrim mostraram possuir notável atividade anti-biofilme, propriedades antiadesivas e antibacterianas frente a isolados ambientais de *Salmonella* (MILADI et al., 2016). Carvacrol, composto majoritário do óleo essencial de orégano, foi capaz de inibir a formação de biofilme em uma concentração de 0.5 mM em *Salmonella* Typhimurium DT104 e em *Staphylococcus aureus* 0074, enquanto que não apresentou efeito sobre a formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Em biofilmes já estabelecidos, o carvacrol (até 8 mM) apresentou muito pouca ou nenhuma atividade, mostrando que a formação do biofilme confere proteção contra este composto. Concentrações de 3 mM de carvacrol inibiram a produção de AI-2 a nível de sua expressão gênica, a qual é menor que a concentração que inibe a formação de biofilme, indicando, assim, que a atividade do carvacrol na inibição da formação do biofilme pode estar relacionada à interrupção do *quorum sensing* (BURT et al., 2014).

Os efeitos dos óleos essenciais na formação de biofilme, têm sido reportados tanto em microrganismos Gram-positivos como em Gram-negativos. O óleo essencial de orégano, carvacrol e timol exibiram efeito inibitório em biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O carvacrol e eugenol, em concentrações de 0,3 a 0,9 %, mostram efeitos inibitórios frente a biofilmes formados por *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*, sendo que os biofilmes de *Listeria monocytogenes* mostraram maior resistência a ambos agentes antimicrobianos.

Embora atualmente existam inúmeros estudos sobre os efeitos causados por ácidos orgânicos e óleos essenciais, ainda pouco se sabe sobre a ação destes compostos frente a formação de biofilme ou erradicação/remoção em isolados de *Salmonella* provenientes de fábricas de ração para suínos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar o perfil fenotípico e genotípico de formação de biofilme de cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes de fábrica de ração suína e ação de óleos essenciais sobre estes biofilmes.

3.2 Específico

- a) Determinar fenotipicamente a formação de biofilme em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes de fábrica de ração suína.
- b) Confirmar a presença de genes associados aos fenótipos de formação de biofilme encontrados nos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
- c) Avaliar o efeito dos óleos essenciais de orégano (*Oreganum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) e seus compostos majoritários, carvacrol e timol, na inibição da formação e eliminação/redução de biofilmes maduros nos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.
- d) Avaliar o efeito dos ácidos acético e lático na eliminação/redução de biofilmes maduros nos isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas:

Cinquenta e quatro cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, obtidas durante um estudo transversal realizado em quatro fábricas de ração para suínos, foram utilizados neste estudo (Tabela 1). As cepas foram previamente caracterizadas quanto à origem, sorovar e perfil de macrorestrição (pulsotipo) por Pellegrini e colaboradores (2015). Estas cepas foram obtidas a partir de amostras de ingredientes e ambiente e pertenciam a 16 sorovares: Agona (n = 5), Anatum (n = 4), Cerro (n = 1), Infantis (n = 2), Mbandaka (n = 1), Montevideo (n = 18), Morehead (n = 1), Newport (n = 2), Orion (n = 3), *Salmonella enterica* O:3,10 (n = 2), *Salmonella enterica* O:16:c:- (n = 1), Schwarzengrund (n = 1), Senftenberg (n = 6), Tennessee (n = 4), Typhimurium (n = 1) e Worthington (n = 2).

As cepas pertencentes ao mesmo sorovar e oriundas da mesma fábrica de ração foram submetidas à análise através da técnica de macrorestrição do DNA total, seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE), para a identificação de grupos clonais (PELLEGRINI et al., 2015). Todas as cepas encontravam-se estocadas em caldo BHI adicionado de 20% de glicerol e mantidos congelados a – 20°C. As cepas foram reativadas em caldo BHI para realização dos ensaios descritos a seguir.

Tabela 1 - Caracterização quanto a origem, sorovar e perfil de macro restrição (pulsotipo) de cepas de *Salmonella* proveniente de fábricas de ração para suínos

Identificação	Sorovar	Pulsotipo	Origem	Fábrica	Data Coleta
SA14	Agona	Ag2	Equipamento	D	09/03/2009
SA16	Agona	Ag1	Equipamento	D	09/03/2009
SA20	Agona	Ag2	Equipamento	D	09/03/2009
SA29	Agona	Ag3	Equipamento	D	10/03/2009
SA30	Agona	Ag3	Ingrediente	D	10/03/2009
SAn40	Anatum		Equipamento	B	08/09/2008
SAn43	Anatum		Ingrediente	C	15/09/2008
SAn45	Anatum		Ingrediente	C	15/10/2008
SAn47	Anatum		Ingrediente	C	15/10/2008
SC48	Cerro		Ingrediente	C	15/10/2008
SI3	Infantis	In1	Equipamento	A	30/07/2009

SI4	Infantis	In2	Equipamento	A	28/07/2009
SMb42	Mbandaka		Produto final	C	15/09/2008
SM5	Montevideo	Mt2	Equipamento	A	30/07/2009
SM6	Montevideo	Mt1	Equipamento	A	28/07/2009
SM7	Montevideo	Mt3	Equipamento	A	28/07/2009
SM10	Montevideo	Mt5	Equipamento	C	10/09/2008
SM11	Montevideo	Mt5	Produto final	C	10/09/2008
SM12	Montevideo	Mt4	Produto final	C	10/09/2008
SM13	Montevideo	Mt5	Ingrediente	C	17/03/2009
SM15	Montevideo	Mt7	Ingrediente	D	09/03/2009
SM18	Montevideo	Mt8	Equipamento	D	09/03/2009
SM21	Montevideo	Mt7	Equipamento	D	09/03/2009
SM22	Montevideo	Mt6	Equipamento	D	09/03/2009
SM23	Montevideo	Mt7	Equipamento	D	09/03/2009
SM24	Montevideo	Mt7	Equipamento	D	09/03/2009
SM26	Montevideo	Mt7	Equipamento	D	09/03/2009
SM27	Montevideo	Mt8	Ingrediente	D	09/03/2009
SM33	Montevideo	Mt9	Equipamento	D	10/03/2009
SM34	Montevideo	Mt8	Equipamento	D	10/03/2009
SM37	Montevideo	Mt8	Ingrediente	D	23/07/2009
SMo53	Morehead		Equipamento	B	20/03/2009
SN1	Newport		Equipamento	A	22/07/2008
SN2	Newport		Equipamento	A	22/07/2008
SO8	Orion	Or1	Equipamento	B	08/09/2008
SO9	Orion	Or2	Equipamento	B	08/09/2008
SO50	Orion		Ingrediente	C	15/10/2008
	<i>S.enterica</i> subsp				
S(O:3,10)38	<i>enterica</i> (O:3,10)		Ingrediente	B	08/09/2008
	<i>S.enterica</i> subsp				
S(O:3,10)39	<i>enterica</i> (O:3,10)		Equipamento	B	08/09/2008
	<i>S.enterica</i> subsp				
S(O:16:c:-)54	<i>enterica</i> (O:16:c:-)		Equipamento	B	20/03/2009
SS25	Senftenberg	Se3	Ingrediente	D	09/03/2009

SS28	Senftenberg	Se3	Equipamento	D	10/03/2009
SS31	Senftenberg	Se1	Equipamento	D	10/03/2009
SS36	Senftenberg	Se2	Equipamento	D	10/03/2009
SS41	Senftenberg		Produto final	C	10/09/2008
SS51	Senftenberg		Ingrediente	C	15/10/2008
SSc52	Schwarzengrund		Ingrediente	C	17/03/2009
STe32	Tennessee	Te1	Equipamento	D	10/03/2009
STe35	Tennessee	Te2	Equipamento	D	10/03/2009
STe44	Tennessee		Ingrediente	C	15/10/2008
STe49	Tennessee		Ingrediente	C	15/10/2008
ST46	Typhimurium		Produto final	C	15/10/2008
SW17	Worthington	Wo1	Equipamento	D	09/03/2009
SW19	Worthington	Wo1	Equipamento	D	09/03/2009

4.2 Ensaios fenotípicos para a avaliação da formação de biofilme

4.2.1 Formação de película na interface ar-líquido em caldo:

A avaliação qualitativa da formação de película na interface ar-líquido foi realizada conforme descrito por Solano e colaboradores (2002). Cultivos de 24 horas de todas as cepas e da cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em placas de ágar triptona de soja (TSA; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) foram repicados em 5 mL de caldo Lúria-Bertani com baixo teor de sal (LB- low salt; Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e incubados a 25°C por 96 horas. O biofilme formado foi visualizado como uma película flutuante na interface ar-líquido que bloqueia totalmente a superfície da cultura e não pode ser dispersa por agitação. As cepas foram classificadas como formadores de película rígida, frágil ou ausente (não formadores). O experimento foi repetido em três diferentes ocasiões.

4.2.2 Identificação do morfotipo:

As cepas, a partir do criocultivo, foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI; Himedia, Mumbai, Índia) e, posteriormente, semeadas em meio sólido

triptona de soja (TSA; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) e incubados a 37°C por 24 horas. Colônias isoladas foram semeadas em meio sólido Lúria-Bertani com baixo teor de sal (LB-low salt; Sigma-Aldrich) suplementadas com 40 µg/mL de vermelho congo (Sigma-Aldrich) e 20 µg/mL de coomassie brilliant blue (Sigma-Aldrich) e também foram semeadas em meio sólido LB com baixo teor de sal suplementado com 50 µM de calcofluor (Fluorescent brightener 28; Sigma-Aldrich, USA). As placas foram incubadas a 28°C por 96 horas (LB suplementado com vermelho congo) e 48 horas (LB suplementado com calcofluor) e a 37°C por 24 horas para análise da morfologia da colônia. Indicação de produção de celulose pela cepa foi detectada expondo a placa semeada a uma fonte de 366 nm de luz UV e observando-se a presença de colônias fluorescentes (ROMLING et al., 2003). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos em três diferentes ocasiões.

Classificaram-se as cepas quanto ao seu morfotipo através da combinação dos resultados obtidos em ambos meios de cultivo (agar suplementado com vermelho congo e agar suplementado com calcofluor). Sendo assim, as cepas foram classificadas em: morfotipo *rdar* (vermelha, seca e rugosa; expressa fimbria curli e celulose), *pdar* (rosa, seca e rugosa; expressa celulose), *bdar* (marrom, seca e rugosa; expressa fimbria curli), *saw* (mucóide; não expressa a fimbria curli nem celulose) e *sbam* (marrom mucóide; não expressa celulose) (ROMLING et al., 2003; MALCOVA et al., 2008).

A cepa padrão *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi utilizada como controle de comparação por possuir morfotipo *rdar* (RÖMLING et al., 1998).

4.2.3 Formação de biofilme em placas de poliestireno:

A metodologia para avaliação da formação qualitativa de biofilme em placas de poliestireno foi baseada na técnica descrita por Stepanovic e colaboradores (2000). As cepas padrões utilizadas foram: (i) *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, como controle positivo por possuir característica de ser fortemente/moderadamente aderente a 28°C e não aderente a 37°C; (ii) *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, como controle positivo por ser fracamente aderente a 28°C e a 37°C e (iii) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, como controle positivo por ser fortemente aderente a 37°C e ser não aderente a 28°C. Para realização do ensaio, as cepas de *Salmonella* testadas e as cepas padrões foram semeadas em meio TSA sólido e incubadas por 18 horas a 37°C. Colônias

foram transferidas para um tubo contendo solução salina a 0,85% até obter turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland por observação visual.

Posteriormente, 230 μL de caldo triptona de soja sem glicose (TSB; Bacto®, New Jersey, Estados Unidos da América) e 20 μL de suspensão bacteriana (0,5 McFarland) foram inoculados, em triplicata, em poços de placas de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades de fundo plano (TPP® Techno PlasticProducts AG, Switzerland). Como controle negativo, foi utilizado o mesmo volume de meio de cultura, porém sem a suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a 28°C por 96 horas. Passado o período de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado três vezes com 250 μL de água destilada. Para fixação do biofilme foi adicionado 250 μL de metanol p.a por 15 minutos, com posterior remoção. As placas foram secas durante 15 minutos a 37°C e então coradas com 250 μL de solução de cristal violeta de Hucker 2% durante 5 minutos. Após este tempo, a solução de cristal violeta foi retirada e realizou-se três lavagens com água destilada. Removida a água destilada, as placas foram deixadas para secar a 37°C.

A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos aderidos foi determinada por leitura da absorbância em leitor automatizado de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Leitor de absorbância; ETL Testing Laboratories Inc., Nova Iorque, Estados Unidos da América) em comprimento de onda de 550nm com 300 μL de Ácido Acético Glacial a 33% para ressuspender o biofilme aderido.

Todas as cepas foram separadas em categorias de acordo com a DO dos filmes bacterianos, como descrito anteriormente por Stepanovic e colaboradores (2007). As cepas foram classificadas como: não produtor de biofilme ($\text{DO} \leq \text{DOc}$), fraco produtor de biofilme ($\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$), moderado produtor de biofilme ($2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$) e forte produtor de biofilme ($4 \times \text{DOc} < \text{DO}$). Definiu-se o ponto de corte (DOc) como três desvios padrões acima da média da DO do controle negativo. As cepas foram testadas três vezes e em triplicata, resultando em nove leituras de DO para cada isolado e para cada cepa padrão.

4. 3 Extração de DNA genômico e ensaios de PCR

As cepas foram semeadas em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Após, 1 mL da cultura foi transferida para um microtubo, centrifugado a 8.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. DNA genômico foi extraído usando o NucleoSpin®

Tissue Kit (Machery-Nigel; Düren; Germany), conforme instruções do fabricante e, a qualidade e integridade do DNA gênomico extraído foram verificados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo ($5\mu\text{g ml}^{-1}$).

A presença dos genes *csgD*, *adrA*, *fimA* e *bapA* envolvidos na formação de biofilme, foi detectada pela reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction*; PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores listados na Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em termo-ciclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems; Waltham; Estados Unidos da América) num volume total de 25 μL contendo: 2,5 μL de 10x PCR buffer, 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen; Groningen; Holanda), 1U de Taq DNA polimerase (Ludwig; Alvorada; Brasil), 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 2 μL de DNA da amostra e água ultrapura autoclavada. Para os genes *csgD* e *adrA* foram utilizados um ciclo inicial de 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 94°/30 segundos, 60°C/30 segundos e 72°C/ 30 segundos. A temperatura final de extensão foi 72°C por 4 minutos. Para o gene *fimA* foi utilizado um ciclo inicial de 94°C durante 1 minuto para desnaturação inicial, seguido de 25 ciclos de 94°C/1 minuto, 58°C/ 30 segundos, 72°C/ 30 segundos; e temperatura final de extensão de 72°C por 5 minutos. Para o gene *bapA* foi utilizado um ciclo inicial de 94°C/5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 50°C/45 segundos, 72°C/1 minuto; e temperatura final de extensão de 72°C por 5 minutos. Em ambas reações de amplificação, foi utilizado como controle positivo a cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e como controle negativo água ultrapura estéril.

Alíquotas 10 μL dos produtos de amplificação foram acrescidas de 1 μL de corante Blue Green Loading Dye 1 (LCG Biotecnologia; São Paulo; Brasil), separadas em gel de agarose a 2%, em tampão tris-acetato-EDTA e fotografadas sob luz ultravioleta, em transiluminador e imagem capturada e digitalizada pelo sistema Kodak gel logic 2200 (Rochester).

Tabela 2 - Sequência de Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Gene	Produto (pb)	Sequência (5' - 3')	Referência
<i>csgD</i>	123	fw: TGCGGACTCGGTGCTGTTGT rv: CAGGAACACGTGGTCAGCGG	Oliveira et al., 2014
<i>adrA</i>	92	fw: GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT	Oliveira et al., 2014

		rv: GCCCATCAGCGCGATCCACA	
<i>fimA</i>	85	fw: CCTTTCTCCATCGTCCTGAA	Cohen et al., 1996
		rv: TGGTGTATCTGCCCGACCA	
<i>bapA</i>	667	fw: GCCATGGTGCTGGAAGGCCTGGCGGTT	Biswas et al.; 2010
		rv:GGTCGACGGGAAGGGTAAAATGACCTTC	

fw: oligonucleotídeo forward; rv: oligonucleotídeo reverse

4.4 Estudo do efeito de diferentes agentes antimicrobianos na formação de biofilme e em biofilmes maduros

Das cinquenta e quatro cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* analisadas anteriormente, selecionou-se quatro cepas para esta etapa do estudo. Essas quatro cepas apresentam as seguintes características: (i) pertencem ao sorovar Montevideo (SM21, SM24, SM27 e SM34), o qual representa 33,33% (18/54) das cepas obtidas em fábricas de ração no estudo de Pellegrini et al.(2015), (ii) pertencem aos dois perfis de macro restrição Mt7 (cepas que foram oriundas de diferentes amostras da mesma fábrica de ração em uma única coleta) e Mt8 (cepas oriundas de diferentes amostras da mesma fábrica de ração mas provenientes de coletas diferentes), os quais foram os mais frequentes entre as cepas de *Salmonella* Montevideo e (iii) apresentaram capacidade de formar biofilme *in vitro* nas etapas anteriores.

Paralelamente uma cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 também foi analisada. Os ensaios descritos abaixo foram realizados conforme Soni e colaboradores (2013) com modificações.

4.4.1 Agentes antimicrobianos:

Óleos essenciais: Os óleos essenciais de orégano (*Oreganum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) foram adquiridos de Lazlo Aromatologia Ltda (Belo Horizonte; Brasil) e seus compostos majoritários carvacrol e timol foram comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis; Estados Unidos). A determinação dos compostos principais dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução pelo fabricante. Os constituintes principais do óleo essencial de orégano foram: carvacrol, para-cimeno e gama-terpineno. Para o óleo essencial de tomilho foram: timol, para-cimeno e linalol. O óleo essencial de orégano e seu composto majoritário (carvacrol) foram inicialmente solubilizados em

propileno glicol (50:50 [vol/vol]); o óleo essencial de tomilho foi solubilizado em Tween 80 (Sigma-Aldrich) e seu composto majoritário (timol) foi solubilizado em álcool etílico p.a 95%. Duzentos microlitros dos óleos essenciais e seus compostos majoritários foram adicionados a TSB sem glicose para se obter concentrações de 1% destes agentes, e então foram realizadas duas diluições seriadas para preparar várias concentrações para uso nos ensaios a seguir. As concentrações dos óleos essenciais e seus compostos majoritários a serem testadas estão listadas na Tabela 3.

Ácidos orgânicos: As soluções de trabalho de ácido acético (> 99,7%; Sigma-Aldrich) e ácido láctico (85%, Neon Comercial Ltda, Vila Prudente, São Paulo) foram preparadas usando TSB sem glicose. Antes do uso, foi medido o pH das soluções utilizadas nos ensaios para que o pH estivesse abaixo do valor da constante de dissociação (pKa) de cada ácido. Sendo que, a pKa do ácido acético é 4.8 e a pKa do ácido láctico é 3.86.

Tabela 3 - Concentrações de óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos testados.

Óleo/composto/ácidos	Concentrações a serem testadas
Óleo essencial de orégano	CIM e CBM (% vol/vol): 0,1 a 0,006 (diluição base 2)
Óleo essencial de tomilho	CIM e CBM (% vol/vol): 0,1 a 0,006 (diluição base 2)
Carvacrol	CIM e CBM (% vol/vol): 0,1 a 0,006 (diluição base 2)
Timol	CIM e CBM (% vol/vol): 0,1 a 0,006 (diluição base 2)
Ácido acético	CIM e CBM (% vol/vol): 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5
Ácido láctico	CIM e CBM (% vol/vol): 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5

CIM= Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima

4.4.2 Teste dos agentes antimicrobianos

Os estudos das ações dos diferentes agentes antimicrobianos foram conduzidos em placas de micro titulação de poliestireno com 24 cavidades de fundo chato (TPP® Techno PlasticProducts AG, Switzerland). Cada cepa foi exposta a diferentes concentrações dos óleos essenciais e seus compostos majoritários para avaliar o efeito destes agentes na inibição da formação de biofilme e sua ação na remoção de biofilmes já maduros. Para as cepas que foram expostas a diferentes concentrações dos ácidos orgânicos, avaliou-se a ação destes ácidos na remoção de biofilmes maduros. Todas as

cepas foram testadas em triplicata, e cada ensaio foi repetido em três tempos diferentes totalizando nove mensurações para cada cepa e concentração de cada agente.

4.4.3 Teste de susceptibilidade bacteriana de células planctônicas aos diferentes agentes antimicrobianos

O teste foi realizado em placas de micro titulação de poliestireno com 24 cavidades de fundo chato. As cepas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI e sub-cultivadas duas vezes a 37°C, para ativação das células. Após, foram feitas suspensões celulares em solução salina a 0,85 % até obter turvação semelhante a 0,5 da escala McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foram adicionados em cada poço, em triplicata, 2 mL de TSB sem glicose contendo diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos e 10 µL dos inóculos bacterianos. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Foram usados controles de crescimento (TSB sem glicose + suspensão bacteriana), controles de esterilidade (TSB sem glicose e TSB sem glicose + a maior concentração dos agentes antimicrobianos a serem testadas) e controle do efeito do solubilizante (propileno glicol, tween 80 e álcool etílico) no crescimento bacteriano (TSB sem glicose + 1% de solubilizante + suspensão bacteriana).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do agente antimicrobiano em que não houve turvação visível do meio de cultivo. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir da transferência de 250 µL do conteúdo de cada poço da microplaca sem crescimento visível para um tubo contendo 3 mL de caldo BHI. Quando não houve turvação do caldo, foi interpretado como tendo havido ação bactericida. A CBM foi a menor concentração com ação bactericida do agente antimicrobiano. Nos tubos de BHI em que houve turvação, foi realizado cultivo de uma alíquota em ágar TSA, para verificar a identidade do microrganismo.

4.4.4 Efeito de concentrações não bactericidas dos agentes antimicrobianos na inibição de formação de biofilme

Este ensaio foi conduzido para determinar se os agentes antimicrobianos possuem a habilidade para interferir com a formação de biofilme de *Salmonella*. Foram distribuídos, em triplicata, 1 mL de TSB sem glicose contendo concentrações não

bactericidas dos antimicrobianos em placas de micro titulação de poliestireno com 24 cavidades de fundo chato. Após, foram adicionados 10 μ L de suspensão bacteriana ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de cada cepa. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 28°C. Após a etapa de incubação, as placas foram processadas para a quantificação de biofilme, conforme Stepanovic e colaboradores, (2000) e descrito no item 1.2.3. Para os óleos essenciais de orégano e tomilho foram testadas concentrações não bactericidas de 0,025%; 0,012% e 0,006% e para os compostos majoritários, carvacrol e timol, foram testadas concentrações de 0,012% e 0,006%.

Todos os ensaios foram realizados em três tempos independentes (repetições), totalizando nove mensurações por cepa ($n = 4$) e concentração dos diferentes agentes antimicrobianos ($n = 4$). A partir dos dados coletados, as comparações de médias entre os diferentes tratamentos foram realizadas por meio de Análise de Variância considerando a cepa como uma variável aleatória. O modelo foi rodado pelo programa estatístico SAS versão 9.2 com o PROC MIXED, com nível de confiança de 95%.

4.4.5 Efeito de concentrações não bactericidas e letais na redução de biofilme maduro

Distribuiu-se 1 mL de TSB sem glicose e 10 μ L de suspensão bacteriana ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de cada cepa, em triplicata, em placas de micro titulação de poliestireno com 24 cavidades e incubou-se por 48 horas a 28°C em condições estáticas. Após a incubação, cada poço foi lavado três vezes com solução salina 0,85% estéril para a remoção das células planctônicas e então adicionou-se 2 mL por poço de TSB sem glicose contendo concentrações não bactericidas e letais dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos. As placas foram incubadas por 48 horas a 28°C e quantificadas como descrito no item 1.2.3.

As concentrações testadas para os óleos essenciais de orégano e tomilho e seus compostos majoritários, carvacrol e timol, foram de 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,012% e 0,006%. Enquanto que, para os ácidos acético e lático as concentrações testadas foram de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%.

Todos os ensaios foram realizados em três tempos independentes (repetições), totalizando nove mensurações por cepa ($n = 4$) e concentração dos diferentes agentes antimicrobianos ($n = 6$). A partir dos dados coletados, as comparações de médias entre os diferentes tratamentos foram realizadas por meio de Análise de Variância considerando a

cepa como uma variável aleatória. O modelo foi rodado pelo programa estatístico SAS versão 9.2 com o PROC MIXED, com nível de confiança de 95%.

4.4.6 Efeito dos diferentes agentes antimicrobianos na redução de biofilmes maduros em cupons de flandres

Foram utilizados cupons de flandres para simular o ambiente da fábrica de ração, uma vez que, a maioria dos equipamentos utilizados no preparo de rações são fabricados deste material. Os cupons foram adquiridos em Funilaria Gaúcha (Porto Alegre, Brasil) e confeccionados para possuir área de superfície de 1cm^2 . Antes de realizar os ensaios, os cupons foram higienizados com álcool etílico hidratado 70° INPM e esterilizado em autoclave por 30 minutos.

Das quatro cepas de *Salmonella* Montevideo, testadas nas etapas descritas em 1.4 a 1.4.5, selecionou-se uma (SM34) para realização deste ensaio. Esta cepa pertence ao pulsotipo Mt8 (pulsotipo persistente em três coletas diferentes na mesma fábrica de ração e oriundos de diferentes amostras) e apresentou capacidade de formar biofilme *in vitro* em todos ensaios fenotípicos e genotípico para formação de biofilme. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 também foi analisada.

O teste foi realizado em placas de micro titulação de poliestireno com 24 cavidades de fundo chato contendo cupons de flandres estéreis. Depositou-se no topo do cupom 250 μL de suspensão bacteriana ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e após incubou-se a placa por 24 horas a 28°C . Após a incubação, os cupons foram lavados com solução salina 0,85% estéril por três vezes. Subsequentemente, os cupons foram expostos a 500 μL de TSB sem glicose com concentrações de 0,1% dos óleos essenciais e seus compostos majoritários. Enquanto que, para os ácidos orgânicos a concentração testada foi de 2,5%. Após o tratamento, os cupons foram lavados três vezes com solução salina 0,85% estéril e transferidos para tubos contendo 20 mL de água peptonada 0,1% com cinco esferas de vidro (5mm de diâmetro). Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 2 minutos e as células de *Salmonella* foram enumeradas em placas de agar xilose lisina desoxicolato (XLD; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

As contagens de *Salmonella* obtidas foram transformadas em logaritmo (\log_{10}) e analisadas pela comparação entre a contagem de densidade celular do controle positivo obtida nos cupons e a contagem obtida após o tratamento do cupom com os diferentes agentes antimicrobianos.

4.5 Microscopia de escaneamento confocal a laser

A microscopia de escaneamento confocal a laser foi utilizada para visualizar o efeito dos agentes antimicrobianos sobre biofilme maduros de *Salmonella* em cupons de flandres. Avaliação microscópica foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Salmonella Montevideo SM34 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram utilizadas neste ensaio. O teste foi realizado em placas de micro titulação de poliestireno com 24 cavidades contendo em cada poço um cupom de flandres estéril conforme descrito por Capita e colaboradores (2017) com modificações. Foram depositados 250 µL de suspensão bacteriana ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) no topo de cada cupom, seguido de incubação da placa, contendo os cupons, por 24 horas a 28°C. Após a incubação, os cupons foram lavados três vezes com solução salina 0,85% estéril para remoção de células planctônicas não aderidas. Em seguida, os cupons foram expostos a 500 µL de TSB sem glicose com concentrações de 0,1% dos óleos essenciais e seus compostos majoritários e concentração de 2,5% dos ácidos orgânicos, seguido de incubação por 24 horas a 28°C. Posteriormente, os cupons foram lavados com solução salina 0,85% por três vezes. Um volume de 2 µL de uma mistura de 1:1 de corantes fluorescentes SYTO9 (estoque 3.34 mM em DMSO) e iodeto de propídio (IP; estoque 20 mM em DMSO) do LIVE/DEAD® BacLight™ Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) foram adicionados a 497,5 µL de solução salina 0,85% estéril, e 50 µL desta solução foi depositada sobre o cupom de flandres. A placa contendo os cupons foi então incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 15 minutos para permitir a marcação fluorescente das bactérias. Durante a captação da imagem pela microscopia confocal, SYTO9 emite uma fluorescência verde indicando os microrganismos vivos com membranas intactas, enquanto que o iodeto de propídio emite fluorescência vermelha e marca as bactérias mortas com membranas danificadas. Podendo-se, portanto, identificar simultaneamente as células vivas das células mortas.

A aquisição da imagem pela microscopia confocal foi realizada utilizando um microscópio confocal Olympus IX81 e objetiva UPLSAPO 60X W NA: 1.20 e as imagens foram sobrepostas usando o software ImageJ. Foram obtidas duas imagens de cada condição e uma imagem tridimensional.

As imagens foram analisadas usando o software ImageJ. Nas imagens planas foram obtidas a quantidade de células vivas (coloração verde) e células mortas (coloração

vermelha), enquanto que nas imagens tridimensionais foi obtida a altura do biofilme formado.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio fenotípicos para a avaliação da formação de biofilme

Cinquenta e quatro cepas foram avaliadas, fenotipicamente, para formação de biofilme, quanto ao seu morfotipo, formação de película na interface ar-líquido e formação de biofilme em microplacas de poliestireno a 37°C e a 28°C.

Todas as cepas apresentaram morfotipo *rdar* a 28°C e morfotipo *saw* a 37°C (Figura 5). Entre estas, encontrou-se oito perfis fenotípicos distintos para formação de biofilme e apenas uma cepa pertencente ao sorovar Montevideo não apresentou fenótipo para formação de biofilme (SM33) (Tabela 4). Não houve relação entre os perfis encontrados e os sorovares, pois entre as cepas de um mesmo sorovar observou-se diferente perfis fenotípicos.

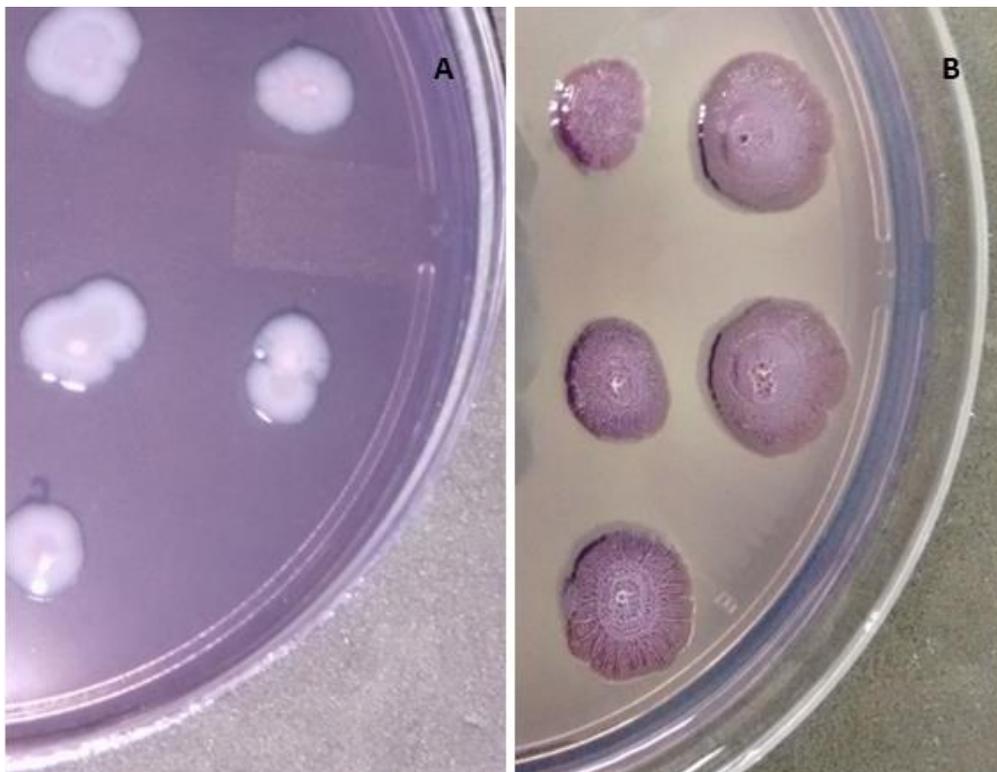


Figura 5- Morfotipo em cepas de *Salmonella*. (A) morfotipo *saw* após 24 horas de incubação a 37°C; (B) morfotipo *rdar* após 96 horas de incubação a 28°C em ágar Lúria-Bertani com baixo teor de sal e suplementado com 40 µg/mL de Vermelho Congo e 20 µg/mL de Coomassie Brilliant Blue. (Fonte: arquivo pessoal)

Tabela 4 - Diferentes perfis fenotípicos para formação de biofilme observados em cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* oriundas de fábricas de ração para suínos.

Perfil	Total de cepas/Perfil	Ensaio fenotípicos				
		Morfotipo		Película em LB*	Microplaca	
		28°C	37°C		37°C	28°C
Perfil 1	23	<i>rdar</i>	saw	Rígida	NF	M
Perfil 2	2	<i>rdar</i>	saw	Rígida	F	F
Perfil 3	14	<i>rdar</i>	saw	Ausente	NF	M
Perfil 4	7	<i>rdar</i>	saw	Frágil	NF	M
Perfil 5	3	<i>rdar</i>	saw	Rígida	F	M
Perfil 6	1	<i>rdar</i>	saw	Frágil	NF	F
Perfil 7	1	<i>rdar</i>	saw	Ausente	F	M
Perfil 8	2	<i>rdar</i>	saw	Frágil	F	M

NF: não forma biofilme; F: fracamente formadora de biofilme; M: moderadamente formadora de biofilme.

Os perfis fenotípicos para formação de biofilme mais frequentes foram os perfis 1, 3 e 4, os quais representaram 81,48 % (44/54) das cepas estudadas. O perfil 1 representou 42,6 % (23/54) das cepas e apresentou as mesmas características fenotípicas para formação de biofilme que *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, a qual forma uma rígida película na interface ar-líquido, não forma biofilme a 37°C e é moderadamente formadora de biofilme a 28°C (Tabela 5). Os perfis 3 e 4 representaram 25,92 % (14/54) e 12,96 % (7/14) das cepas, respectivamente.

Os perfis 1, 3 e 4 têm como características comuns a moderada capacidade destas cepas de formarem biofilme a 28°C e ausência de formação de biofilme a 37°C, entretanto, estes perfis diferem na capacidade de produzir película na interface ar-líquido. Enquanto, as cepas pertencentes ao perfil 1 (23/54) e 4 (7/54) produziram películas rígidas e frágeis, as cepas pertencentes ao perfil 3 (14/54) não foram capazes de produzir película na interface ar-líquido.

Os perfis 2 (2/54), 5 (3/54), 6 (1/54), 7 (1/54) e 8 (2/54) juntos representaram 14,81 % (9/54) das cepas. As cepas pertencentes ao perfil 2 possuem como característica a fraca capacidade de formar biofilme tanto a 28°C como a 37°C, embora possuam morfotipo *rdar* e formem películas na interface ar-líquido. Já a cepa pertencente ao perfil 6 apresentou morfotipo *rdar* e formou uma película frágil na interface ar-líquido, mas não formou biofilme a 37°C e é fracamente formadora de biofilme a 28°C.

As cepas pertencentes aos perfis 5, 7 e 8 apresentaram morfotipo *rdar*, são moderadamente formadoras de biofilme a 28°C e fracamente formadoras a 37°C, mas diferem quanto à formação de película na interface ar-líquido. Além disso, as cepas pertencentes ao perfil 5 (SO50, SS51 e STe49) possuíram características de formação de biofilme em todos os ensaios fenotípicos *in vitro* realizados.

Pode-se observar que para a maioria das cepas estudadas, não houve relação entre o perfil fenotípico para formação de biofilme e o perfil de macro restrição a que estas cepas pertencem (Tabela 5). A única relação entre o perfil fenotípico para formação de biofilme e perfil de macro restrição foi observada nos sorovares Agona e Montevideo. As cepas pertencentes ao sorovar Agona (SA29 e SA30) que apresentaram perfil fenotípico 4 para formação de biofilme possuíam o mesmo perfil de macro restrição Ag3. Estas cepas possuem morfotipo *rdar*, formam uma película frágil na interface ar-líquido e são moderadamente formadoras de biofilme a 28°C. Além disso, foram isoladas de amostras de glúten de milho (SA30) e de detritos de equipamento (tombador) na mesma fábrica de ração em uma única coleta, podendo-se considerar estas cepas como frequentes nesta fábrica de ração.

As cepas pertencentes ao sorovar Montevideo (SM18, SM27, SM34 e SM37) que apresentaram perfil fenotípicos 1 para formação de biofilme pertenciam ao perfil de macro restrição Mt8 (Tabela 5). Estas cepas possuem as mesmas características para formação de biofilme *in vitro* que *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, a qual possui morfotipo *rdar*, forma película rígida, não forma biofilme a 37°C e é moderadamente formadora de biofilme a 28°C. Além disso, estas cepas foram isoladas em diferentes tipos de amostra (ingredientes e equipamentos) e em dias diferentes de coleta na mesma fábrica de ração, podendo-se considerar estas cepas como persistentes nesta fábrica. Este perfil Mt8 foi o segundo perfil mais frequente entre as cepas pertencentes ao sorovar Montevideo (4/18), sendo o perfil Mt7 o mais frequente (5/18).

Tabela 5 - Perfil de macro restrição e perfis fenotípicos para formação de biofilme em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* oriundas de fábrica de ração suína.

Sorovar	Perfil de macro restrição	Perfil fenotípico
Agona (n = 2)	Ag1e Ag2	
Anatum (n = 2)	nd	
Cerro (n = 1)	nd	
Infantis (n = 2)	nd	Perfil 1

Montevideo (n = 8)	Mt1, Mt2, Mt3, Mt7 e Mt8 (4)	
Newport (n = 2)	nd	
Senftenberg (n = 2)	Se2 e nd	
Schwarzengrund	nd	Perfil 1
Tennessee (n = 2)	Te1 e Te2	
Worthington	Wo1	
Montevideo	Mt6	
Senftenberg	Se3	Perfil 2
Agona	Ag2	
Anatum	nd	
Montevideo (n = 5)	Mt 4, Mt5 (2) e Mt7 (2)	
Orion (n = 2)	Or1 e Or2	Perfil 3
<i>S. entérica</i> (O:3,10) (n = 2)	nd	
Senftenberg	Se3	
Tennessee	nd	
Worthington	Wo1	
Agona (n = 2)	Ag3 (2)	
Mbandaka	nd	
Montevideo (SM13)	Mt5 e Mt7	Perfil 4
Senftenberg	Se1	
Typhimurium	nd	
Orion	nd	
Senftenberg	nd	Perfil 5
Tennessee	nd	
Anatum	nd	Perfil 6
Montevideo	Mt7	Perfil 7
Morehead	nd	
<i>S. enterica</i> (O:16:c:-)	nd	Perfil 8

nd: não determinado

5.2 Ensaios de Reação da Cadeia de Polimerase

A presença dos genes *csgD*, *adrA*, *fimA* e *bapA* envolvidos na formação de biofilme, foram detectados pela Reação da Cadeia de Polimerase, utilizando iniciadores

gene-específicos para *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, pela amplificação de fragmentos de DNA de 123 pb, 92 pb, 85 pb e 667 pb, conforme o esperado (Figura 6). Os quatro genes pesquisados foram detectados em todas as 54 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* estudadas.

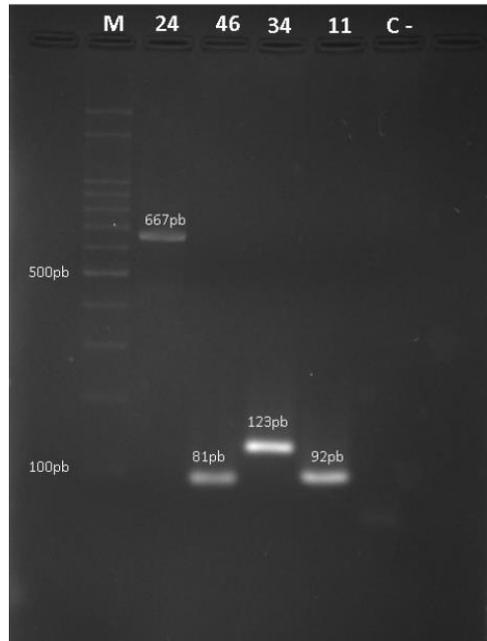


Figura 6-Verificação da amplificação dos produtos da Reação da Cadeia de Polimerase em gel de agarose a 2% com marcador molecular de 100 pb (canaleta M), cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (SM24, SM46, SM34 e SM11), controle negativo sem DNA (C-).

5.3 Estudo do efeito de diferentes agentes antimicrobianos na formação de biofilme

Quatro cepas pertencentes ao sorovar Montevideo (SM21, SM24, SM27 e SM34) que apresentaram capacidade de formar biofilme *in vitro* nos ensaios em microplacas de poliestireno e pertencentes aos dois perfis de macro restrição mais frequentes (Mt7 e Mt8), juntamente com *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, foram testadas frente a diferentes agentes antimicrobianos quanto à susceptibilidade de suas células planctônicas, inibição de formação de biofilme e remoção de biofilme maduro.

Para avaliar o efeito antibacteriano dos óleos essenciais de orégano, tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol, as células planctônicas das quatro cepas de *Salmonella* Montevideo estudadas (SM21, SM24, SM27 e SM34) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, foram expostas à presença de diferentes concentrações destes agentes (0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,012 % e 0,006 %). Não houve crescimento

para todas cepas na presença dos óleos essenciais de orégano, tomilho e timol a uma concentração de 0,05 % (v/v), sendo esta considerada como a concentração inibitória mínima (CIM). Além disso, não houve a recuperação de células bacterianas quando alíquotas desta concentração dos óleos essenciais foram semeadas em TSA, assim a concentração bactericida mínima (CBM) também foi de 0,05 % (v/v). Entretanto, para o composto majoritário timol a CBM foi de 0,025 % (v/v). Além disso, quando células planctônicas destas cepas foram expostas ao carvacrol, observou-se que tanto CIM como CBM foram de 0,025 % (v/v) (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de orégano, tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol para células planctônicas de cepas de *Salmonella* Montevideo

Cepas	Orégano		Tomilho		Carvacrol		Timol	
	(% v/v)		(% v/v)		(% v/v)		(% v/v)	
	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
SM21	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,025	0,05
SM24	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,025	0,05
SM27	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,025	0,05
SM34	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,025	0,05
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,025	0,05

CBM: concentração bactericida mínima; CIM: concentração inibitória mínima.

Após avaliar o efeito antibacteriano dos óleos essenciais de orégano e tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol, utilizou-se concentrações sub-inibitórias para avaliar o efeito destes compostos na formação de biofilme nas quatro cepas de *Salmonella* Montevideo (SM21, SM24, SM27 e SM34) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. As concentrações sub-inibitórias testadas para os óleos essenciais foram de 0,025 %, 0,012 % e 0,006 % (v/v), enquanto que para os compostos majoritários foram de 0,012 % e 0,006 % (v/v).

A concentração sub-inibitória de todos os compostos testados foram capazes de reduzir a formação de biofilmes em todas as cepas de *Salmonella* Montevideo, exceto a formação de biofilme em *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 na presença de óleo de tomilho em todas as suas concentrações testadas (Tabela 7). A quantidade de biofilme

produzida por todas as cinco cepas foi reduzida na presença de óleo de orégano e tomilho a uma concentração de 0,025 %, mas não existiu diferença significativa ($p \leq 0,05$) na redução do biofilme nas concentrações de 0,012 e 0,006 % quando comparado com o controle positivo, exceto para a cepa SM24, onde pode-se observar redução na formação de biofilme na presença de óleo de tomilho, tanto na concentração de 0,025 % como também a 0,012 %.

O tratamento com carvacrol a 0,012 % reduziu a quantidade de biofilme produzido por todas as cinco cepas de *Salmonella*, mas não existiram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) a 0,006 % quando comparadas com o controle positivo. No tratamento com timol, ambas as concentrações (0,012 e 0,006 %) reduziram a quantidade de biofilme produzido pelas cinco cepas, quando comparadas ao controle positivo, mas não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações, quando comparada entre si.

O efeito dos diferentes agentes antimicrobianos na redução de biofilmes maduros foi analisado através de ensaios em microplaca de poliestireno seguido de coloração de cristal violeta, contagem de unidade formadora de colônias (UFC) em cupons de flandres e microscopia confocal.

Nos ensaios em microplacas de poliestireno, apenas os óleos essenciais de orégano e tomilho em concentrações 0,1 % foram capazes de reduzir a biomassa de biofilmes maduros em todas as cepas testadas quando comparados com os biofilmes controles (Tabela 9). As leituras de DO_{550} para os poços controles estavam entre 0,73 e 0,76 para todas cepas de *Salmonella*, enquanto que o tratamento com os óleos essenciais de orégano e tomilho a 0,1 % reduziram o biofilme a níveis de ~ 0,3 a 0,2 unidades, respectivamente. Entretanto, nos ensaios de redução de biofilme em cupons de flandres e nas imagens de microscopia confocal pode-se observar redução de biofilme maduro em ambas cepas testadas.

Tabela 7 - Efeito de concentrações sub-inibitórias dos óleos essenciais de orégano, tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol na inibição da formação de biofilme em cepas de *Salmonella*.

Cepas	Controle positivo	Orégano			Carvacrol		Tomilho			Timol	
		0.025%	0.012 %	0.006%	0.012 %	0.006%	0.025%	0.012 %	0.006%	0.012 %	0.006%
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	0.72 ^{aA}	0.09 ^{aB}	0.63 ^{abA}	0.61 ^{aA}	0.14 ^{aBC}	0.73 ^{aA}	0.61 ^{aA}	0.6 ^{aA}	0.6 ^{aA}	0.21 ^{aC}	0.11 ^{aBC}
<i>S. Montevideo</i> 21	0.64 ^{aA}	0.1 ^{aB}	0.53 ^{abA}	0.53 ^{abA}	0.13 ^{aB}	0.54 ^{abA}	0.25 ^{bB}	0.48 ^{aA}	0.54 ^{aA}	0.17 ^{aB}	0.26 ^{aB}
<i>S. Montevideo</i> 24	0.6 ^{aA}	0.13 ^{aB}	0.43 ^{aAC}	0.51 ^{aAC}	0.17 ^{aB}	0.52 ^{bAC}	0.26 ^{bBC}	0.42 ^{aCD}	0.52 ^{aAD}	0.27 ^{aBC}	0.45 ^{bAC}
<i>S. Montevideo</i> 27	0.62 ^{aA}	0.11 ^{aB}	0.59 ^{abA}	0.64 ^{aA}	0.10 ^{aB}	0.53 ^{abA}	0.28 ^{bB}	0.57 ^{aA}	0.63 ^{aA}	0.1 ^{aB}	0.1 ^{aB}
<i>S. Montevideo</i> 34	0.74 ^{aA}	0.11 ^{aB}	0.63 ^{ba}	0.67 ^{aA}	0.14 ^{aB}	0.61 ^{abA}	0.3 ^{bB}	0.58 ^{aA}	0.61 ^{aA}	0.12 ^{aB}	0.12 ^{aB}

As letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística entre as cepas no mesmo tratamento ao nível de 5 % ($p \geq 0,05$) e as letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os tratamentos para a mesma cepa ao nível de 5% ($p \geq 0,05$).

Tabela 8 - Efeito de concentrações sub-inibitórias e letais de agentes antimicrobianos na redução de biofilmes maduros em cepas de *Salmonella* Montevideo e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Cepas	Controle	Orégano				Carvacrol				Tomilho			
		0.1%	0.05%	0.025%	0.012%	0.1%	0.05%	0.025%	0.012%	0.1%	0.05%	0.025%	0.012%
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	0.75 ^{aA}	0.41 ^{aB}	0.75 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.71 ^{aA}	0.75 ^{acA}	0.75 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.55 ^{aB}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}
<i>S. Montevideo</i> 21	0.76 ^{aA}	0.59 ^{bB}	0.77 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.76 ^{abA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.77 ^{aA}	0.54 ^{aB}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.72 ^{aA}
<i>S. Montevideo</i> 24	0.74 ^{abA}	0.55 ^{bB}	0.77 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.74 ^{cA}	0.75 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.53 ^{aB}	0.76 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.71 ^{aA}
<i>S. Montevideo</i> 27	0.76 ^{aA}	0.51 ^{cdB}	0.77 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{cA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.54 ^{aB}	0.77 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}
<i>S. Montevideo</i> 34	0.76 ^{acA}	0.61 ^{beB}	0.77 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{cA}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.51 ^{aB}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}

Continua.....

Continuação...

Cepas	Controle	Timol					Ác. acético					Ác. láctico				
		0.1%	0.05%	0.025%	0.012%	2.5%	2.0%	1.5%	1.0%	0.5%	2.5%	2.0%	1.5%	1.0%	0.5%	
<i>S. Typhimurium</i>																
ATCC 14028	0.75 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.72 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.72 ^{aA}	0.71 ^{bA}	0.72 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.72 ^{bA}	
<i>S. Montevideo</i> 21	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.72 ^{bA}	0.72 ^{bA}	0.73 ^{bA}	0.72 ^{bA}	0.72 ^{bA}	
<i>S. Montevideo</i> 24	0.74 ^{abA}	0.73 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.71 ^{acA}	0.71 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.72 ^{aA}	0.71 ^{aA}	
<i>S. Montevideo</i> 27	0.76 ^{aA}	0.77 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.72 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.73 ^{aA}	0.73 ^{aA}	
<i>S. Montevideo</i> 34	0.76 ^{acA}	0.76 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.76 ^{aA}	0.75 ^{aA}	0.77 ^{aA}	0.74 ^{aA}	0.72 ^{bA}	0.73 ^{bA}	0.72 ^{bA}	0.72 ^{bA}	0.71 ^{bA}	

As letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística entre as cepas no mesmo tratamento ao nível de 5 % ($p \geq 0,05$) e as letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os tratamentos para a mesma cepa ao nível de 5% ($p \geq 0,05$).

No ensaio de redução de biofilme maduro em cupons de flandres a quantidade de células de biofilme de *Salmonella* recuperadas foi de ~ 6 log UFC por cupom de flandres (1cm x 1cm) nos controles positivos de cada cepa. Os óleos essenciais (orégano e tomilho) e compostos majoritários (carvacrol e timol) em concentrações de 0,1 %, bem como os ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) em concentrações de 2,5 %, foram capazes de reduzir a contagem de células do biofilme em até 3 log UFC/cupom em biofilmes maduros de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Tabela 9). Em *Salmonella* Montevideo SM34, o óleo essencial de orégano foi capaz de reduzir a contagem de células do biofilme em 3 log UFC/cupom, enquanto que para os biofilmes tratados com carvacrol 0,1 % e ácido láctico 2,5 % a redução foi de 1 log UFC/cupom. O tratamento de biofilmes com tomilho 0,1 %, timol 0,1% e ácido acético 2,5 % a redução observada foi de 2 log UFC/cupom.

Tabela 9 - Efeito antibiofilme de óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos na redução de biofilme maduro formados em cupons de flandres por *Salmonella* Montevideo SM34 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Agentes	População de <i>Salmonella</i> (log UFC/cupom de flandres)	
	S. Montevideo SM34	S. Typhimurium ATCC 14028
Orégano 0,1%	6,63 x 10 ³	8,23 x 10 ³
Tomilho 0,1%	4,65 x 10 ⁴	1,33 x 10 ³
Carvacrol 0,1%	1,07 x 10 ⁵	6,35 x 10 ³
Timol 0,1%	6,78 x 10 ⁴	6,31 x 10 ³
Ác. acético 2,5%	2,12 x 10 ⁴	1,18 x 10 ³
Ác. láctico 2,5%	1,21 x 10 ⁵	3,43 x 10 ³
Controle positivo*	3,75 x 10 ⁶	1,51x 10 ⁶
Inóculo inicial*	~ 1,5 x 10 ⁸	~ 1,5 x 10 ⁸

* Controle positivo: contagem de UFC/cupom da cepa de *Salmonella* que não teve contato com os agentes antimicrobianos; Inóculo inicial: quantidade de UFC/cepa que foi utilizada para formar os biofilmes nos cupons de flandres.

Os efeitos antibiofilme dos óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos na redução de biofilme maduro em *Salmonella* Montevideo SM34 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 também foram observados sob microscopia confocal, uma vez que esta permite uma visualização em tempo real do aspecto do biofilme formado e distinção entre células vivas e mortas.

Através das imagens de microscopia confocal do biofilme não tratado de *Salmonella* Montevideo SM34 pode-se observar que este formou uma camada desuniforme, apresentando principalmente células vivas, enquanto que os biofilmes

tratados com os diferentes agentes antimicrobianos resultaram em diferentes distúrbios na estrutura do biofilme (Figura 7 e Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros avaliados nas imagens de microscopia confocal de biofilmes formados em cupons de flandres por *Salmonella* Montevideo SM34 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 após tratamento com diferentes agentes antimicrobianos.

	S. Montevideo 34			S. Typhimurium ATCC 14028		
	Cél. vivas	Cél. Mortas	Altura	Cél. vivas	Cél. Mortas	Altura
Controle positivo*	425.329	62.390	6750nm	112.229	20.266	20250nm
Orégano 0,1 %	45.022	4.615	6580nm	40.746	1.566	9450nm
Tomilho 0,1 %	163.526	17.458	6110nm	57.269	943	6300nm
Carvacrol 0,1 %	140.378	17.513	4238nm	53.703	544	24750nm
Timol 0,1 %	73.451	31.202	11180nm	58.691	47.960	12090nm
Ác. Acético 2,5%	1.787	8.829	6510nm	242.981	395.462	19530nm
Ác. Lático 2,5 %	342.374	322.790	8300nm	78.586	126.906	9300nm

***Controle positivo:** Biofilme não tratado;

Nas imagens de biofilmes maduros de *Salmonella* Montevideo SM34 tratados com óleos essenciais de orégano e tomilho a uma concentração de 0,1 % (v/v), observou-se uma redução de 89,4 % e 61,55 % no número de células viáveis e uma redução de 170 nm e 640 nm na altura do biofilme em relação ao biofilme não tratado (Figura 7 e tabela 10). Além disso, os óleos essenciais parecem serem capazes de separar as células bacterianas, uma vez que a redução da espessura e uniformidade do biofilme foi observado sem presença significativa de células mortas.

Os compostos majoritários carvacrol e timol a uma concentração de 0,1 % foram capazes de reduzir o número de células vivas do biofilme de *Salmonella* Montevideo SM34 em 67 % e 82,73 %, respectivamente. Entretanto, o biofilme tratado com timol mostrou-se mais espesso em relação ao biofilme não tratado, enquanto que o carvacrol foi capaz de reduzir a altura do biofilme em 4.430 nm. No biofilme tratado com carvacrol observou-se uma densa camada de células vivas que se concentram em uma região central do cupom e as áreas mais periféricas com uma camada menos proeminente. Contudo, nas imagens do biofilme tratado com timol pode-se observar uma camada celular densa que se distribui uniformemente sobre a superfície do cupom e alguns aglomerados de células mortas.

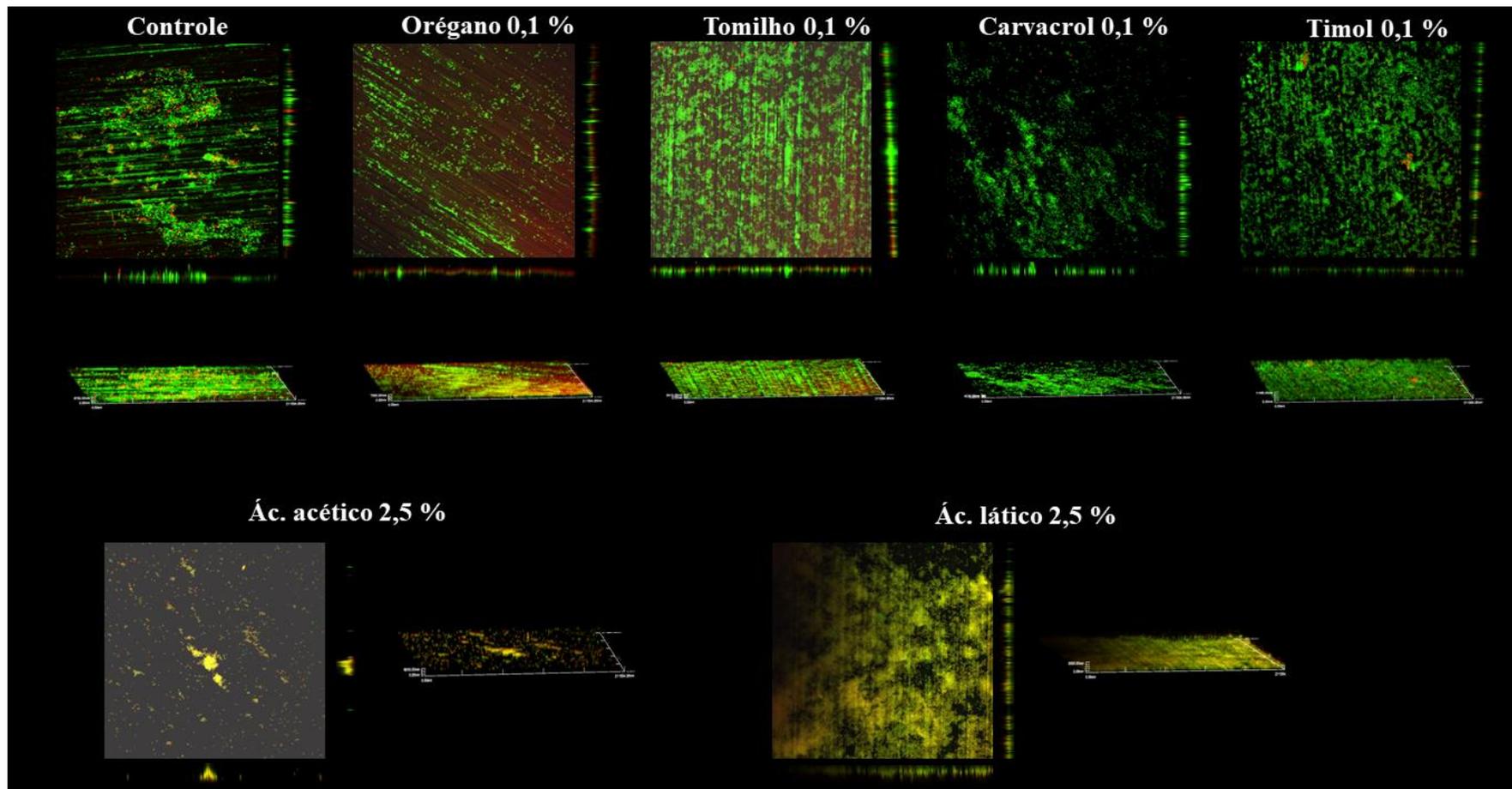


Figura 7-Imagens compostas e ortogonais de microscopia de escaneamento confocal a laser de biofilmes maduros de *Salmonella* Montevideo SM34 após tratamento diferentes agentes antimicrobianos usando coloração fluorescente (BacLight).

O ácido acético foi o que demonstrou possuir o maior efeito antibiofilme observado, sendo capaz de reduzir o número de células vivas em 99,58 % em relação ao controle. Diferentemente, do tratamento de biofilme com ácido lático onde pode-se observar a menor redução de células vivas e um aumento proeminente de células mortas. Nas imagens de microscopia confocal o biofilme tratado com ácido acético possui uma camada celular fina e bem dispersa, sendo composta principalmente de células mortas, enquanto que no biofilme tratado com ácido lático a camada celular é densa e uniformemente distribuída sobre a superfície do cupom e formada por proporções parecidas de células vivas e mortas.

Todos os agentes antimicrobianos demonstraram possuir efeito antibiofilme reduzindo o número de células viáveis em biofilmes formados por *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, exceto o ácido acético (Figura 8 e Tabela 10). O biofilme controle de *Salmonella* Typhimurium apresentou uma camada celular desuniforme, formada, principalmente, por células vivas e distribuída sob a superfície do cupom. Nos biofilmes tratados com óleos essenciais de orégano, tomilho e carvacrol observou-se uma redução de 63,7 %, 49 % e 52,15 % no número de células vivas nos biofilmes em relação ao controle. Entretanto, o biofilme tratado com carvacrol mostrou-se mais espesso, com um aumento de 4.500 nm de altura em relação ao controle.

Timol e ácido lático demonstraram possuir efeito antibiofilme, reduzindo o número de células vivas em 52 % e 35,7 %, bem como a espessura do biofilme em 8.160 nm e 10.950 nm em relação ao controle. Nas imagens de microscopia confocal do biofilme tratado com timol pode-se observar uma fina camada celular distribuída de forma uniforme e a presença de algumas células mortas, enquanto que no biofilme tratado com ácido lático a camada celular é formada principalmente por células mortas e distribuída de forma desuniforme sob a superfície do cupom.

No biofilme tratado com ácido acético observou-se um aumento na densidade celular em relação ao biofilme controle. A densa camada celular do biofilme tratado com ácido acético é formada principalmente por células mortas e vivas que estão distribuídas de maneira uniforme e superam em número as células no biofilme controle, embora sua espessura seja menor.

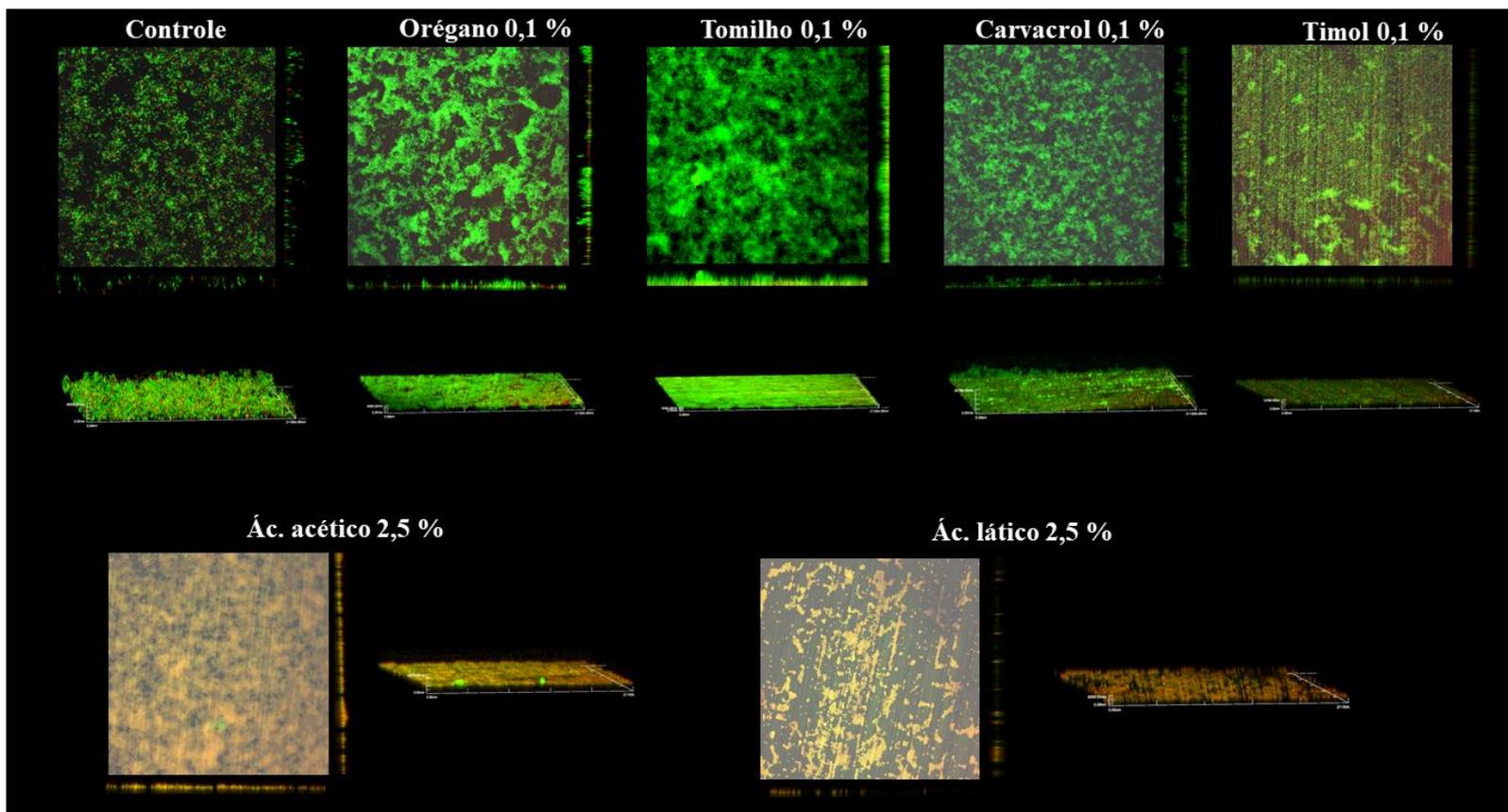


Figura 8-Imagens compostas e ortogonais de microscopia de escaneamento confocal a laser de biofilmes maduros de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 após tratamento com óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos usando coloração fluorescente (BacLight).

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sugerido que a persistência de *Salmonella* em ambientes de fábrica de ração se dá pela capacidade deste microrganismo de formar biofilme (VESTBY et al., 2009a; STEENACKERS et al., 2012). A formação de biofilme tem sido avaliada *in vitro*, principalmente por métodos fenotípicos, como a morfologia da colônia, formação de película na interface ar-líquido e adesão em superfícies abióticas (STEPANOVIC et al., 2000; RÖMLING et al., 2003).

A persistência de *Salmonella* no ambiente só é possível pela ativação de um mecanismo que permite que este microrganismo sobreviva fora do hospedeiro, o qual é dependente de um padrão de comportamento multicelular que resulta da expressão de genes específicos e a síntese de produtos codificados por estes genes. Isolados de *Salmonella* produtores de fimbria *curl*i e celulose caracterizam o comportamento multicelular *rdar*, o qual é um sinônimo para comunidades bacterianas que são capazes de formar um extensivo biofilme em superfícies abióticas e são considerados capazes de sobreviver no meio ambiente por longos períodos de tempo (RÖMLING et al., 2005; JONAS et al., 2007).

A fimbria *curl*i é considerada como sendo expressa em resposta a limitação de nutriente, sob condições de baixa osmolaridade e baixas temperaturas de crescimento. Enquanto que, a celulose é um componente extracelular produzido para proteção química e mecânica das células bacterianas, sendo também importante na fase de adesão inicial e/ou formação de micro-colônias (JAIN & CHEN, 2007; SIMM et al., 2014) e é responsável pelas interações célula-célula, aderência celular, e formação de biofilme em superfícies abióticas e bióticas (RÖMLING et al., 2015). Ambos componentes são importantes para a sobrevivência em condições desafiadoras, as quais podem ser encontradas pelas bactérias no meio ambiente.

É sugerido que o morfotipo *rdar* é uma adaptação para sobreviver fora do hospedeiro (CHIA et al., 2011) e, geralmente, só é expresso em condições de baixas temperaturas (abaixo de 30°C), podendo persistir por longos períodos no meio ambiente por fornecer uma maior resistência à dissecação e à desinfecção (SEIXAS et al., 2014). Além disso, células que expressam o morfotipo *rdar* são, também, frequentemente caracterizadas por aglutinação celular em meio líquido, formação de uma película na interface ar-líquido e formação de biofilme em superfícies abióticas (STEENACKERS et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que isolados de *Salmonella* dos sorovares Agona, Tennessee, Infantis, Senftenberg e Montevideo provenientes de fábrica de ração possuem morfotipo *rdar* e são capazes e persistir no ambiente por serem mais tolerantes a dessecação e depleção de nutrientes ao longo do tempo (VESTBY et al., 2009b; PRUNIĆ et al., 2016). O que corrobora com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que todas as cepas expressaram morfotipo *rdar* e a maioria (81,48 %) foi capaz de formar biofilme em microplacas de poliestireno a 28°C. Além disso, estas mesmas cepas expressaram morfotipo *saw* e não foram capazes de formar biofilme a 37°C.

O morfotipo *saw* foi observado em cepas invasivas de *Salmonella* Typhi (adaptada a humanos) e *Salmonella* Choleraesuis (adaptada a suínos) que causam doença sistêmica em seus hospedeiros (STEENAKERS et al., 2012). Este morfotipo não expressa fimbria *curli* e celulose, o que poderia melhorar a capacidade destas bactérias para evadir as defesas do hospedeiro e causar infecções sistêmicas. A expressão deste morfotipo foi observada tanto a 28°C como a 37°C em todas as cepas de *Salmonella* Typhi e Choleraesuis estudadas (RÖMLING et al., 2003) e, geralmente, as cepas que apresentam este morfotipo não demonstram habilidade de formar biofilme (BOKRANZ et al., 2005).

As cepas pertencentes aos perfis 1 (23/54), 2 (2/54), 4 (7/54), 5 (3/54), 6 (1/54) e 8 (2/54), que possuem o morfotipo *rdar*, produziram películas rígidas (perfis 1, 2 e 5) ou frágeis (perfis 4, 6 e 8) na interface ar-líquido. A habilidade de produzir uma película em condições de cultura estática é um fenótipo comum em *Salmonella* e já foi descrita em isolados de *Salmonella* Enteritidis de diferentes origens (ambiente, animais, alimento e isolados clínicos), das quais 71% produziram película na interface ar-líquido em caldo Lúria-Bertani (SOLANO et al., 2002). A colonização na interface ar-líquido é em grande parte devido a superprodução de um polímero celulósico (ZOGAJ et al., 2001), o qual mantém as células unidas, e resulta em uma estrutura muito mais aderente. Além disso, a formação de película na interface ar-líquido é vantajosa para bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, pois a interface ar-líquido fornece ao microrganismo acesso a ambas fases, gasosa (oxigênio) e líquida (água e nutrientes) (SPIERS et al., 2003). Römling e Rohde (1998) observaram que cepas de *Salmonella* Typhimurium que possuem o morfotipo *rdar* são capazes de formar películas como uma rede bacteriana justa na interface ar-líquido quando incubadas em meio de cultura rico, em condições estáticas e em temperatura ambiente. Além disso, observou-se que com o bloqueio do gene *csgD* (gene responsável pela expressão de fimbria *curli*) as cepas que antes apresentavam morfotipo *rdar* e formavam película, passaram a apresentar morfotipo *pdar*

(não expressa fimbria *curli*, mas expressa celulose) e não formavam mais película na interface ar-líquido.

Embora seja descrito na literatura que as cepas que possuem o morfotipo *rdar* sejam capazes de produzir película na interface ar-líquido (SOLANO et al., 2002; RÖMLING et al., 2003), os resultados obtidos neste estudo mostraram-se inconsistentes. Todas as 54 cepas apresentaram morfotipo *rdar* e somente 35 delas foram capazes de produzir uma película rígida (perfis 1, 2, 5) ou frágil (perfis 4, 6 e 8), sendo que esta inconsistência também foi observada entre os sorovares. Esta inconsistência entre o morfotipo *rdar* e formação de película já foi previamente reportada em outros estudos (RÖMLING et al., 2003; VESTBY et al., 2009b) e ocorre devido a um fenômeno onde as células de uma mesma cepa desempenham diferentes morfotipos, as quais são chamadas de hfs (alta frequência de alternância, do inglês *high frequency switch*) e lfs (baixa frequência de alternância, do inglês *low frequency switch*). Este fenômeno foi observado quando nove cepas de *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis foram incubadas a 28°C em ágar Lúria-Bertani suplementado com Vermelho Congo, onde pode-se observar que estas cepas além de possuírem morfotipo *rdar* apresentaram uma única colônia *saw* (RÖMLING et al., 2003).

A alta prevalência de isolamento de *Salmonella* Montevideo, Tennessee, Agona, Senftenberg e Infantis em ambientes de fábrica de ração, bem como sua capacidade de persistir nestes ambientes, tem sido associada com sua habilidade para formar biofilme. Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas moleculares, como PFGE e tipificação de perfil de plasmídeos, oferecem evidências que clones de diversos sorovares de *Salmonella* podem persistir em ambientes de fábrica de ração por meses e até anos (VESTBY et al., 2009b; PRUNIĆ et al., 2016). Neste estudo, as cepas de *Salmonella* Montevideo (n = 15), Senftenberg (n = 3), Agona (n = 5), Tennessee (n = 3) e Infantis (n = 2) demonstraram possuir fenótipo de formação de biofilme *in vitro* (Tabelas 4 e 5). Contudo, pode-se observar que para a maioria das cepas o perfil fenotípico para formação de biofilme não teve relação com o perfil de macro restrição à que estas cepas pertencem. A única relação entre o perfil fenotípico para formação de biofilme e perfil de macro restrição foi observada nos sorovares Agona e Montevideo. As cepas pertencentes ao sorovar Agona que apresentaram perfil fenotípico 4 (Tabela 5) para formação de biofilme possuíam o mesmo perfil de macro restrição (Ag3), enquanto que as cepas pertencentes ao sorovar Montevideo, que apresentaram perfil fenotípicos 1, pertenciam ao perfil de macro restrição Mt8. Os resultados indicam que os isolados de *Salmonella* capazes de

produzir biofilme podem ser introduzidos em fábricas de ração através de ingredientes contaminados e devido a sua habilidade de formar biofilme, estes isolados podem persistir por longos períodos de tempo no ambiente e servir como de fonte de contaminação cruzada para novos ingredientes e rações.

A formação de biofilme, por sua vez, é influenciada por vários fatores ambientais (temperatura, superfície, nutrientes e pH), que regulam a expressão de genes responsáveis pela formação de biofilme (LINO & KOUTSOUMANIS, 2012; NGUYEN et al., 2014). No presente estudo, todas cepas apresentaram os genes *csgD*, *adrA*, *fimA* e *bapA*, os quais estão envolvidos na regulação da formação de biofilme. O gene *csgD* é um gene chave para a formação de biofilme e é o principal contribuinte para o desenvolvimento do morfotipo *rdar*, enquanto que os demais genes são importantes para a expressão de celulose (*adrA*), adesão inicial a superfície (*fimA*) e agregação bacteriana (*bapA*). Neste sentido, as condições ambientais encontradas no interior de fábricas de ração, tais como alta umidade e temperatura, podem influenciar a formação de biofilme por certos isolados de *Salmonella*, permitindo sua colonização residual de superfícies. Além disso, a dificuldade de limpeza e sanitização destes ambientes contribui para a persistência destes isolados nestes ambientes.

Nas fábricas de ração, o controle de *Salmonella* é realizado principalmente pela prevenção da entrada de *Salmonella* na fábrica, redução da multiplicação microbiana no ambiente de processamento e processos para eliminação do patógeno. Atualmente, os principais agentes químicos utilizados para controle de *Salmonella* na ração são os ácidos orgânicos, formaldeído e óleos essenciais (WALES et al., 2010).

Há mais de 10 anos, o potencial dos óleos essenciais e seus compostos majoritários como agentes antimicrobianos tem sido estudado frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BURT, 2004). Embora não tenha sido desenvolvido um método específico para avaliar a atividade antibacteriana, muitos autores têm adaptado a metodologia empregada pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), para testes de susceptibilidade antibacteriana, para testar os efeitos dos óleos essenciais e seus compostos em diferentes microrganismos. Os resultados destes testes, no entanto, podem ser afetados por diversos fatores como o método de extração do óleo essencial, volume do inóculo, fase de crescimento, meio de cultura utilizado, pH do meio, tempo e temperatura de incubação (RIOS et al., 1988; BURT, 2004; DE BONA et al., 2014).

A concentração inibitória mínima (CIM) tem sido citada pela maioria dos pesquisadores como medida do desempenho dos óleos essenciais. Entretanto, a definição

de CIM difere entre as publicações e dificulta as comparações entre os estudos. A definição mais utilizada de CIM é a menor concentração que inibe o crescimento visível do microrganismo teste e tem sido relatada nas unidades de ppm (parte por milhão), % (v/v), $\mu\text{l/l}^{-1}$ e em $\mu\text{g/ml}^{-1}$ (BURT, 2004).

No presente estudo os óleos essenciais de orégano, tomilho e os compostos majoritários carvacrol e timol foram capazes de inibir o crescimento das células planctônicas (concentrações de 0,05 % e 0,025 %) e reduziram a formação de biofilme em todas as cepas testadas (concentrações e 0,025 % e 0,012 %). Além disso, outros estudos têm demonstrado o efeito dos óleos essenciais de orégano e tomilho e seus compostos majoritários carvacrol e timol, frente a células planctônicas de *Salmonella* Typhimurium. O óleo essencial de orégano mostrou possuir atividade antibacteriana em células planctônicas com CIMs entre $1,2 - 0,56 \mu\text{L/ml}^{-1}$, enquanto que o óleo essencial de tomilho e os compostos majoritários carvacrol e timol apresentaram atividade antibacteriana com CIMs entre $0,450 - > 20 \mu\text{L/ml}^{-1}$, $0,225 - 0,25 \mu\text{L/ml}^{-1}$ e $0,056 \mu\text{L/ml}^{-1}$, respectivamente (BURT, 2004; SEMENIUC et al., 2017).

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a uma série de efeitos deletérios nas células, como por exemplo, a despolarização da membrana plasmática, permeabilização da membrana celular, dano ao polimorfismo lipídico, interação com proteínas da membrana de bactérias Gram-negativas, alterações nos processos respiratórios, coagulação do material citoplasmático, depleção intracelular de ATP e supressão de produção de toxinas microbianas (SAVIUC et al., 2015).

Nos últimos anos, vários artigos têm descrito a ação antibiofilme de óleos essenciais e seus compostos majoritários contra biofilmes bacterianos (KARAMPOULA et al., 2016; KEELARA et al., 2016; MILADI et al., 2017; OH et al., 2017). Soni e colaboradores (2013) demonstraram que em concentrações sub-inibitórias (0,006 e 0,012 %) os óleos essenciais de orégano, tomilho e o composto fenólico carvacrol foram capazes de reduzir a formação de biofilme em *Salmonella* spp. em até 2 a 4 vezes, mas não foram capazes de eliminar completamente a formação de biofilme. Além disso, Burt e colaboradores (2014) demonstraram que carvacrol em concentrações sub-inibitórias de 0,75-1,25 mM (aproximadamente 0,012 %) foi capaz de reduzir a formação de biofilme em *Salmonella* Typhimurium.

Tem sido sugerido que concentrações sub-inibitórias de óleos essenciais e seus compostos majoritários não interferem no crescimento de células planctônicas, mas possuem efeito redutor na formação de biofilme. Este efeito redutor tem sido atribuído a dois mecanismos: (i) interrupção da formação normal de biofilme pela retenção da massa celular no estágio de micro-colônia ou (ii) que estes agentes em concentrações sub-inibitórias interagem com as proteínas da superfície bacteriana reduzindo a adesão destas células nas superfícies alvo (NOSTRO et al., 2009; SONI et al., 2013). Outra hipótese é que o carvacrol pode reduzir a motilidade e produção de flagelo, o que foi observado em cepas de *Escherichia coli* O157:H7 tratadas com carvacrol (BURT et al., 2007).

Além de interferir com a formação de biofilme, os óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos possuem efeito na remoção de biofilmes maduros. Em concentrações letais os óleos essenciais interagem com a camada de lipídeos da membrana citoplasmática, o que resulta em dano e perda da integridade da membrana celular, com uma subsequente perda de material celular do interior da célula (ULTEE et al., 1999; BURT, 2004). Além disso, os compostos majoritários carvacrol e timol podem penetrar a membrana de polissacarídeos da matriz do biofilme devido as suas propriedades hidrofílicas e forte atividade antimicrobiana, e essa difusão provoca o desprendimento da massa celular do biofilme da superfície (NOSTRO et al., 2007).

O tratamento de biofilmes de *Salmonella* de um dia de idade com óleo essencial de tomilho, óleo essencial de orégano e carvacrol em concentrações de 0,05 % e 0,1 % resultou em uma redução de 7 a 8 log UFC/cupom de aço inox (SONI et al., 2013). Enquanto que, em biofilmes de *Listeria monocytogenes* os óleos essenciais de tomilho e orégano em concentrações de 0,05 % foram capazes de reduzir a contagem de células em biofilme em 4.8 log UFC/poço e 3.9 log UFC/ poço, respectivamente. Contudo, estes compostos não foram capazes de inativar completamente as células do biofilme, isto porque, quando as células estão aderidas as bactérias tornam-se 10-1000 vezes menos susceptíveis a vários agentes antimicrobianos do que suas células planctônicas, exigindo maiores concentrações para a sua completa eliminação (DAVIES, 2003; DESAI et al., 2012). Além disso, a ação dos óleos essenciais depende de sua composição, a qual é bastante variável e depende de uma série de fatores, como por exemplo, a parte da planta em que foi extraído o óleo essencial, época de colheita, estação do ano e o método de cultivo (PEÑALVER et al., 2005).

Por outro lado, a ação antibiofilme de ácidos orgânicos pode ser devido à degradação dos componentes do interior da matriz do biofilme, resultando no rompimento

da estrutura do biofilme ou os ácidos orgânicos em sua forma não dissociada interrompem as funções das proteínas ligadas a membrana penetrando a bicamada lipídica da membrana, tornando o citoplasma celular mais ácido e, conseqüentemente, reduzindo o pH celular interno (NOSTRO et al., 2013).

Em biofilmes de *Escherichia coli*, o ácido acético e ácido láctico em concentrações de 2 % foram capazes de reduzir a quantidade de biofilme formado, sendo que não houve diferença significativa de redução entre os tratamentos. Embora tenha sido observada redução na quantidade de biofilme formado, estes ácidos orgânicos não foram capazes de remover completamente o biofilme (PARK & CHEN, 2015). Esta falta de efeito pode ser devido ao insuficiente tempo de contato entre o agente e o biofilme ou pela cobertura inadequada da área do biofilme pelos agentes desinfetantes (FRANK et al., 2003). Além disso, as estruturas extracelulares produzidas pelas células bacterianas nos biofilmes podem ser importantes fatores que limitam a eficácia destes agentes, pois estas estruturas dificultam que estes sanificantes acessem as principais áreas alvo e também podem neutralizar agentes instáveis como o cloro, reduzindo seu efeito (DE BEER et al., 1994).

Amrutha e colaboradores (2017) observaram que os ácidos acético e láctico em concentrações de 2 % foram capazes de reduzir a formação de biofilme, a produção de EPS e a motilidade em *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

No presente estudo, apenas os óleos essenciais de orégano e tomilho a uma concentração de 0,1 % foram capazes de reduzir a biomassa de biofilme maduro de ambas cepas de *Salmonella* nos ensaios em microplacas de poliestireno. Já nos ensaios de contagem de UFC em cupom de flandres e em microscopia confocal os óleos essenciais, compostos majoritários e ácidos orgânicos demonstraram possuir similar efeito redutor nas células do biofilme. A diferença observada entre os métodos pode ser explicada pelo fato de que nos ensaios em microplacas de poliestireno seguido de coloração com cristal violeta se avalia a biomassa do biofilme, tendo como alvos as células do biofilme e os compostos da matriz extracelular. As células sem atividade metabólica podem ainda contribuir para a quantidade total de biomassa e estas células estão firmemente aderidas às paredes dos poços e não são removidas nas etapas de lavagem. Além disso, o tratamento de biofilme com altas concentrações de agentes sanificantes pode causar fixação de matéria orgânica à superfície dos poços resultando em maior quantidade de cristal violeta incorporado no biofilme remanescente (ROMANOVA et al., 2007).

As imagens de microscopia confocal mostraram que os biofilmes tratados com ácidos orgânicos apresentaram uma densidade celular (células vivas e mortas) bem acima do controle positivo em ambas cepas testadas. Estes biofilmes foram tratados com soluções ácidas com pH próximo a 3.0, o que provavelmente fez com que estas cepas ativassem mecanismos de resposta à tolerância ácida. A resposta à tolerância ácida é um complexo sistema de resposta ao estresse que foi descrito primeiramente em *Salmonella* Typhimurium e permite que a bactéria sobreviva em ambientes extremamente ácidos (pH 3.0) (SANTIN et al., 2017). Existem sistemas distintos de resposta à tolerância ácida induzidos em células de fase exponencial e em fase estacionária. O sistema em células de fase exponencial envolve a indução de pelo menos 50 proteínas, as quais são denominadas de proteínas de choque ácido. A síntese de oito destas proteínas requer um fator sigma alternativo chamado σ^S . A proteína σ^S , codificada pelo gene *rpoS*, é importante como um regulador da fase estacionária fisiológica e durante o choque osmótico. Estas 8 dependentes proteínas são necessárias para a indução sustentada da tolerância ácida e sem estas proteínas a tolerância é induzida de forma transitória via choque ácido por cerca de 20 minutos. As células de fase estacionária possuem, além de uma resistência ao estresse geral induzida pela própria fase estacionária, um sistema induzido pelo pH ácido de tolerância ácida que é independente de σ^S (BAIK et al., 1996). Além disso, o fator sigma RpoS (σ^S) regula a expressão de *csgD*, que é o gene responsável pela regulação da formação de biofilme e expressão do morfotipo *rdar* em *Salmonella*. Logo, este microrganismo poderia utilizar dois mecanismos para sobreviver em ambientes extremamente ácidos (MONTEIRO et al., 2012).

Entretanto, outra hipótese que poderia explicar a alta densidade celular dos biofilmes tratados com os ácidos orgânicos seria que as células adaptadas ao ácido poderiam ainda ser vulneráveis aos seus efeitos tóxicos. Estes efeitos tóxicos foram observados em rações tratadas com altas concentrações de ácidos orgânicos (geralmente em concentrações $\geq 2\%$) e estão relacionados a problemas de palatabilidade e corrosão (WALES et al., 2010). Além disso, o efeito corrosivo dos ácidos orgânicos poderiam mascarar seu real efeito sobre as células bacterianas.

Atualmente os agentes químicos utilizados no controle de *Salmonella* em rações são formulações a base de ácidos orgânicos (ácido láctico, acético, cítrico, fórmico, propiônico e sorbico), seus sais (sulfato de cobre, acetato de zinco, acetato cúprico e formato de amônio), formaldeído, desreguladores da parede bacteriana (terpenos), surfactantes e óleos essenciais, sendo que estas formulações podem ser líquidas ou em

pós e geralmente são misturas de agentes de um mesmo ou diferente grupo químico visando alcançar efeitos sinérgicos ou combinatórios.

As misturas comerciais de ácidos orgânicos e formaldeído possuem um alto nível de atividade desinfetante contra a maioria das bactérias e é menos provável que sejam inativadas por matéria-orgânica que a maioria das classes de desinfetantes (WALES et al., 2010). Estas misturas possuem a capacidade de reduzir a contaminação de *Salmonella* em rações em até 3 unidades logarítmicas quando são incluídas em ingredientes ou rações em concentrações de 0,2 % a 2 % e necessitam de um longo tempo de contato. Entretanto, a sua eficácia é influenciada pelo nível de contaminação, tipo de ácido empregado, mistura de ácidos, forma física, taxa de inclusão, composição da dieta, umidade do alimento e forma química do produto (ácido livre ou sal de ácido). Contudo, seu efeito redutor geralmente está relacionado na ação que estes compostos possuem em células planctônicas e muito pouco se sabe sobre o efeito que estes produtos possuem em células em biofilme ou seu efeito na formação de biofilmes.

Embora as misturas a base de ácidos orgânicos e formaldeído sejam amplamente empregadas nas indústrias produtoras de dieta animal, tanto para aves como para suínos, a inclusão destes produtos em concentrações acima de 2 % pode causar problemas de palatabilidade, aumento do potencial corrosivo e elevação dos custos de produção. Além disso, existem estudos demonstrando que os ácidos orgânicos são capazes de promover aumento na virulência de *Salmonella* em baixas concentrações (WALES et al., 2013).

Por outro lado, nos produtos comerciais a base de óleos essenciais existe menor chance de resistência adaptativa, uma vez que os óleos essenciais são constituídos por vários compostos e isto pode ser um obstáculo para a adaptação de células bacterianas (SONI et al., 2013). Os dados disponíveis até o momento, demonstram que os óleos essenciais possuem efeito antibacteriano e que são capazes de inibir a formação de biofilme ou reduzir as células de biofilme maduros em várias superfícies (vidro, aço inoxidável, poliestireno e polipropileno). Todavia, os estudos disponíveis sobre óleos essenciais e sua ação sobre *Salmonella* são em indústrias de processamento de alimentos destinados ao consumo humano ou como aditivo alimentar visando a melhora na performance zootécnica de animais de produção.

Entretanto, o presente estudo demonstrou que os óleos essenciais possuem efeitos antibacterianos e antibiofilme em cepas de *Salmonella* oriundas de fábrica de ração e que estes poderiam ser utilizados como coadjuvantes para o controle deste microrganismo, tanto em ingredientes como no ambiente de processamento.

7. CONCLUSÕES

- As cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes de fábrica de ração suína possuem perfil fenotípico e genotípico para formação de biofilme *in vitro*.
- O perfil fenotípico para formação de biofilme mais frequente foi o perfil 1, o qual representou 42,6 % das cepas (23/54), seguido dos perfis 3 e 4 que juntos representaram 38,88 % das cepas (21/54).
- Não houve relação entre os perfis fenotípico para formação de biofilme encontrados e os sorovares. Além disso, para a maioria das cepas não houve relação entre o perfil fenotípico de formação de biofilme e o perfil de macro restrição de DNA total (PFGE) a que estas cepas pertencem.
- Os genes envolvidos na formação de biofilme (*csgD*, *adrA*, *fimA* e *bapA*) foram detectados em todas as cepas.
- Os óleos essenciais de orégano (*Oreganum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), bem como seus compostos majoritários carvacrol e timol são capazes de suprimir a formação de biofilme em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* em 2 a 8 vezes, mas não eliminam completamente a sua formação.
- Os óleos essenciais de orégano (*Oreganum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), seus compostos majoritários carvacrol e timol e os ácidos orgânicos (acético e láctico) possuem efeito antibiofilme reduzindo as células de biofilme maduro de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, contudo não erradicam completamente biofilmes maduros.
- Os óleos essenciais e compostos majoritários podem ser alternativas úteis como coadjuvantes nos programas de controle de *Salmonella* em ambientes de fábrica de ração para suínos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAN, S.; JAKOBSEN, M.; JESPERSEN, L. Attachment behavior of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella* Typhimurium P6 on food contact surfaces for food transportation. **Food Microbiology**, v. 31, p. 139-147, 2012.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. Bacterial Agents of Foodborne illness. In: **Food Microbiology**. 3ª edição. University of Surrey Guilford, UK. RSC Publishing, 2008. p. 235-244.
- ADETUNJI, V. O.; ODETEKUN, I. A. Assessment of biofilm in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* strains: influence of cultural conditions. **American Journal of Food Technology**, v. 7 (nº 10), p. 582-595, 2012.
- AHMAD, I.; CIMDINS, A.; BESKE, T.; RÖMLING, U. Detailed analysis of c-di-GPM mediated regulation of *csgD* expression in *Salmonella* Typhimurium. **BMC Microbiology**, v. 17 (nº 27), p. 1-12, 2017.
- AKBAS, M. Y. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **The battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advance and Educational Programs**. Espanha: FORMATEX, 2015. p. 383-394
- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo da ocorrência de salmonelas em ingredientes, ração e suaves de pó colhidos em uma fábrica industrial de ração. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36 (nº 6), p. 324-326, 1999.
- ALMASOUD, A.; HETTIARACHCHY, N.; RAYAPROLU, S.; BAB, D.; KWON, Y. M.; MAUROMOUSTAKOS, A. Inhibitory effect of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) on *quorum sensing* of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium. **LWT- Food Science and Technology**, v. 66, p. 560-564, 2016.
- ALMASOUD, A.; HETTIARACHCHY, N.; RAYAPROLU, S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. Electrostatic spraying of organic acids on biofilms formed by *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. **Food Research International**, v. 78, p.27-33, 2015.
- ALTHOUSE, C.; PATTERSON, S.; FEDORKA-CRAY, P.; ISACSON, R. E. Type 1 fimbriae of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. **Infection and Immunity**, v. 71 (nº 11), p. 6446-6452, 2003.
- ALVAREZ, J.; PORWOLLIK, S.; LACONCHA, I.; GISAKIS, V.; VIVANCO, A. B.; GONZALEZ, I.; ECHENAGUSIA, S.; ZABALA, N.; BLACKMER, F.; MCCLELLAND, M.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Detection of *Salmonella enteric* serovar California strain spreading in Spanish feed mills and genetic

characterization with DNA microarrays. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69 (n° 12), p. 7531-7534, 2003.

AMADO, I.; VAZQUEZ, J.; FUCINOS, P.; MENDEZ, J.; PASTRANA, L. Optimization of antimicrobial combined effect of organic acids and temperature on foodborne *Salmonella* and *Escherichia coli* in cattle feed by response surface methodology. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 10, p. 1030-1036, 2013.

AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 156-162, 2017.

ANRIANY, Y. A.; WEINER, R. M.; JOHNSON, J. A.; DE REZENDE, C. E.; JOSEPH, S. W. *Salmonella* enteric serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4048-4056, 2001.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório Anual ABPA 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzi_do.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2018.

AUSMEES, N.; JONSSON, H.; HOGLUND, S.; LJUNGGREN, H.; LINDBERG, M. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Microbiology**, v. 145, p. 1253-1262, 2001.

AZEREDO, J.; AZEREDO, N. F.; ROMAIN, B.; CERCA, N.; COENYE, T.; COSTA, A. R.; DESVAUX, M.; DI BONAVENTURA, G.; HÉBRAUD, M.; JAGLIC, Z.; KAČÁNIOVÁ, M.; KNOCHÉL, S.; LOURENÇO, A.; MERGULHÃO, F.; MEYER, R. L.; NYCHAS, G.; SIMÕES, M.; TRESSE, O.; STERNBERG, C. Critical review on biofilm methods. **Critical Review in Microbiology**, v. 43 (n° 3), p. 313-351, 2017.

BACK, A. Salmonelose. In: **Manual de Doença das Aves**. 2ª edição. Cascavel: Editora Integração, 2010. p. 174-195.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMPSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infection in animal**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010, p. 231-265.

BAIK, H. S.; BEARSON, S.; DUNBART, S.; FOSTER, J. W. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium provides protection against organic acids. **Microbiology**, v. 142, p. 3195-3200, 1996.

BELOIN, C.; RENARD, S.; GHIGO, J-M.; LEBEAUX, D. Novel approaches to combat bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v.18, p. 61-68, 2014.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, v. 12 (n° 9), p. 2385-2397, 2010.

- BHATTACHARYA, M.; WOZNIAK, D. J.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L. Prevention and threatment of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13 (n°12), p. 1499-1516, 2015.
- BINTER, C.; STRAVER, J. M.; HÄGGBLUM, P.; BRUGGEMAN, G.; LINDQVIST, J. Z.; ANDERSON, M.G. Transmition and control of *Salmonella* in the pig feed chain: A conceptual model. **International Journal of food Microbiology**, v. 145, p. S7-S17, 2011.
- BISWAS, R.; AGARWAL, R. K.; BHILEGAONKA, K. N.; KUMAR, A.; NAMBIAR, P.; RAWAT, S.; SINGH, M. Cloning and sequencing of biofilm-associated protein (*bapA*) gene and its occurrence in differents serotypes of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v.52, p. 138-143, 2010.
- BLACKLEDGE, M. S.; WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 1-8, 2013.
- BOKRANZ, W.; WANG, X.; TSCHÄPE, H.; RÖMLING, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolates from gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 114-122, 2005.
- BORGES, A.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. The activity of ferulic and garlic acids in biofilm prevention and controlo f pathogenic bactéria. **Biofuling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 28 (n°7), p.755-767, 2012.
- BRASIL. Instrução Normativa n° 4, de 01 de março de 2007. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e roteiro de inspeção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 março 2007. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 02 abr. 2016.
- BURNS. A. M.; LAWLOR, P. G.; GARDINER, G. E.; MCCABE, E. M.; WALSH, D.; MOHAMMED, M.; GRANT, J.; DUFFY, G. *Salmonella* occurrence and *Enterobacteriaceae* counts in pig feed ingredients and compound feed from feed mills in Ireland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, p. 231-239, 2015.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial proprieties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BURT, S.; OJO-FAKUNLE, V. T. A.; WOERTMAN, J.; VELDHUIZEN, E. J. A. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **PLOS One**, v.9 (n° 4), p.1-6, 2014.
- BURT, S.; ZEE, R.; KOETS, A. P.; GRAAFF, A. M.; KNAPEN, F.; GAASTRA, W.; HAAGSMAN, H. P.; VELDHUIZEN, E. J. A. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Envoronmental Microbiology**, v. 73 (n° 14), p. 4484-4490, 2007.

ČABARKAPA, I.; ŠKRINJAR, M.; LEVIĆ, J.; KOKIĆ, B.; BLAGOJEV, N.; MILANOV, D.; SUVAJDŽIĆ, L. Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. **Acta Veterinary**, v. 65 (n° 3), p. 371-389, 2015.

CAPITA, R.; BUZÓN-DURÁN, L.; RIESCO-PELÁEZ, F.; ALONSO-CALLEJA, C. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.14 (n°6), p. 350-356, 2017.

CASTAÑEDA, M. R. A.; SARNACKI, S. H.; LLANA, M. N.; GUERRA, A. G. L.; GIACOMODONATO, M. N.; CERQUETTI, M. C. Dammethylation is request for eficiente biofilm production in *Salmonella enteric* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 15-22, 2015.

CHIA, T. W. R.; MCMEEKIN, T. A.; FEGAN, N.; DYKES, G. A. Significance of the rdar and bdar morphotype in the hidrophobicity and attachment to abiotic surfaces of *Salmonella* Sofia and others poultry-associated *Salmonella* serovars. **Letters Applied in Microbiology**, v. 53, p.581-584, 2011.

CHUNG, Y. P.; TOH, Y. S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Diseases**, v. 70, p. 213-239, 2014.

CIMDINS, A.; SIMM, R. Semiquantitative analysis of red, dry and rough colony morphology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* using congo red. In: SAUER, K. (Ed.). **c-di-GPM signaling: Methods and Protocols**. Berlim: Springer Science + Business Media LLC, 2017. p. 225-241

COCHRANE, R. A.; HUSS, A. R.; ALDRICH, G. C.; STARK, C. R.; JONES, C. K. Evaluating chemical mitigation of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 in animal feed ingredients. **Journal of Food Protection**, v. 79 (n° 4), p. 672-676, 2016.

COHEN, H. J.; MECHANDA, S. M.; LIN, W. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62 (n°12), p. 4303-4308, 1996.

CORADI, P. C.; LACERDA FILHO, A. F.; MELO, E. C. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) no processo de fabricação de ração. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6 (n° 5), p. 1098-1102, 2009.

D'AOUST, J. Salmonella. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. **The microbiological Safety and Quality of Foods**. Maryland: Aspen Publishes, 2000. p. 1233- 1276.

D'AOUST, J. Y. Salmonella and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, vol.24 (n° 1-2), p. 11-31, 1994.

D'AOUST, J. Y.; SEWELL, A. M. Slow rehydration for detection of *Salmonella* ssp. in feeds and feed ingredients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1220-1223, 1986.

DAVEY, M. E.; O'TOODLEY, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64 (n° 4), p. 847-867, 2000.

DAVIDSON, C. J.; WHITE, A. P.; SURETTE, M. G. Evolutionary loss of the rdar morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. **The ISME Journal**, v. 2, p. 293-307, 2008.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DAVIES, P. R.; HURD, H.S.; FUNK, J. A.; FEDORKA, P. J.; JONES, F. T. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 1 (n° 4), p. 202-215, 2004.

DAVIES, R. H.; WALES, A.D. *Salmonella* contamination of cereal ingredients for animal feed. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p.543-549, 2013.

DAVIES, R. H.; WALES, A. D. Investigations into *Salmonella* contamination in poultry feed mills in the United Kingdom. **Journal Applied Microbiology**, v. 190, p. 1430-1440, 2010.

DAVIES, R. H.; WRAY, C. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feed mills. **Veterinary Microbiology**, v. 51, p. 159-169, 1997.

DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60 (12), p. 4339-4344, 1994.

DE BONA, E.A M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. H.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 81 (n° 3), p. 218-225, 2014.

DESAI, M. A.; SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; WES SCHILLING, M.; SILVA, J. L. Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 75 (n° 7), p. 1332-1337, 2012.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 453-463, 2002.

EGUALE, T.; MARSHALL, J.; MOLLA, B.; BHATIYA, A.; GEBREYES, W. A.; ENGIDAWORK, E.; ASRAT, D.; GUNN, J. S. Association of multicellular behavior and drug resistance in *Salmonella enteric* serovars isolated from animals and human in Ethiopia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 961-971, 2014.

European Food Safety Authority (ESFA). Microbiological risk assessment in feedstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. **The ESFA Journal** 2008. Parma, v. 720, p. 1-84, 2008a. Disponível em: <<http://www.esfa.europa.eu/en/esfajournal/doc/720.pdf>>. Acesso em: 27 ago.2015.

European Food Safety Authority (ESFA). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2005. **The ESFA Journal** 2006. Parma, v. 94, p. 1-288, 2006. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/94r.pdf>. Acesso em: 15 set. 2015.

FEDORKA-CRAY, P. J.; HOGG, A.; GRAY, J. T.; LORENZEN, K. J.; VELASQUEZ, J.; VON BEHREN, P. Feed and feedtruck as source of *Salmonella* contamination in swine. **Swine Health and Production**, v. 5 (n° 5), p. 189-193, 1997.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FIEDLER, T.; KÖLLER, T.; KREIKEMEYER, B. *Streptococcus pyogenes* biofilm – formation, biology and clinical relevance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.5, article 15, 2015.

FINN, S.; HINTON, J. C. D.; MCCLURE, P.; AMÉZQUITA, A.; MARTINS, M.; FANNING, S. Phenotypic characterization of *Salmonella* isolates from food production environments associated with low-water activity foods. **Journal of Food Protection**, v. 76 (n° 9), p. 1488-1499, 2013.

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

FRANK, J. F. Control of biofilm in the food and beverage industry. In: WALKER, J.; SURMAN, S.; JASS, J. (Ed.). **Industrial Biofouling**. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 2000, p. 205-224.

FRANK, J. F.; EHLERS, J.; WICKER, L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. **Food Protection Trends**, v. 8, p. 654-663, 2003.

GARCIA, B.; LATASA, C.; SOLANA, C.; PORTILLO, F. G.; GAMAZO, C.; LASA, I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 54 (n° 1), p. 264-277, 2004.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 659-667, 2003.

GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. J. E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v. 23, p. 747-752, 2006.

GONZALES-ESCOBEDO, G.; GUNN, J. S. Identification of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium genes regulated during biofilm formation on cholesterol gallstone surfaces. **Infection and Immunity**, v. 81 (n° 10), p. 3770-3780, 2013.

GRANTCHAROVA, N.; PETERS, V.; MONTEIRO, C.; ZAKIKHANY, K.; RÖMLING, U. Bistable expression of *csgD* in biofilm development of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 192 (n° 2), p. 456-466, 2010.

GRIFFIT, R. W.; SCHWARTZ, K. J.; MAYERHOLTZ, D. K. Salmonella. IN: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 9ª Ed. Cap. 45, 739 -751, 2006.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9ª Ed. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pauster**, Paris, 2007. Disponível em:<<https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebActionEvent/oid/01s-000036-089>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

GUNDUZ, G.; GONUL, S.; KARAPINAR, M. Efficacy of sumae and oregano in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 39-44, 2010.

HABIMANA, O.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; VESTBY, L. K.; NESSE, L. L.; HEIR, E. Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host flora resident strains. **BMC Veterinary Microbiology**, v. 6 (n° 48), p. 1-10, 2010.

HABIMANA, O.; NESSE, L. L.; MØRETRØ, T.; BERG, K.; HEIR, E.; VESTBY, L. K.; LANGSRUD, S. The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: a subject of relevance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, p. 464-470, 2014

HENGGE-ARONIS R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective?. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p. 591–595, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N.R.; SNATH, P. H. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9º ed. Williams & Wilkims, p. 787, 1994.

HSIEH, Y-C.; POOLE, T. I.; RUNYON, M.; HUME, M.; HERRMAN, T. J. Prevalence of nontyphoidal *Salmonella* and *Salmonella* strains with conjugative antimicrobial-resistant serovars contaminating animal feed in Texas. **Journal of Food Protection**, v. 79 (n°2), p.194-204, 2016.

HUSS, A. R.; CHOCHRANE, R. A.; DELIEPHAN, A.; STARK, C. R.; JONES, C. K. Evaluation of a biological pathogen descontamination protocol for animal feed mills. **Journal of Food Protection**, v. 78 (n° 9), p. 1682-1688, 2015.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X.

Supplement 2008-2010 (n°48) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. **Institute Pauster**, Paris. 2014. *Research in Microbiology* XXX, 1-5.

JAIN, S.; CHEN, J. Attachment and biofilm by various serotypes of *Salmonella* as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. **Journal of Food Protection**, v. 70 (n° 11), p. 2473-2479, 2007.

JAQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y. D. N. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Animal Health Research Review**, v. 11 (n° 2), p. 97-121, 2010.

JONAS, K.; TOMENIUS, H.; KADER, A.; NORMAK, S.; RÖMLING, U.; BELOVA, L. M.; MELEFORS, O. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. **BMC Microbiology**, v. 7 (n°70), p.1-9, 2007.

JONES, F. T. A review of practical *Salmonella* control measures in animal. **The Journal Applied Poultry Research**, v. 20, p.102-113, 2011.

JONES, F. T.; RICHARDSON, E. K. *Salmonella* in commercially manufactured feed. **Poultry Science**, v. 83 (n° 3), p. 384-391, 2004.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASANGAR, I.; KARUNASANGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* ssp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.

KARAMPOULA, F.; GIAOURIS, E.; DESCHAMPS, J.; DOULGERAKI, A. I.; NYCHAS, G. J. E.; DUBOIS-BRISSENET, F. Hydrosol of *Thymra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82 (n°17), p. 5309-5319, 2016.

KEELARA, S.; THAKUR, S.; PATEL, J. Biofilm formation by environmental isolates of *Salmonella* and their sensibility to natural antimicrobials. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13 (n° 9), p.509-516, 2016.

KHAN, M. S.; LEE, J. Novel strategies for combating pathogenic biofilms using plant products and microbial antibiosis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.17, p. 126-140, 2016.

KOYUNCU, S.; ANDERSON, M.; LOFTSROM, C.; SKANDAMIS, P.; GOUNADAKI, A.; ZENTEK, J.; HAGGBLOM, P. Organic acids for control of *Salmonella* in differents feed materials. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 81-90, 2013.

KUZMISKA-BAJOR, M.; GRZYMAJLO, K.; UGORSKI, M. Type 1 fimbriae are importante factors limiting the dissemination and colonization of mice by *Salmonella* Enteritidis and contribute to the induction on intestinal inflammation during *Salmonella* invasion. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, artigo 276, p. 1-10, 2015.

LAMAS, A.; MIRANDA, J. M.; VÁZQUEZ, B.; CEPEDA, A.; FRANCO, C. M. Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in

Salmonella enterica decrease under anaerobic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 63-67, 2016.

LAMMERDING, A. M. An overview of microbial food safety risk assessment. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 11, p. 1420-1425, 1997.

LANDON, L. W.; MACKENZIE, K. D.; KÖSTER, W.; WHITE, A.P. From exit to entry: long-term survival and transmission of *Salmonella*. **Pathogens**, v. 1, p. 128-155, 2012.

LATASA, C.; ROUX, A.; TOLEDO-ARANA, A.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Molecular Microbiology**, v. 58 (n°5), p. 1322-1339, 2005.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strains variability of the biofilm forming ability of *Salmonella enteric* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 171-178, 2012.

LIU, Z.; NIU, H.; WU, S.; HUANG, R. CsgD regulatory in a bacterial trait-altering biofilm formation. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3 (n°1), e: 1, 2014.

MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication?. **Medical Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.

MALCOVA, M.; HRADECKA, H.; KARPISKOVA, R.; RYCHLIK, I. Biofilm formation in field strains of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium: identification of a new colony morphotype and the role of SGI1 in biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 360-366, 2008.

MARKEY, B. K.; LEONARD, F., ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2^a Ed. London: Mosby-Elsevier, 2013, p. 239-274.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v.413 (n°6858), 852–856, 2001.

MENCONI, A.; REGINATTO, A.; LONDERO, A.; PUMFOUND, N.; MORGAN, M.; HARGIS, B.; TELLEZ, B. Effect organic acids on *Salmonella* Typhimurium infection in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, p. 72-75, 2013.

MILADI, H.; MILI, D.; SLAMA, R. B.; ZOUARI, S.; AMMAR, E.; BAKHROUF, A. Anti-biofilm and anti-adhesive property of three Mediterranean essential oil against a foodborne pathogen *Salmonella* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 93, p.22-31, 2016.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; KOUIDHI, B.; CHAABOINI, Y.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A.; CHAIEB, K. Use of carvacrol, thymol and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium stain to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 56-63, 2017.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17 (n° 2), p. 73-87, 2009.

MONTEIRO, D. R.; PEPENFORT, K.; HENTRICH, K.; AHMAD, I.; LE GUYON, S.; REIMMAN, R.; GRANTCHAROVA, N.; RÖMLING, U. Hfq and Hfq-dependent small RNAs are major contributors to multicellular development in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **RNA Biology**, v. 9 (n° 4), p. 489-502, 2012.

MORITA, T.; KITAZAWA, H.; LIDA, T.; KAMATA, S. Prevention of *Salmonella* cross-contamination in an oil meal manufacturing plant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 464-473, 2006.

NESSE, L. L.; NORDBY, K.; HEIR, E.; BERGSJOE, B.; VARDUND, T.; NYGAARD, H.; HOLSTAD, G. Molecular analyses of *Salmonella enteric* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69 (n°2), p. 1075-1081, 2003.

NGUYEN, H. D. N.; YANG, Y. S.; YUK, H. G. biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on satinless steel and acrylic surface as affected by temperature and pH level. **LTW - Food Science and Technology**, v. 55, p. 383-388, 2014.

NOSTRO, A.; CELLINI, L.; GINESTRA, G.; D'ARRIGO, M.; DI GIULIO, M.; MARINO, A.; BLANCO, A. R.; FAVALORO, A.; BISIGNANO, G. Staphylococcal biofilm formation as affected by type acidulant. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 122, p. 648-653, 2013.

NOSTRO, A.; MARINO, A.; BLANCO, A. R.; CELLINI, L.; DI GIULIO, M.; PIZZIMENTI, F.; ROCCARO, A. S.; BISIGNAMO, G. *In vitro* activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 791-794, 2009.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, A. M.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519-523, 2007.

OH, S. Y.; YUN, W.; LEE, J. H.; KWAT, W. R.; CHO, J. H. Effect of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 59 (n° 4), p. 1-5, 2017.

OLIVEIRA, D. C. V.; FERNANDES JÚNIOR, A.; KANENO, R.; SILVA, M. G.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; SILVA, N. C. C.; RALL, V. L. M. Ability of *Salmonella* ssp.

to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 11 (n° 6), p. 478-483, 2014.

PANTANELLA, F.; VALENTI, P.; NATALIZI, T.; PASSERI, D.; BERLUTTI, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the mains techniques currently in use. **Annali Di Igiene**, v. 25, p. 31-42, 2013.

PARK, S. H.; CHEON, H. L.; PARK, K. H.; CHUNG, M. S.; CHOI, S. H.; RYU, S.; KANG, D. H. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 130-134, 2012.

PARK, Y. J.; CHEN, J. Control of the biofilms formed by curli and cellulose expressing shiga toxin-producing *Escherichia coli* using treatments with organic acids and commercial sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 78 (n°15), p. 990-995, 2015.

PAYATUBI, S.; CANSADO, C.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C. Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

PELLEGRINI, D. C. P.; PAIM, D. S.; LIMA, G. J. M. M.; PISSETTI, C.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. R. I. Distribution of *Salmonella* clonal groups in four Brazilian feed mills. **Food Control**, v. 47, p. 672-678, 2015.

PEÑALVER, P.; HUERTA, B.; BORGE, C.; ASTORGA, R.; ROMERO, R.; PEREA, A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **APMIS**, v. 113, p. 1-6, 2005.

PÉREZ-CONESA, D.; MCLANDSBOROUGH, L.; WEISS, J. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O156:H7 colony biofilms by micellar-encapsuled eugenol and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 69, p.2947-2954, 2006.

PETROVA, O.E.; SAUER, K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. **Jornal of Bacteriology**, v. 194 (n° 10), p. 2413-2425, 2012.

PIOVEZAN, M.; UCHIDA, N. S.; SILVA, A. F.; GRESPAN, R.; SANTOS, P. R.; SILVA, E. L.; CUMAN, R. K. N.; MACHINSKI JUNIOR, M.; MIKCHA, J. M. G. Effect of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde on *Salmonella* Saintpaul biofilm on stainless steel surface. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, p. 119-121, 2014.

PODOLAK, R.; ENACHE, E.; STONE, W.; BLACK, D. G.; ELLIOTT, P. H.; Source and risk factors for contamination, survival, persistence and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. **Journal of Food Protection**, v. 73 (n° 10), p. 1919-1936, 2010.

PRUNIĆ, B.; DUBRAVKA, M.; VELHNER, M.; PAJIĆ, M.; PAVLOVIĆ, L.; MIŠIĆ, D. Clonal persistence of *Salmonella enterica* serovars Montevideo, Tennessee and Infantis in feed factories. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10 (n° 6), p.662-666, 2016.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medical properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RICHARDS, J. J.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. **ChemBioChem**, v.10, p. 2287-2294, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127– 149, 1988.

ROBBE-SAULE, V.; JAUMOUILLE, V.; PREVOST, M.C.; GUADAGNINI, S.; TALHOUARNE, C.; MATHOUT, H.; KOLB, A.; NOREL, F. Crl activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v.188 (n°11), p. 3983–3994, 2006.

ROBIJINS, S. C. A.; ROBERFROID, S.; VAN PUYEVELDE, S.; DE PAUW, B.; SANTAMARIA, E. U.; DE WEERDT, A.; DE COSTER, D.; HERMANS, K.; DE KREERSMAECKER, S. C. J.; VANDERLEYDEN, J.; STEENAKERS, H. P. L. A GFP promoter fusion library for the study of *Salmonella* biofilm formation and the mode of action of biofilm inhibitors. **Biofouling**, v. 30 (n° 5), p. 605-625, 2014.

ROMANOVA, N. A.; GAWANDE, P. V.; BROVKO, L. Y.; GRIFFITHS, M. W. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 231-237, 2007.

RÖMLING, U.; BIAN, Z.; HAMMAR, M.; SIERRALTA, W. D.; NORMARK, S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 180 (n° 3), p. 722-731, 1998.

RÖMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSCHÄPE, H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, p. 273-285, 2003.

RÖMLING, U.; Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p.1234-1246, 2005.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products and functions. **Trends in Microbiology**, v. 23 (n°9), p. 545-557, 2015.

SANTIN, E.; HAYASHI, R. M.; WAMMES, J. C.; GONZALES-ESQUERRA, R.; CARAZZOLLE, M. F.; FREIRE, C. C. M.; MONZANI, P. S.; CUNHA, A. F. Phenotypic and genotypic features of *Salmonella* Heidelberg strain isolated in broilers in Brazil and their possible association to antibiotics and short-chain organic acids resistance and susceptibility. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 1-13, 2017.

SAVIUC, C. M.; DRUMEA, V.; OLARIU, L.; CHIFIRIUC, M. C.; BEZIRTOGLOU, E.; LAZĂR, V. Essential oils with microbiocidal and antibiofilm activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, p. 137-151, 2015.

SEIXAS, R.; MACHADO, J.; BERNARDO, F.; VILELA, C.; OLIVEIRA, M. Biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- Portuguese isolates: a phenotypic, genotypic, and socio-geographic analysis. **Current Microbiology**, v. 68, p. 670-677, 2014.

SEMENIUC, C. A.; POP, C. R.; ROTAR, A. M. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 403-408, 2017.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; SHARMA, P.; CHANDORALA, D.; DANG, S.; GRUPTA, S.; GABRANI, R. *Escherichia coli* biofilm development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology**. doi 10.1111/jam 13078, 2016.

SILVA, L. A.; CORREIA, A. F. K. Manual de Boas Práticas de Fabricação para Indústria Fracionadora de Alimentos. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.16, n.32, p.39-57, 2009.

SIMM, R.; AHMAD, I.; RHEN, M.; LE GUYON, S.; RÖMLING, U. Regulation of biofilm in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **Future Microbiology**, v. 9 (n° 11), p. 1261-1282, 2014.

SINDIRAÇÕES. Boletim informativo do setor de alimentação animal dezembro 2017. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2017/12/boletim_informativo_do_setor_dez_2017_vs_final_port_sindiracoes.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2018.

SINDIRAÇÕES. Manual Feed & Food Safety: Gestão do Alimento seguro. Versão 4.0 – Janeiro de 2008. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2012/03/manual_pffsgas_versao4_0.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2018.

SINGLA, R.; GOEL, H.; GANGULI, A. Novel synergetic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118 (n° 1), p. 34-40, 2014.

Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA). **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle**. Campinas, SP: SBCTA, 2a edição, 1995.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 43 (n° 3), p. 793-808, 2002.

SOLANO, C.; SESMA, B.; ALVAREZ, M.; HUMPHREY, T. J.; THORNS, C. J.; GAMAZO, C. Discrimination of strains of *Salmonella* Enteritidis with differing levels

of virulence by an in vitro glass adherence test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36 (n° 3), p. 674-678, 1998.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G.; Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p.136-141, 2012.

SONI, K. A.; OLADUNJOYE, A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, A. W.; SILVA, J. L.; MIKEL, B.; BAILEY, R. H. Inhibition and inactivation of *Salmonella* Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 76 (n°2), P. 205-212, 2013.

SPERANZA, B.; MONACIS, N.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Approachs to removal and killing of *Salmonella* spp. Biofilms. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p.1-9, 2017.

SPIERS, A. J.; BOHANNON, J.; GEHRIG, S. M.; RAYNER, P. B. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 15-27, 2003.

STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; REISNER, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumonia* on urethral catheters requeres either type 1 or type 3 fimbriae. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 350-359, 2013.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* ssp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. **Letter in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p.175-179, 2000.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and pratical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica Micorbiologica et Imunologica Scandinavica**, v. 115, p. 891-899, 2007.

STOODLEY, P.; SAUDER, K.; DAVIES, D.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Anual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKOWA, T.; OBANA, N.; YAMATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that's hope biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 23, p. 1-6, 2015.

TSOLIS, R. M.; YOUNG, G. M.; SOLNICK, J. V.; BAUMLER, A. J. From bench to bed side: Sealth of entero invasive pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6 (n° 12), p. 883-892, 2008.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65 (n°10), p. 4606-4610, 1999.

VAN IMMERSEEL, F.; RUSSEL, J. B.; FLYTE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanist explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35 (n°3), p. 182-188, 2006.

VESTBY, L. K.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L. L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. **BCM Veterinary Research**, v. 5 (n° 20), p. 1-6, 2009a.

VESTBY, L.K.; MØRETRØ, T.; BALLANCE, S.; LANGSRUD, S.; NESSE, L. L. Survival potential of wildtype cellulose deficient *Salmonella* from feed industry. **BMC Veterinary Research**, v. 5: 93, 2009b.

WALES, A. D.; ALLEN, V. M.; DAVIES, R. H. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 7 (n° 1), p. 3-15, 2010.

WALES, A. D.; McLARREN, I.; RABIE, A.; GOSLING, R. J.; MARTELLI, F.; SAYERS, R.; DAVIES, R. Assesment of the anti-*Salmonella* activity of commercial formulations of organic acids products. **Avian Pathology**, v. 42 (n° 3), p. 268-275, 2013.

WANG, H.; DONG, Y.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless surface. **Food Control**, v. 59, p. 546-552, 2016.

WHITE, A. P.; GIBSON, D. L.; KIM, W.; KAY, W. W.; SURETTE, M. G. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 188 (n° 9), p. 3219-3227, 2006.

WIERUP, M.; HÄGGBLOM, P. As assessment of soy beans and other vegetable proteins as source of *Salmonella* contamination in pig production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v 59:15, 2010.

WIERUP, M.; KRISTOFFERSEN, T. Prevention of *Salmonella* contamination of finished soybean meal used for animal feed by Norwegian production plant despite frequent *Salmonella* contamination of raw soy beans, 1994-2012. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56 (n°41), p. 1-9, 2014.

YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HØIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Combating biofilms. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, p. 146-157, 2012.

YANG, S.; WU, Z.; LIN, W.; XU, L.; CHENG, L.; ZHOU, L. Investigation into *Salmonella* contamination in feed production chain in Karst rural areas of China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24 (n° 2), p. 1372-1379, 2017.

ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from human gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 71 (n° 7), p. 4151-4158, 2003.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 36 (n° 6), p. 1452-1463, 2001.