

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANOELLI APARECIDA RODRIGUES DOS SANTOS

EXPLORANDO OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIMENTA PRETA (*Piper nigrum*) E
GENGIBRE (*Zingiber officinale*) E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS NO CONTROLE DE
BIOFILME MULTIESPÉCIE DE *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* TYPHIMURIUM
E *Pseudomonas aeruginosa*

SCREENING THE ESSENTIAL OILS OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum*) AND
GINGER (*Zingiber officinale*) AND THEIR ACTIVE PRINCIPLES IN THE CONTROL
OF MULTISPECIES BIOFILM OF *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*
TYPHIMURIUM AND *Pseudomonas aeruginosa*

PALOTINA

2022

EMANOELLI APARECIDA RODRIGUES DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIMENTA PRETA (*Piper nigrum*) E
GENGIBRE (*Zingiber officinale*) E PRINCÍPIOS ATIVOS PIPERINA E 6-GINGEROL
NO CONTROLE DE BIOFILME MULTIESPÉCIES DE *Listeria*
monocytogenes, *Salmonella* Typhimurium E *Pseudomonas aeruginosa*

SCREENING THE ESSENTIAL OILS OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum*) AND
GINGER (*Zingiber officinale*) AND THEIR ACTIVE PRINCIPLES IN THE CONTROL
OF MULTISPECIES BIOFILM OF *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*
TYPHIMURIUM AND *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Olívia Pereira

PALOTINA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237 Santos, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos
Explorando os óleos essenciais de pimenta preta (*Piper nigrum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) e seus princípios ativos no controle de biofilme multiespécie de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* / Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos – Palotina, 2022.
105f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Coorientadora: Maria Olívia Pereira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Compostos naturais. 2. Expressão gênica. 3. Indústria de alimentos. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Pereira, Maria Olívia. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 579



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EMANOELLI APARECIDA RODRIGUES DOS SANTOS** intitulada: **Explorando os óleos essenciais de pimenta preta (*Piper nigrum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) e seus princípios ativos no controle de biofilme multiespécie de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa***, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 31 de Janeiro de 2022.

Assinatura Eletrônica
31/01/2022 16:39:06.0
LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
01/02/2022 15:17:33.0
MATEUS MATIUZZI DA COSTA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO)

Assinatura Eletrônica
31/01/2022 15:58:31.0
UELINTON MANOEL PINTO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
01/02/2022 16:59:17.0
MARIA OLÍVIA BAPTISTA DE OLIVEIRA PEREIRA
Coordenador(a) (UNIVERSIDADE DO MINHO)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 143773

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 143773

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos, filha de Vera Antônia Rodrigues dos Santos, nascida em 06 de setembro de 1993 no município de Uruguaiana, estado do Rio Grande do Sul. Médica Veterinária graduada em 2017 pela Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus Uruguaiana. Residente em Inspeção de Produtos de Origem Animal no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, turma de 2018-2020. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, na linha de pesquisa Microbiologia Aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de poder ilimitado, que iluminou esta caminhada, abastecendo minhas forças e permitindo que tudo acontecesse ao longo de minha vida, és o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais, Hernan e Marília, pela educação e orientação sobre os valores da vida, pois em meio às turbulências a que somos submetidos, ter alguém de referência para ouvir e seguir é fundamental para não se perder no meio do caminho.

Agradeço aos meus irmãos, Hernan e Mikael, que mesmo com a distância sempre se fizeram presentes, estiveram ao meu lado e torcendo para que tudo desse certo. Vocês são os meus presentes mais lindos.

A minha mãe, Vera, e meu irmão, Ayrton, obrigada pelo incentivo e pela admiração.

A minha amiga e irmã Tatiane, companheira que fez parte da minha formação e mesmo a distância esteve sempre presente em minha vida.

A minha amiga e colega Jhennifer, por todo apoio tanto em nosso convívio laboratorial como em nossas conversas aleatórias recheadas de açaí. Vou sentir falta da nossa parceria!

Ao meu amigo e namorado Leonardo, pelo companheirismo, incentivo e amor durante toda essa etapa. Obrigada por estar sempre ao meu lado e ser a minha melhor “dupla de laboratório”, amo você assim como amo nossas discussões científicas.

A todos os amigos que fiz em Palotina, em especial Claudia, Mayara, Jhennifer, Rosana, Thiago e Victor. Agradeço pela convivência e afinidades que nos fizeram compartilhar emoções, sentimentos e ideias, respeitando as peculiaridades de cada um, superando os momentos de angústia e vivendo de forma leve os momentos de alegria.

A todos integrantes do LACOMA, doutorandos, mestrandos, residentes e estagiários, agradeço por nosso convívio diário repleto de aprendizagem e companheirismo.

Ao professor e amigo Juliano, por ser um profissional incrível o qual tenho como grande exemplo, pelo auxílio nas análises estatísticas, disponibilidade, paciência e incentivo durante mais esta etapa.

Ao professor Fábio Possebon (Cid) pela disponibilidade no auxílio das análises moleculares.

Ao meu orientador e amigo, professor Luciano Bersot, pelo aceite de orientação, por ser um exemplo de caráter e sabedoria, e por auxiliar no meu crescimento profissional de forma ética e correta.

A minha co-orientadora, professora Maria Olívia Pereira, pelas discussões de ideias e pela orientação mesmo com um fuso horário com 4 h de diferença.

A Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) pelo auxílio na execução do projeto de pesquisa, principalmente através do financiamento para o projeto de pesquisa e ao corpo docente do PPGCA pelo conhecimento adquirido.

A CAPES pela bolsa concedida.

E todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada!

Não sejas o de hoje.
Não suspires por ontens...
Não queiras ser o de amanhã.
Faze-te sem limites no tempo.
Vê a tua vida em todas as origens.
Em todas as existências.
Em todas as mortes.
E sabe que serás assim para sempre.
Não queiras marcar a tua passagem.
Ela prossegue:
É a passagem que se continua.
É a tua eternidade.
És tu.
(Cecília Meireles)

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade do biofilme multiespécies composto por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* frente à ação dos óleos essenciais (OE) de pimenta preta (P) (*Piper nigrum*) e gengibre (GB) (*Zingiber officinale*), e princípios ativos de piperina e 6-gingerol na dinâmica de formação e expressão gênica em superfície de polipropileno. Para isso foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos OE e princípios ativos. A formação de biofilme foi avaliada sob a interferência dos OE de pimenta preta e gengibre na concentração de 50 mg/mL e 100mg/mL. Da mesma forma foram avaliados os princípios ativos de piperina e 6-gingerol. Para o OEP também foi avaliada a eficácia sobre o biofilme pré-formado. A associação dos três microrganismos resultou na MIC de 100 mg/ml para o OEP e OEGB, 25 mg/ml para piperina e 1,25 mg/mL para 6-gingerol. O biofilme multiespécies controle foi capaz de aderir à superfície de polipropileno obtendo um maior incremento populacional em 48 e 72 h (6,66 e 7,35 UFC/cm², respectivamente). A concentração de 100 mg/mL de OEP demonstrou melhor ação, na adesão inicial em 1h, contudo, não houve diferença estatística entre as concentrações de OEP nos demais tempos de avaliação, havendo uma inversão no tempo de 12 h e posteriormente mantendo o mesmo comportamento. Para o OEGB foi verificado que na concentração de 100 mg/mL obteve-se uma diminuição de 99,8 % nas células sésseis com relação ao controle. A adição de piperina na concentração de 25 mg/mL obteve as menores contagens de células sésseis quando comparado ao OEP, quanto a aplicação de 1,25 mg/ml de 6-gingerol não foi suficiente para evitar a formação do biofilme em superfície de polipropilenos ($p>0,05$). No biofilme multiespécies, *L. monocytogenes* regulou de forma positiva o gene *agrC* nos tempos de 24 h e 72 h, e passou a regular de forma positiva os genes *agrD* e *prfA* com 72h. *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* mantiveram a regulação gênica negativa para todos os genes avaliados nos tempos de avaliação. A aplicação de 25 mg/mL de piperina alterou a regulação de genes não apresentados no biofilme controle. *L. monocytogenes* em cultura associada passou a regular de forma positiva os genes *agrB* (24 h e 72 h), *agrC* (72 h), *agrD* (24 h e 72 h) e *prfA* (24 h), ao observar a expressão de genes em culturas simples sobre a condição tratada, manteve o comportamento semelhante com o biofilme multiespécies controle, diferindo através do gene *agrD* que é regulado de forma positiva a partir de 24h de incubação e o gene *agrC* com regulação negativa. *S. Typhimurium* em cultura mista passou a regular de forma positiva os genes *agfA* (24 h e 72 h), *adrA* (24 h e 72 h), e *csgD* (72 h), de forma individual manteve o mesmo comportamento que em associação, no entanto passa a regular de forma positiva o gene *csgD* no tempo de 24 h. *P. aeruginosa* em cultura mista regulou de forma positiva todos os genes avaliados com 24 h e 72 h de incubação e manteve o mesmo nível de regulação gênica (negativa) independente do tempo avaliado em cultura simples. OEP, OEGB e piperina demonstraram atividade antimicrobiana e antibiofilme, interferindo no processo de adesão a superfície e na manutenção de biofilmes maduros.

Palavras-chave: compostos naturais, expressão gênica, indústria de alimentos, métodos de controle

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the susceptibility of the multispecies biofilm composed by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Pseudomonas aeruginosa* against the action of essential oils (EO) of black pepper (*Piper nigrum*) and ginger (*Zingiber officinale*), and active principles of piperine and 6-gingerol on the formation dynamics and gene expression on polypropylene surface. For this, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the EOs and principles were determined. Biofilm formation was evaluated under the interference of black pepper and ginger EOs at concentrations of 50 mg/mL and 100 mg/mL. Similarly, the active ingredients of piperine and 6-gingerol were evaluated. The efficacy of the preformed biofilm was also evaluated for the OE black pepper. The association of the three microorganisms resulted in a MIC of 100 mg/mL for the OEP and ginger OE, 25 mg/mL for piperine, and 1.25 mg/mL for 6-gingerol. The control multispecies biofilm was able to adhere to the polypropylene surface obtaining a higher population increment in 48 and 72 h (6.66 and 7.35 CFU/cm², respectively). The concentration of 100 mg/mL of OEP showed better action in the initial adhesion in 1h, however, there was no statistical difference between the concentrations of OEP in the other evaluation times, with an inversion in the time of 12 h and later maintaining the same behavior. For the ginger EO, it was verified that at the concentration of 100 mg/mL there was a 99.8% reduction in sessile cells compared to the control. The addition of piperine at a concentration of 25 mg/mL obtained the lowest sessile cell counts when compared to OEP, and the application of 1.25 mg/mL of 6-gingerol was not enough to prevent biofilm formation on the polypropylene surface ($p>0.05$). Multispecies biofilm *L. monocytogenes* positively regulated *agrC* gene at 24 and 72 h, and positively regulated *agrD* and *prfA* genes at 72 h. *S. Typhimurium* and *P. aeruginosa* maintained negative gene regulation for all genes evaluated in the evaluation times. The application of 25 mg/mL of piperine altered the regulation of genes not present in the control biofilm, *L. monocytogenes* in associated culture started to regulate in a positive way the genes *agrB* (24 h and 72 h), *agrC* (72 h), *agrD* (24 h and 72 h) and *prfA* (24 h), when observing the expression of genes in simple cultures on the treated condition, kept the similar behavior with the control multispecies biofilm, differing through the gene *agrD* that is regulated positively from 24h of incubation and the gene *agrC* with negative regulation. *S. Typhimurium* in mixed culture started to positively regulate genes *agfA* (24 h and 72 h), *adrA* (24 h and 72 h), and *csgD* (72 h). *P. aeruginosa* in mixed culture positively regulated all the genes evaluated at 24 and 72 h of incubation and maintained the same level of gene regulation (negative) independent of the time evaluated in simple culture. OEP, OEGB, and piperine showed antimicrobial and antibiofilm activity, interfering in the process of adhesion to the surface and the maintenance of mature biofilms.

Keywords: control methods, food industry, gene expression, natural compounds.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Esquema ilustrativo de formação de biofilme multiespécies (adaptado de Rickard et al.; 2003; Boari et al.; 2009)24

OBJETIVOS

Figura 2: Diagrama conceitual da seção de material e métodos da dissertação - Capítulo 134

Figura 3: Diagrama conceitual da seção de material e métodos da dissertação - Capítulo 233

CAPÍTULO 1

Figura 1: Interferência da concentração de 100 mg/ml e 50 mg/ml do OEP na dinâmica de crescimento de biofilme multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °c.48

Figura 2: Proporção de erradicação do biofilme multiespécie de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* tratado com 250 mg de piperina pelo tempo de 10 min..... 50

Figura 3: Interferência da concentração de 25 mg/ml (MIC) e 12,5 mg/ml (^{1/2} MIC) de piperina na dinâmica de crescimento de biofilmes multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °c.....51

Figura 4: Avaliação comparativa de ação entre os tratamentos utilizando piperina e OEP nos diferentes tempos de avaliação.53

Figura 5: Distribuição relativa da composição microbiana dos biofilmes multiespécies pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC/cm²) para a população bacteriana em cada momento avaliado.....55

Figura 6: Expressão gênica relativa dos genes *agrABCD* e *prfA* para *L. monocytogenes*; *agfA*, *adrA* e *csgD* para *S. Typhimurium*; *rhlL*, *lasL*, *lasR* e *algD* para *P. aeruginosa*, normalizada com os genes *rpID* (*L. monocytogenes*), 16s rRNA (*S. Typhimurium*) e 16s rRNA (*P. aeruginosa*), para o biofilme multiespécies nos tempos de 24 h e 72 h.....57

CAPÍTULO 2

Figura 1: Interferência de 50 mg (^{1/2} MIC) e 100 mg (MIC) na dinâmica de crescimento séssil de biofilmes multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °c.73

Figura 2: Ação anti formação de biofilme utilizando a concentração de 1,25 mg (MIC) de 6-gingerol, 50 mg ($1/2$ MIC) e 100 mg (MIC) do OE de gengibre.....	75
Figura 3: Distribuição relativa de cada microrganismo estudado dentro do biofilme multiespécies em função do tempo e do tratamento aplicado.....	77

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

Quadro 1: composição do OE de gengibre contendo os principais compostos majoritários.....	68
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Genes alvo e sequências dos primers utilizados na avaliação da expressão gênica do biofilme multiespécie de isolados de <i>P.aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Typhimurium</i>	45
Tabela 2: Atividade antimicrobiana do oep e piperina frente <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i> em culturas individuais e em associação.....	47

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do OE de gengibre e 6- gingerol frente a <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i> em culturas individuais e em associação.	72
Tabela 2: Atividade de 6- gingerol frente a <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i> em biofilme multiespécies.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
C+	- Controle positivo
CAS	- <i>Chemical Abstracts Service</i>
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CT	- <i>Cycle Threshold</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DVA	- Doenças Veiculadas por Alimentos
DR	- Distribuição Relativa
EPS	- Exopolissacarídeos
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
GB	- Gengibre
h	- Horas
MH	- Caldo muller hinton
MIC	- Concentração Inibitória Mínima
mL	- Mililitros
mg	- Miligrama
min	- Minutos
OE	- Óleos Essenciais
OEP	- Óleos Essencial de pimenta preta
OXA	- Ágar Listeria Oxford
PBS	- Tampão fosfato salino
pH	- Potencial Hidrogeniônico
qPCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
QS	- <i>Quorum Sensing</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
TSA	- Ágar triptona de soja
TSB	- Caldo triptona de soja
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
XLD	- Ágar xilose lisina desoxicolato
YE	- Extrato de levedura

LISTA DE SÍMBOLOS

- © - Copyright
- Δ - Delta
- ® - Marca registrada
- KHz - Quilo-Hertz
- Σ - Somatório de números

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 BIOFILMES BACTERIANOS.....	21
2.1.1 Aspectos gerais.....	21
2.1.2 Biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i> em indústrias de alimentos	24
2.1.3 Biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i> : Fatores genotípicos	26
2.1.4 Compostos naturais como estratégia de controle em biofilmes microbianos ...	28
2.1.5 Pimenta preta (<i>Piper nigrum</i>) e piperina.....	29
2.1.6 Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>) e 6-gingerol	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 CAPÍTULO 1: PIPERINA E ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA PRETA INIBEM A FORMAÇÃO DE BIOFILME MULTIESPÉCIES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>, <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	36
4.1 INTRODUÇÃO	38
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.2.1 Isolados utilizados	39
4.2.2 Obtenção e preparo do OE de pimenta preta e princípio ativo piperina	40
4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) em <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i>	40
4.2.4 Formação e eliminação de biofilme multiespécies em superfície de polipropileno com ação do OEP	41
4.2.5 Formação de biofilme em superfície de polipropileno com interferência de piperina	42
4.2.6 Distribuição relativa (DR) do biofilme de três espécies	43
4.2.7 Avaliação da expressão de genes relacionados à formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i>	43
4.2.8 Análise estatística	46
4.3 RESULTADOS	46
4.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	46

4.3.2 Atividade do OEP sob o biofilme formado em superfície de polipropileno	47
4.3.3 Interferência de piperina na formação do biofilme multiespécies	51
4.3.4 Eficácia comparada do OEP e piperina sobre biofilme multiespécies	51
4.3.5 Distribuição relativa (DR) do biofilme de três espécies	54
4.3.6 Efeito da piperina na expressão de genes relacionados à formação do biofilme multiespécies de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i>	55
4.4 DISCUSSÃO	58
4.5 CONCLUSÃO	64
5 CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE E 6-GINGEROL SOBRE BIOFILME MULTIESPÉCIES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>, <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	65
5.1 INTRODUÇÃO	66
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	67
5.2.1 Isolados utilizados	67
5.2.2 Obtenção e preparo do OE de gengibre (GB) e princípio ativo 6-gingerol	67
5.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> e <i>P. aeruginosa</i>	68
5.2.4 Formação de biofilme em superfície de polipropileno com interferência de OEGB	69
5.2.5 Formação de biofilme em superfície de polipropileno com interferência de 6-gingerol	70
5.2.6 Distribuição relativa (DR) de biofilmes de três espécies	70
5.2.7 Análise estatística	71
5.3 RESULTADOS	71
5.3.1 Atividade antimicrobiana do OEGB e 6-gingerol	71
5.3.2 Efeito do OEGB e 6-gingerol na formação de biofilme multiespécies em superfície de polipropileno	72
5.4 DISCUSSÃO	78
5.5 CONCLUSÃO	81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS	83
Anexo 1: Determinação da concentração inibitória mínima dos OEP e OEGB em culturas individuais e mistas	101

anexo 2: Média $\pm$ desvio padrão das contagens bacterianas (ufc/cm ²) na etapa de eliminação de biofilmes tratados com oep (250 mg) ao longo de 96 h de contato ..	102
anexo 3: Média das contagens bacterianas (ufc/cm ²) na etapa de formação de biofilmes tratados com OEP (100 mg e 50 mg) e piperina (12,5 mg e 25 mg) ao longo de 96 h de contato	103
anexo 1: Média $\pm$ desvio padrão (ufc/cm ²) de células planctônicas tratados com OEGB ao longo 96h de contato	104
anexo 2: Média $\pm$ desvio padrão (ufc/cm ²) de células sésseis tratados com OEGB ao longo 96 h de contato	105

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de obtenção e processamento da carne em abatedouros frigoríficos apresenta várias etapas, inúmeras instalações e equipamentos que em conjunto com a manipulação e o binômio tempo e temperatura, possui interferência direta sob os aspectos higienicossanitários dos produtos (BRASIL, 2017). Ao longo do abate, a qualidade microbiológica de produtos e processos é verificada através da pesquisa de microrganismos indicadores e patogênicos permitindo a avaliação da ocorrência de falhas na manipulação, processamento, produção e armazenamento destes produtos (SOARES et al., 2018; SERENO et al., 2019; VIANA et al., 2019).

Desta forma, microrganismos patogênicos e deteriorantes encontrados nos produtos e superfícies podem originar doenças bacterianas veiculadas por alimentos (DVA) gerando perdas econômicas e problemas em saúde pública. *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* estão entre os principais patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar (CDC, 2020; BRASIL, 2019; SCOBIE et al., 2019), sendo associados principalmente a ingestão de produtos de origem animal e vegetal (BRASIL, 2019). Por sua vez, *Pseudomonas aeruginosa* é classificado como um microrganismo onipresente e com capacidade psicotrófica, associado especialmente ao processo de deterioração e interferindo de forma direta no tempo de prateleira de produtos finais (MORADALI, GHODS E REHM, 2017).

Nas plantas de abate e processamento tecnológico de produtos cárneos *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* demonstram capacidade de sobrevivência e persistência por longos períodos (SERENO et al., 2019), sendo este comportamento relacionado a fatores de adaptação ambiental como tolerância a temperaturas de refrigeração e elevadas concentrações de sal, resistência a antibióticos e sanitizantes e capacidade de formar biofilmes em distintas superfícies (ZIECH et al., 2016; KOCOT e OLSZEWSKA, 2017; PAPAIOANNOU et al., 2018).

A persistência destes microrganismos patogênicos e deteriorantes, tolerância a agentes sanitizantes e formação de biofilmes são fatores que denotam preocupação para a indústria de alimentos, podendo causar sérios problemas tecnológicos, resultando na inutilidade de equipamentos e gerando riscos à saúde pública (BRASILEIRO et al., 2016; SMITH et al., 2019). Dessa forma, os biofilmes multiespécies desempenham um papel importante na manutenção de nichos ecológicos persistentes e na sobrevivência de microrganismos patogênicos e

deteriorantes como *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em ambientes industriais (GIAOURIS et al., 2015).

A formação do biofilme depende da comunicação e interação entre microrganismos, a superfície de fixação, disposição de substratos e as condições ambientais (GALIÉ et al., 2018). Células sésseis apresentam maior tolerância a agentes antimicrobianos do que células planctônicas, devido à estrutura e a presença de matriz extracelular (OLSZEWSKA et al., 2016, CAMPANA et al., 2018). Portanto, desinfetantes químicos a base de compostos clorados, iodados e ácidos orgânicos são frequentemente empregados como estratégia de controle nas plantas de processamento devido ao seu custo e padronização comercial de aplicação. No entanto, estudos demonstram que estas substâncias possuem impacto antimicrobiano limitado em células sésseis uma vez que a padronização dos procedimentos pode sofrer variações conforme o setor industrial (BARBOSA et al., 2016, ZIECH et al., 2016, BOUCHER et al., 2021) e a possível ocorrência de liberação de resíduos químicos que podem ter interferência sobre a superfície higienizada e o produto final (CHHETRI et al., 2019).

Devido aos relatos de resistência de microrganismos patogênicos e deteriorantes a sanitizantes químicos (OLSZEWSKA et al., 2016; PANG et al., 2019) somado a solicitação de opções sustentáveis por parte de consumidores, novas abordagens vêm sendo pesquisadas quanto ao uso destes produtos na indústria de alimentos, com objetivo de controlar a contaminação bacteriana pela inibição da formação e eliminação de biofilmes (FANG et al., 2020), introduzindo novos conceitos a serem apreciados e aprimorando opções já existentes. Entre as alternativas, componentes obtidos de plantas como seus princípios ativos e óleos essenciais (OE) são compostos antimicrobianos que podem ser utilizados como formas de controle microbiológico (MARÁKOVÁ et al., 2017, FALCÓ et al., 2019, MARUTHAPANDI et al., 2020). O efeito de OE na eliminação de biofilmes bacterianos monoespécies foi descrito, bem como em associação a métodos convencionais e alternativas de combinação destes (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2018; KANG et al., 2019; ROSSI et al., 2019). Considerando a escassez de informações com relação à utilização dos OE de pimenta preta, gengibre e princípios ativos de piperina e 6-gingerol, o objetivo deste estudo foi explorar a atividade destes compostos no controle de biofilmes multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOFILMES BACTERIANOS

2.1.1 Aspectos gerais

Biofilmes bacterianos são estruturas tridimensionais complexas formados por um aglomerado celular e envoltos por uma membrana de exopolissacarídeos (EPS), podendo estar aderido a superfícies bióticas e/ou abióticas (COSTERTON, 1999, KADAM et al., 2021). As células se dispõem de forma organizada e funcional de modo a desenvolver uma barreira de proteção sendo responsáveis pela conservação destes microrganismos em condições adversas, como oscilações de temperatura, teor de umidade, condições de processamento de alimentos e processos de desinfecção (GALIÉ et al., 2018, FAGERLUND et al., 2020, ROY et al., 2021). Desta forma, podendo ocorrer à contaminação crônica de equipamentos e superfícies, levando a bioincrustação em sistemas de água potável e resultando em contaminação e deterioração de produtos (IÑIGUEZ-MORENO, et al.; 2019 KWOK et al., 2021). Devido a isso, cada vez mais se têm o interesse da comunidade científica sob o entendimento da formação e desenvolvimento de biofilmes bacterianos, com o intuito de desenvolver e incrementar métodos com maior eficácia no controle destas estruturas.

Habitualmente os biofilmes estão dispostos de forma heterogênea, compostos de inter-espécies e inter-reinos, buscando uma relação simbiótica onde as características intrínsecas e o produto do metabolismo de uma espécie possa auxiliar no desenvolvimento das demais (GIAOURIS et al., 2015, AFONSO et al., 2021). No entanto, esta mesma associação pode resultar em um estresse celular gerado pela competição por nutrientes e o acúmulo de metabólitos tóxicos limitando a diversidade de espécies dentro da estrutura do biofilme (LORIES et al., 2020). A formação do biofilme bacteriano resulta da interação de atividade microbiana aliada às condições ambientais e disposição de substratos (CHUA et al., 2014). Desta forma, pode ser separada em cinco fases propostas como, fase de adsorção e aderência, podendo ser reversível e irreversível, fase de consolidação e maturação, havendo comunicação celular e síntese de EPS e fase de dispersão, com liberação e exposição celular para o ambiente (COSTERTON, 1999, COOPER et al., 2014).

Em cada fase da formação são ativados mecanismos regulatórios específicos responsáveis pela manutenção desta estrutura sob determinada superfície.

As fases de adsorção e aderência bacteriana são descritas como a etapa inicial da disposição do biofilme (FIGURA 1A). Adsorção inicial consiste no processo de aproximação e adaptação de uma massa bacteriana à determinada superfície através de uma ligação reversível mantida por influências físico-químicas, que incluem interações eletrostáticas, forças hidrodinâmicas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (LIU et al., 2020, KADAM et al., 2021, LEE et al., 2021). Após este processo, tem se início à fase de adesão, ligação irreversível, onde são utilizadas as características intrínsecas dos microrganismos, como a presença de flagelos e/ou pili em gram-negativos, e proteínas presentes na parede bacteriana em gram-positivos (BUCHER et al., 2015, LEE et al., 2016), dessa forma sintetizando e secretando substâncias responsáveis pela manutenção dessa adesão (RODRÍGUEZ-MELCÓN et al., 2021). O resultado dessas interações dependerá da associação de atração e repulsão originada entre a superfície e os microrganismos, até um momento em que as células adsorvidas permaneçam fixadas a superfície, estabilizando o processo de adesão bacteriana (COOPER et al., 2014, RUHAL e KATARIA, 2021).

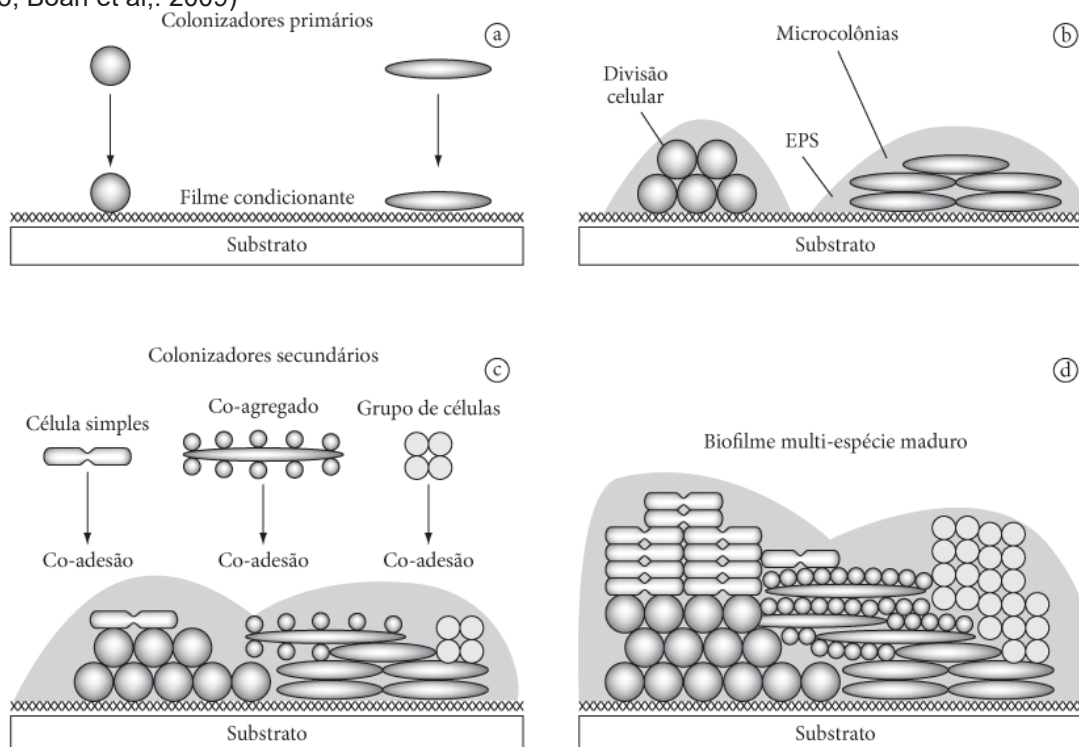
Após a consolidação da adesão irreversível, iniciam-se as fases de conformação e maturação, onde ocorrem os processos de comunicação celular através de mecanismos regulatórios e coordenados para a expressão de um maquinário genético característico para que ocorra a estruturação do biofilme (FENG et al., 2021) (FIGURA 1B).. Bactérias gram-positivas e gram-negativas possuem a capacidade de produzir uma matriz de EPS logo após o processo de adesão, o que resulta na formação de estruturas robustas compostas por polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular (WANG et al., 2020). Ao exemplo no que corre na formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, onde há o aumento da expressão de genes responsáveis pela regulação de EPS aumentando a secreção de substâncias poliméricas e alterando a morfogênese do biofilme (BANERJEE et al., 2021).

Durante o momento de maturação do biofilme, o desenvolvimento da estrutura bacteriana de EPS é um processo essencial para a sobrevivência de células sésseis em condições hostis ou de desafio celular como a aplicação de sanitizantes químicos e antimicrobianos (ZIECH et al., 2016, YAMANI et al., 2021).

Dessa forma a produção da matriz de EPS pode ocasionar maior tolerância a esses produtos, podendo suportar concentrações superiores a concentração inibitória das células planctônicas da mesma espécie (WANG et al., 2020) (FIGURA 1B-C).. Essa tolerância é conferida devido à formação de canais de circulação responsáveis pela troca de nutrientes com o meio extracelular, impedindo o fluxo e a difusão de compostos antimicrobianos para o interior do biofilme (KADAM et al., 2021). Essa característica é um fator de importância, devido ao fato de as células presentes no interior do biofilme serem metabolicamente distintas das células planctônicas, gerando grandes consequências na ação efetiva de sanitizantes (PIRONTI et al., 2021, BOUCHER et al., 2021), visto que as alternativas atuais para o controle do biofilme são desenvolvidas e avaliadas, na maioria das vezes, em células planctônicas e metabolicamente ativas (BARBOSA et al., 2016).

Na fase final da formação do biofilme ocorre a dispersão externa ou interna de agregados celulares (FIGURA 1D).. Na forma externa, o desprendimento celular ocorre a partir da superfície de adesão através de atividades mecânicas no ambiente (FLEMING e RUMBAUGH, 2017), já a forma interna pode ocorrer como resultado da degradação estrutural do biofilme através da ação de enzimas endógenas de deterioração de matriz extracelular (PETROVA e SAUER, 2016). O processo de dispersão tem implicações severas na indústria de alimentos, pois permite que os microrganismos possam se espalhar e colonizar outras superfícies (WILLE et al., 2020). Superfícies contaminadas podem levar a disseminação de microrganismos patogênicos e deteriorantes por todo o processo de produção, e como consequência pode acarretar na contaminação do produto final (SUDAGIDAN et al., 2021, KWOK et al., 2021).

Figura 1: Esquema ilustrativo de formação de biofilme multiespécies (Adaptado de Rickard et al.; 2003; Boari et al.; 2009)



2.1.2 Biofilmes de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em indústrias de alimentos

A ocorrência de microrganismos patogênicos e deteriorantes no ambiente de processamento de alimentos é um problema mundial e que merece atenção (MAZAHARI et al., 2021; ROSSI, et al., 2018; MERINO et al., 2019). No intuito de realizar o controle adequado desses patógenos, a indústria faz uso de programas de autocontrole baseado em análises de risco, com o objetivo de mensurar a probabilidade de ocorrência do patógeno visando um protocolo com medidas de ação de forma rápida e eficaz, no controle microbiológico (FARBER et al., 2021). No entanto, grande parte dos programas de autocontrole possui foco em células planctônicas, desconhecendo as características de células sésseis (MOTA et al., 2021).

L. monocytogenes possui características metabólicas que facilitam sua sobrevivência em condições de estresse bacteriano como, baixa atividade de água, elevadas concentrações de sal e oscilações de temperatura (BUCHANAN et al., 2017), o que garante a sua sobrevivência em distintas superfícies, podendo ser disseminada na indústria alimentos. *S. Typhimurium* por sua vez possui

características intrínsecas como síntese de celulose, flagelos e fímbrias que são importantes para o processo de adesão e persistência na superfície (WANG et al., 2016). *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista e um importante microrganismo deteriorante de distribuição ambiental que pode estar presente em ambientes de processamento de alimentos (ROSSI, et al., 2018). A ocorrência de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em ambientes de processamento de alimentos resulta de falhas ocasionadas durante o processo de higienização, sanitização industrial, e na execução dos programas de autocontrole (BUCHANAN et al., 2017; GUŁA et al., 2019). Processo ineficaz ou ausente de higienização e sanitização podem acarretar no desenvolvimento de tolerância dos microrganismos aos protocolos e sanitizantes empregados, fazendo com que essas células permaneçam na superfície através da adesão e formação de biofilmes bacterianos (DE FILIPPIS et al., 2020).

O controle de biofilmes é a primeira etapa para prevenir a contaminação bacteriana em superfícies de manipulação de alimentos (MERINO et al., 2019). Portanto, compreender a influência dos fatores ambientais, a comunicação celular inter-espécies, função metabólica e regulação de mecanismos genéticos envolvidos nessa estrutura é fundamental para a indústria de alimentos no desenvolvimento de programas adequados e eficazes para uma melhor avaliação de risco (DE FILIPPIS et al., 2020; RÍOS-CASTILLO, RIPOLLES-AVILA, RODRÍGUEZ-JEREZ, 2020). A avaliação dos mecanismos de adesão e formação de biofilmes é comumente realizada de forma *in vitro* com o estudo de uma única espécie (ROY et al., 2021; GU et al., 2021), no entanto esta forma de estudo limita a compreensão de mecanismos de grande importância no processo de formação de biofilmes, como a comunicação celular (LI, ZHAO, 2020).

Vários autores ao avaliar de forma *in vitro* o comportamento interespecies e intra-espécies, relataram a interação entre microrganismos patogênicos e deteriorantes como benéfica para a relação bacteriana, favorecendo sobrevivência dos microrganismos na superfície aderida. Fagerlund et al. (2017) aponta que a interação celular da microbiota acompanhante possui grande importância na manutenção e sobrevivência de microrganismos patogênicos, como *L. monocytogenes*, na indústria de alimentos. Papaioannou et al. (2018) ao avaliar a interação do biofilme formado por *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* sp. sob ação de sanitizantes clorados de forma combinada demonstrou que a aplicação sob o

biofilme individual de *L. monocytogenes* foi eficiente, no entanto, quando aplicado sobre o biofilme associado à *Pseudomonas* sp. o tratamento se mostrou ineficiente, independente ao tempo de uso. *S. Enteritidis* quando associado com *P. fluorescens* também mostrou aumento na tolerância a sanitizantes a base de composto de amônio quaternário (PANG et al., 2020). Heir et al. (2018) relatou os efeitos competitivos do crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes*, demonstrando a inibição do microrganismo patogênico pela microbiota acompanhante, indicando variações de comportamento conforme a microbiota residente. Dessa forma, o estudo de biofilmes multiespécies se faz necessário para um maior esclarecimento sobre os processos de cooperação, competição ou ação independente da microbiota acompanhante (Chen, Zhao, Doyle, 2015; PANG et al., 2020).

2.1.3 Biofilmes de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*: Fatores genotípicos

As características fenotípicas de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* são evidenciadas devido à presença de genes associado a fatores externos ambientais e bioquímicos (PIETA et al., 2014, WANG et al., 2016, GUŁA et al., 2019). Em particular, a presença de reguladores transcricionais como *sigB* e *prfA* no genoma de *L. monocytogenes*, contribui para o equilíbrio celular em alterações de condições externas, assim como a expressão da grande maioria dos genes de virulência, como *inlA*, *inlB*, *plcA*, *mpl* e *actA* (SCORTTI et al., 2007; LIU et al., 2019; MAGGIO et al., 2021). Outra atribuição do gene *prfA* a capacidade de regular genes que podem estar envolvidos na formação de biofilme juntamente com o locus *agr*, um gene regulador acessório e altamente conservado (AUTRET, et al. 2003; PIETA et al., 2014). Vazquez-Armenta et al. (2020) demonstraram que a repressão do gene *prfA* interferiu no processo de adesão de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável. No entanto, Gandra et al. (2019) demonstrou que a expressão do gene *prfA* independe da capacidade de formação do biofilme do isolado avaliado, mas pode sofrer influência de fatores ambientais como temperatura de incubação.

O locus *agr* presente em *L. monocytogenes* foi proposto como um sistema constituído por quatro genes principais (*agrABCD*) co-transcritos em um operon que ao ser ativado, é responsável pela regulação de genes necessários para a formação do biofilme bacteriano (RIEDEL et al., 2009). A presença do gene *agrA* está

relacionado ao processo de invasão, adesão celular e auto-indução do sistema de QS, tendo interferência principalmente nas etapas iniciais da formação do biofilme (RIEU et al., 2007; RIEDEL et al., 2009), e na regulação de outros genes de virulência, transporte de oxigênio e aminoácidos juntamente com *agrC* (GARMYN et al., 2012). O gene *agrB* participa da síntese de proteínas de membrana importantes para expressão do gene *agrD* (ZETZMANN et al., 2016). Durante o processo de formação do biofilme, *L. monocytogenes* secreta moléculas de sinalização, denominadas auto-indutores (AI), quais são produzidas em baixos níveis durante o crescimento bacteriano e aumentando a concentração ao longo do incremento populacional. Dessa forma, tem início a regulação de expressão de genes alvos dependentes de *Quorum Sensing* (QS) (CZAJKOWSKI e JAFRA, 2009).

S. Typhimurium tem capacidade de formar biofilmes devido a fatores intrínsecos, como produção de celulose, fímbrias, curli e alta produção exopolissacarídeos (WANG et al., 2016). A expressão destas características é um fator de virulência de grande importância, tendo papel fundamental no aumento da motilidade, adesão celular e colonização de superfícies (CHEN et al., 2015). Síntese de celulose e curli são características reguladas por *luxR-csgD*, *csgD* (subunidade *curli* do gene D) estimula a produção de fímbrias através de ativação transcricional do operon *csgBAC*, promove a produção de celulose por meio da transcrição do gene *adrA* e regula expressão de proteínas específicas da matriz (RÖMLING et al., 2000; GERSTEL et al., 2003; GARCIA et al., 2004). White et al. (2006) apontam que as fímbrias agregativas finas, reguladas pelos operons *agfDEFG* e *agfBAC* são responsáveis por auxiliar na sobrevivência e persistência de *Salmonella* em condições hostis, sendo o gene *agfA* responsável por codificar a principal subunidade das fímbrias agf (YOO et al., 2013). Até o presente momento foram descritos três auto-indutores funcionas em bactérias gram-negativas, N-acil-homoserina-lactonas (AHLs) ou também chamadas de auto-indutor 1 (AI-1), furanosil-borato-diester quais tem borato em *Vibrio harveyi*, em outros microrganismos costuma-se mencionar que auto-indutor 2 (AI-2) é derivado da molécula DPD (4,5 – Dihydroxy-2,3-pentanedione) (CHEN et al., 2015; SPERANDIO et al., 2003) e o auto-indutor 3 (AI-3), qual foi descrito em isolados de *Escherichia coli* O157:H7 é um sistema utilizado em bactérias entéricas com o funcionamento semelhante a neurotransmissores (SPERANDIO et al., 2003). *Salmonella* não produz a AHLs, devido à ausência de um gene responsável por codificar para luxI

AHL sintetase. No entanto, possui a proteína SdiA, homóloga de LuxR, qual permite a detecção de sinais produzidos por outras espécies microbianas (DE ALMEIDA, PINTO, VANETTI, 2016), realizando a comunicação celular.

Por sua vez, *P. aeruginosa* possui a capacidade de se adaptar e se desenvolver em diferentes nichos ecológicos devido à extensa rede de genes regulatórios presente em seu genoma (GUŁA et al., 2019). Dentre os produtos excretados por *P. aeruginosa*, alginato é o principal exopolissacarídeo envolvido na etapa de adesão, formação e manutenção do biofilme (GHAFOOR, HAY, REHM, 2011). A síntese de alginato é representada por um *operon alg*, responsável por codificar proteínas que atuam na biossíntese e manutenção da matriz de EPS, o gene *algD* faz parte desse operon, sendo responsável pela proteção e a diminuição da difusão de antimicrobianos através do biofilme (HAY et al., 2010). Assim como descrito anteriormente, *P. aeruginosa* utiliza várias vias de transdução de sinal QS, permitindo que as bactérias se comuniquem entre si, no entanto, são descritas quatro vias distintas para *P. aeruginosa*, denominadas Las, que produz a molécula *N*-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona (3O-C₁₂ - HSL), Rhl que produz a molécula *N*-butiril-L-homoserinalactona (C₄ -HSL), PQS que produz a molécula 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona e IQS que produz a molécula 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído (GUŁA et al., 2019).

Os sistemas de QS são organizados e atuam em efeito “cascata” tendo início com o sistema Las (LEE, ZHANG, 2015). Os sistemas Las e Rhl são ativados com o aumento da densidade durante a fase de crescimento inicial, enquanto os sistemas PQS e IQS são ativados durante o crescimento tardio (SEED, PASSADOR, IGLEWSKI, 1995). A proteína reguladora LasR (3O-C₁₂ - HSL) ligado ao seu auto indutor ativa o gene *lasI* sintase e induz a expressão dos genes *rhII* e *rhIR*, bem como a expressão dos genes *pqsR* e *pqsABCDH* que codificam os sistemas Rhl e PQS (MCKNIGHT, IGLEWSKI, PESCI, 2000). Semelhante ao sistema Las, o complexo RhIR (C₄ -HSL) induz a expressão do gene *rhII* que ativa a segunda linha de auto-indução (LEE, ZHANG, 2015).

2.1.4 Compostos naturais como estratégia de controle em biofilmes microbianos

A utilização de plantas com propriedades medicinais é historicamente conhecida. Os primeiros registros do uso de constituintes fitoquímicos com atividade

biológica datam de 2600 aC sendo registrados por povos egípcios e chineses, onde se tem suas primeiras aplicações de forma popular relatando resultados favoráveis sob seu valor terapêutico (GURIB-FAKIN, 2006).

Óleos essenciais (OE) são substâncias líquidas e oleosas contendo inúmeros compostos de classes químicas distintas, como álcoois, aldeído, éteres, amidas, aminas, ésteres, heterociclicos, cetonas, fenóis e terpenos (DHIFI et al., 2016). Oriundos do metabolismo secundário das plantas são produzidos de forma natural com a função de proteção e para atrair polinizadores, dessa forma podem ser obtidos através de pétalas, folhas, sementes, caules ou raízes (BAKKALI et al., 2008). Atualmente, são conhecidos e utilizados em torno de 3.000 OE, sendo os mais populares lavanda, limão, hortelã-pimenta, citronela, eucalipto, menta, laranja, orégano, sândalo, gengibre e espécies de pimenta (GVR, 2020). A atividade antimicrobiana de OE tem sido estudada e elucidada pela comunidade científica nos últimos anos (MILLEZI et al., 2016; MULANI et al., 2019), avaliando sua ação como uma proposta de minimizar ou ainda, evitar os mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos, antiparasitários, antifúngicos e até mesmo antivirais (BROCHOT et al., 2017; NAZZARO et al., 2017).

Neste contexto, pesquisadores começaram a explorar de forma mais detalhada as atividades antimicrobianas de OE e seus compostos majoritários sob ação anti-biofilme e anti-*quorum sensing* obtendo resultados promissores contra patógenos de origem alimentar e importância clínica (BRASILEIRO et al., 2016; AMRUTHA et al., 2017; FALCÓ et al., 2019, JI et al., 2021; MANGALAGIRI et al., 2021).

2.1.5 Pimenta preta (*Piper nigrum*) e piperina

Pimenta preta (*Piper nigrum*) ou pimenta do reino como é conhecida popularmente é uma espécie perene pertencente à família *Piperaceae*, juntamente com os gêneros *Macropiper*, *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* (MGBEAHURUIKE et al., 2017). O gênero *Piper* possui distintos usos medicinais sendo descritas suas atividades, antimicrobianas, antioxidante e antitumoral (NIKOLIĆ et al., 2015; TAKOOREE et al., 2019). *Piper nigrum* é uma especiaria cultivada em regiões tropicais e nativas da Índia (PISSINATE, 2006), sendo inserida no Brasil durante o século XVII (EMBRAPA, 2004), desde então foi considerada a

especiaria de maior interesse econômico da história (DEANS, 2001). Além de suas características condimentares de valor agregado, pimenta preta tem atraído a atenção da comunidade científica devido a sua composição química, onde estão presentes compostos metabólicos com elevado potencial para o desenvolvimento de fármacos (PERIGO et al., 2016; LI et al., 2020; TOMÁS et al., 2021).

No Brasil, pimenta preta está entre os condimentos mais produzidos e utilizados, sendo sua aplicação realizada como suplemento alimentar, aditivo aromatizante em alimentos (CARNEIRO JUNIOR et al., 2017; BABU et al., 2018) e recentemente é avaliado quanto a sua aplicação contra patógenos de origem alimentar através de nanoemulsões e nanocápsulas na indústria de alimentos (AMRUTHA et al., 2017; WALMIKI, RAI, 2017; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2020; KANNIAH et al., 2021). O OEP está entre os fitoquímicos mais utilizados pela indústria farmacêutica, no entanto sua composição química pode sofrer alterações devido a uma variedade de fatores, como origem ambiental, manipulação, ponto e processo de extração (PERIGO et al., 2016), o que torna sua reprodução sintética um ponto crítico quando idealizada sua utilização em larga escala. Dessa forma, crescem os estudos envolvendo os compostos metabólicos de pimenta preta, tendo destaque para amidas, amidas alcaloides e bisamidas (SHITYAKOV et al., 2019; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2020).

Poucos estudos avaliaram a atividade do OEP como um interferente de atividade antibiofilme. Jardak et al. (2021) avaliou a associação do OE de pimenta preta a OE de cominho (*Cuminumcuminum*), OE de açafrão da terra (*Curcuma longa*) e OE de canela (*Cinnamomumverum*) apresentou um importante efeito contra a formação de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*. Walmiki, Rai (2017) relataram em seu estudo a ineficácia do OE de pimenta preta sobre biofilmes formados por bactérias patogênicas. No entanto, estudo realizado por Tan, Yin, Chan (2013), avaliando *P. aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* e *Chromobacterium violaceum* CV026 foi observado que o extrato de pimenta preta possui capacidade anti-QS em *P. aeruginosa*, atividade de grande importância na formação do biofilme bacteriano.

Piperina (1-piperoiliperidina) é descrito como o princípio ativo alcaloide majoritário de pimenta preta (SHITYAKOV et al., 2019), sendo responsável pelo sabor pungente característico, podendo ser biotrasformado em ácido piperico e piperidina. Assim como em pimenta preta, piperina demonstra efeito anti-

inflamatório, analgésico, antioxidante, antitumoral, antifúngico e antibacteriano (ZARAI et al., 2013; MICKYMARAY et al., 2019). Avaliando sua ação antimicrobiana, Aldaly, (2010) demonstrou que piperina possui boa atividade contra microrganismos gram-positivos, gram-negativos e leveduras. Até o presente momento poucos estudos avaliaram a atividade anti-biofilme de piperina, sendo essas avaliações relatadas contra *Streptococcus mutans* e *Chromobacterium violaceum* e *S. Typhimurium*, como um bom interferente antibacteriano impedindo o processo de adesão a superfície (DWIVEDI, SINGH, 2016; TOKAM KUATÉ, BISSO NDEZO, DZOYEM, 2021).

2.1.6 Gengibre (*Zingiber officinale*) e 6-gingerol

Gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta perene originária da Ásia e amplamente utilizada devido ao seu sabor pungente (DIVAKAR et al., 2016; SRINIVASAN, 2017). As utilizações dos rizomas de gengibre datam de mais de 2500 anos e desde então é estudada a aplicabilidade de seus compostos químicos de forma terapêutica e aromática na indústria farmacêutica, assim como sua aplicação como potencial conservante na indústria de alimentos (NOORI et al., 2018; ĆIRIĆ et al., 2019). O potencial antibacteriano de gengibre foi elucidado em estudos anteriores, tendo boa atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em dosagens avaliadas como não citotóxicas a humanos (SIVASOTHY et al., 2011; BELLIK et al., 2014). Desta forma, nos últimos anos o aproveitamento biotecnológico do extrato, OE e componentes ativos de gengibre vêm ganhando maior atenção, tendo relatos de sua aplicação no preparo de filmes ativos, revestimento comestível e sanitizantes naturais (NOORI et al., 2018, FARIA et al., 2021). Através da caracterização química de rizomas frescos foi possível avaliar os principais componentes químicos presentes, sendo classificado como uma excelente fonte de componentes fenólicos bioativos, como gingeróis, paradols, shogaols e zingerones (YOUSFI et al., 2021). O OEGB é composto principalmente por α -zingibereno, canfeno, ar-curcumeno e β -sesquifelandrene, tendo variação em suas concentrações conforme o método de extração e origem dos rizomas (JAYASUNDARA et al., 2021; OSAE et al., 2021).

Devido a sua atividade antimicrobiana, muitos autores buscaram avaliar sua atividade como um agente antibiofilme contra patógenos de importância clínica e de

origem alimentar. O OEGB reduziu de forma efetiva a formação do biofilme *P. aeruginosa*, com resultados de erradicação na faixa de 68,13% a 84,86% (CHAKOTIYA et al., 2017). Em outro estudo realizado por Soowannayan et al. (2019) extrato de gengibre não demonstrou ação efetiva no crescimento de células planctônicas, no entanto inibiu a formação do biofilme de *Vibrio parahaemolyticus* em um modelo de superfície biótica. Assim como de forma contrária, Mazzarrino et al. (2015) não encontraram atividade antimicrobiana do OEGB sobre células de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

6-gingerol está entre os principais componentes do gengibre seco, sendo descrito como um potente composto bioativo com uma boa ação farmacológica (WANG et al., 2014). Assim como gengibre, 6-gingerol demonstra efeito anti-inflamatório, antitumoral, antioxidante e antibacteriano (HITOMI et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Embora tenha suas funções bioativas comprovadas, poucos estudos avaliaram a atividade antibiofilme de 6-gingerol, no entanto é relatada sua função como principal inibidor de QS. Kim et al. (2015) descreveu em seu estudo como um fito químico com alta capacidade de inibição de QS e fatores de virulência para *P. aeruginosa*, inibindo a formação de biofilme em faixas de 19-53%. Assim como Ham et al. (2019), avaliou o controle do processo de bioincrustação em isolados de *P. aeruginosa*, obtendo bons resultados com a utilização de análogos de 6-gingerol.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a susceptibilidade de biofilme multiespécies composto por isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* frente à ação dos óleos essenciais de pimenta preta (*Piper nigrum*) e gengibre (*Zingiber officinale*), e princípios ativos de piperina e 6-gingerol em superfícies de polipropileno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) dos óleos essenciais e de princípios ativos sobre células planctônicas de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em culturas simples e associadas.

- Avaliar a dinâmica da formação de biofilme multiespécies composto por *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* frente aos OEP e OEGB em superfícies de polipropileno a 10 °C ao longo do tempo.

- Avaliar a distribuição relativa dos microrganismos no biofilme formado com interferência do OEP, OEGB piperina e 6- gingerol.

- Avaliar a capacidade do OEP na eliminação de biofilme multiespécies a 10 °C ao longo do tempo.

- Avaliar interferência de piperina e 6- gingerol na formação de biofilme multiespécies composto por *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °C ao longo do tempo.

- Avaliar a expressão gênica sob interferência de piperina após 24 e 72 horas na formação de biofilme simples e multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*.

Figura 1: Diagrama conceitual da seção de material e métodos da dissertação – Capítulo 1

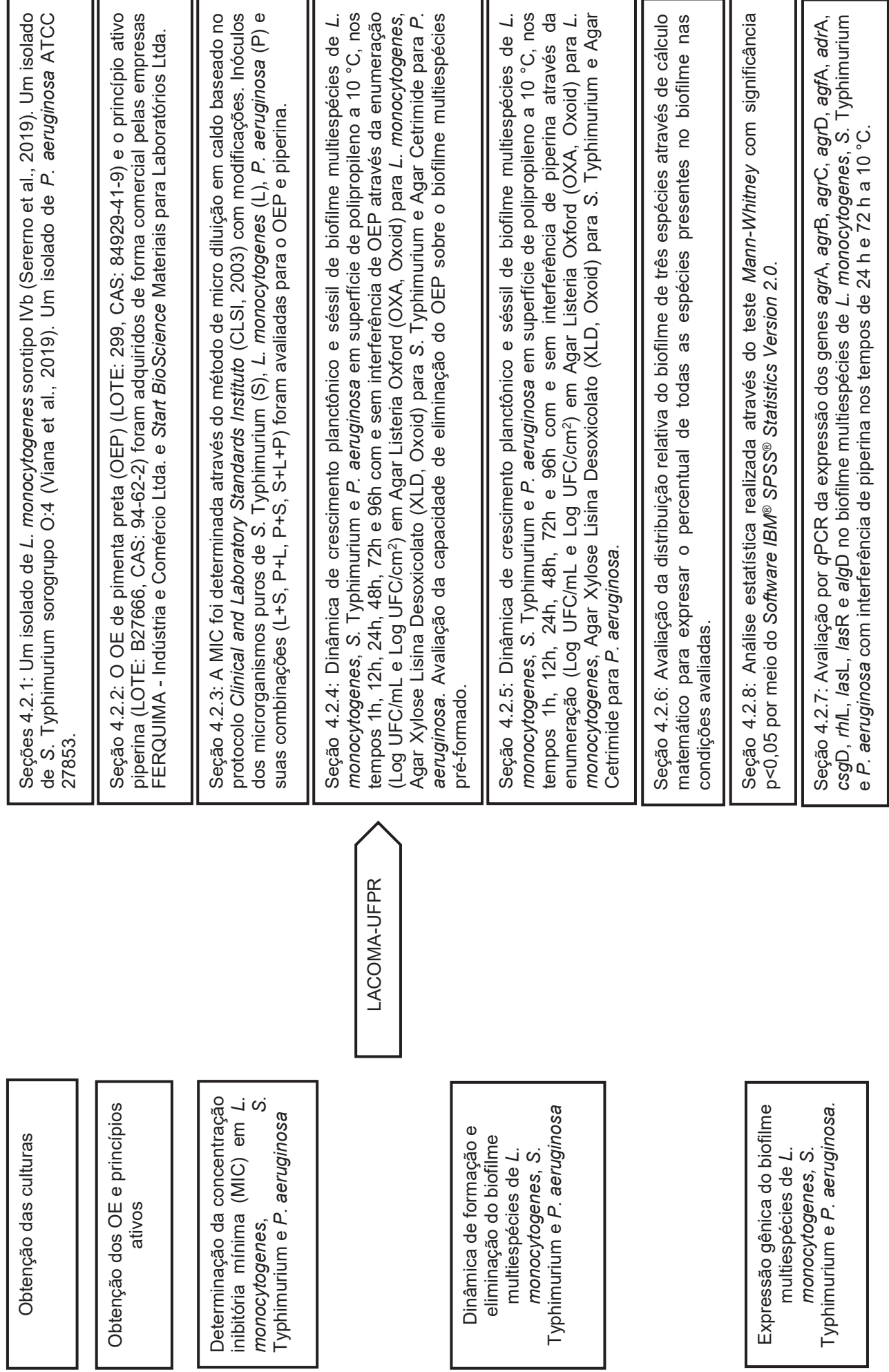
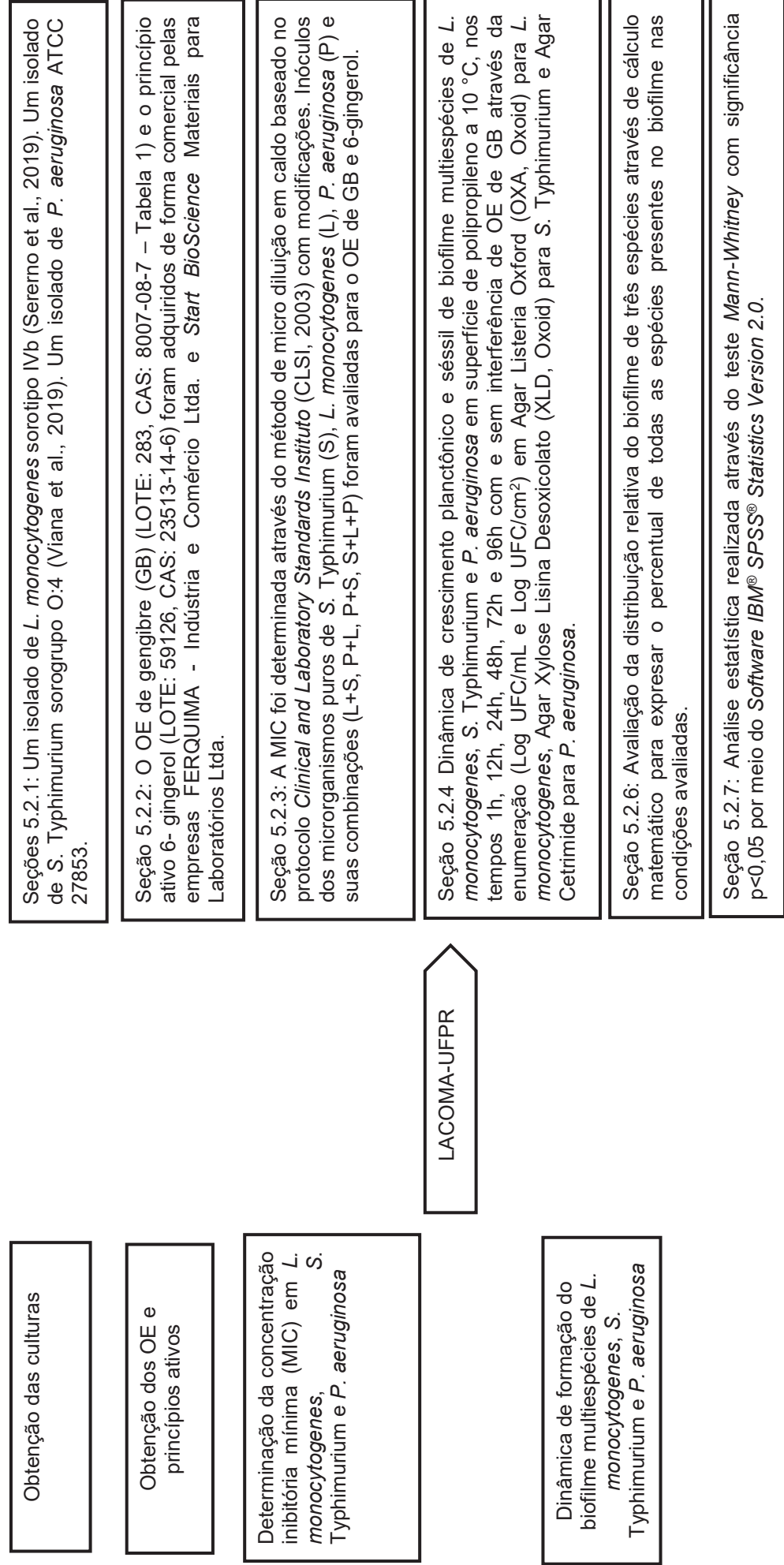


Figura 2: Diagrama conceitual da seção de material e métodos da dissertação – Capítulo 2



4 CAPÍTULO 1: PIPERINA E ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA PRETA INIBEM A FORMAÇÃO DE BIOFILME MULTIESPÉCIES DE *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* E *Pseudomonas aeruginosa*

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do OEP e piperina, assim como, avaliar a interferência de piperina sobre a expressão gênica do biofilme multiespécies composto por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* em superfícies de polipropileno. Os três isolados foram submetidos à avaliação da concentração inibitória mínima do Óleo essencial de pimenta preta (OEP) e piperina através do teste de microdiluição em caldo. Posteriormente foi avaliada a capacidade anti formação de biofilme do OEP (100 mg/mL e 50 mg/mL) e piperina (25 mg/mL e 12,5 mg/mL) junto ao biofilme multiespécies, para o OEP também foi avaliada sua ação sanitizante sobre o biofilme pré-formado. Através da expressão gênica foi avaliada a interferência de piperina (25 mg/mL) sob biofilmes individuais e a associação dos três microrganismos. A associação dos três microrganismos resultou na MIC de 100 mg/ml para o OEP e 25 mg/ml para piperina. No estudo foram obtidas contagens de células sésseis que variaram entre os tempos, com resultados de 5,35 log UFC/cm² a 7,35 log UFC/cm², obtendo o maior crescimento séssil em 72h. A concentração de 100 mg/mL demonstrou melhor ação, na adesão inicial no tempo de 1h, no entanto as duas concentrações avaliadas demonstraram ação anti formação de biofilme em relação ao controle ($p < 0,05$). De forma individual, com o tratamento de 100 mg/mL do OEP, *L. monocytogenes* apresentou as menores contagens em log quando comparados com *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*. Para *S. Typhimurium*, as concentrações testadas obtiveram melhor ação anti formação de biofilme nos maiores tempos de incubação (72 e 96 h). Efeito contrário ocorreu com *P. aeruginosa*, onde a ação do OEP foi observado apenas nas primeiras horas de incubação (1 e 12h), sendo que após esse período obteve-se contagens mais altas do microrganismo com relação ao controle. O percentual de erradicação do biofilme (população total) pré-formado tratado com OEP variou de 78,9% (5,88 log UFC/cm²) a 99,8% (4,16 log UFC/cm²). OEP como agente sanitizante obteve maior eficácia sobre *S. Typhimurium* (99 % a 99,9 %), seguido de *P. aeruginosa* (77,1 % e 99,9 %) e *L. monocytogenes* (86,6 a 99,9%). Biofilme multiespécies *L. monocytogenes* regulou de forma positiva o gene *agrC* nos tempos de 24 e 72 h, e passou a regular de forma positiva os genes *agrD* e *prfA* com 72h de incubação. *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* mantiveram a regulação gênica negativa para todos os genes avaliados nos tempos de avaliação. A aplicação de 25 mg/mL de piperina alterou a regulação de genes não apresentados no biofilme controle. *L. monocytogenes* em cultura associada passou a regular de forma positiva os genes *agrB* (24 h e 72 h), *agrC* (72 h), *agrD* (24 h e 72 h) e *prfA* (24 h). Ao observar a expressão de genes em culturas simples sobre a condição tratada, manteve o comportamento semelhante com o biofilme multiespécies controle, diferindo através do gene *agrD* que é regulado de forma positiva a partir de 24h e o gene *agrC* com regulação negativa. *S. Typhimurium* em cultura mista passou a regular de forma positiva os genes *agfA* (24 h e 72 h), *adrA* (24 h e 72 h), e *csgD* (72 h). De forma individual manteve o mesmo comportamento que em associação, no entanto passa a regular de forma positiva o gene *csgD* no tempo de 24 h. *P. aeruginosa* em cultura mista regulou de forma positiva todos os genes avaliados com 24 h e 72 h de incubação e manteve o

515 mesmo nível de regulação gênica (negativa) independente do tempo avaliado em
516 cultura simples. OEP e piperina demonstraram atividade antimicrobiana e
517 antibiofilme, interferindo no processo de adesão a superfície, na manutenção de
518 biofilmes maduros e na eliminação de biofilmes pré-formados. Apesar da diferença
519 entre as características dos compostos bioativos avaliados, piperina se mostrou mais
520 efetiva no controle de biofilme multiespécies quando comparada ao OEP.
521
522 Palavras-chave: antibiofilme, compostos bioativos, expressão gênica, métodos de
523 controle

4.1 INTRODUÇÃO

A estrutura dos biofilmes é composta por microrganismos aderidos a superfícies e delimitada por uma matriz extracelular responsável por sua proteção e manutenção a qual impede que a remoção das células sésseis ocorra através do processo comum de enxágue (COSTERTON, 1999, GALIÉ et al., 2018). O processo de formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano ocorre através de cinco fases distintas cujo modelo mais aceito é por adsorção, aderência, consolidação, maturação e dispersão celular (COOPER et al., 2014). As células com capacidade de adesão diferem de células livres de acordo com o mecanismo genético envolvido durante o processo da formação do biofilme bacteriano (GUZMÁN-SOTO et al., 2021), com isso, entender o funcionamento deste mecanismo pode auxiliar no diagnóstico e controle de biofilmes microbianos em ambientes de processamento de alimentos.

A interação entre microrganismos residentes em superfícies industriais é um fator que interfere na sobrevivência e manutenção de nichos ecológicos bacterianos (IÑIGUEZ-MORENO et al., 2019; FAGERLUND, LANGSRUD, MØRETRØ, 2020). Estas interações podem fornecer condições de cooperação auxiliando a sobrevivência dos microrganismos (em biofilmes) frente a estresses ambientais, assim como influenciar sua permanência de forma individual nestes ambientes (BRIDIER et al., 2015, PANG et al., 2019). *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium são importantes patógenos em ambientes de manipulação de alimentos (CDC, 2020; BRASIL, 2019; SCOBIE et al., 2019). A cooperação entre estes microrganismos já foi avaliada *in vitro* (GOVAERT et al., 2019, TADIELO, 2020), bem como a interação com microrganismos oportunistas (YAMAKAWA et al., 2018) e não patogênicos (JARA et al., 2019).

Por sua vez, *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo oportunista e na indústria de alimentos está associada à alta capacidade de deterioração em temperatura de refrigeração, tendo influência direta sobre *shelf life* de produtos (RAPOSO et al., 2017). A capacidade de *P. aeruginosa* de formar biofilmes em diferentes tipos de superfícies contribui para a permanência do microrganismo em ambientes industriais, podendo facilitar a persistência de outras espécies patogênicas através da interação bacteriana (YAMAKAWA et al., 2018, CASTRO et al., 2021, DEL MAR CENDRA, TORRENTS, 2021). Assim, o controle de *L.*

monocytogenes, *S. Typhimurium* e *P.aeruginosa* em ambientes de processamento de alimentos requer em evitar a formação dos biofilmes em superfícies utilizadas na indústria de alimentos.

Pimenta preta (*Piper nigrum*) é uma especiaria cultivada em regiões tropicais e amplamente utilizada no Brasil como condimento e conservante alimentar (PERIGO et al., 2016, SALEHI et al., 2019, VIDAL, 2020) e apresenta atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar (AMRUTHA et al., 2017). Estudos demonstram a ação do óleo extraído da pimenta preta quanto sua aplicação antimicrobiana (NIKOLIĆ et al. 2015, AMALRAJ et al., 2020), antifúngica e antioxidante (LI et al., 2020). Piperina é o princípio ativo encontrado na pimenta preta e suas aplicações medicinais são consideradas seguras e eficazes (ZARAI et al., 2013; MICKYMARAY et al., 2019). No entanto, não foram encontrados estudos que descrevem os efeitos inibitórios da piperina em biofilmes multiespécies. Até o presente momento, não são elucidados os mecanismos de ação do óleo essencial de pimenta preta (OEP) como um agente antibiofilme, bem como, a comparação dos diferentes compostos naturais na inibição do biofilme multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*.

Este estudo teve por objetivos avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do OEP e piperina, e avaliar a interferência de piperina sobre a expressão gênica do biofilme multiespécies composto por *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em superfícies de polipropileno.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolados utilizados

Os isolados de *L. monocytogenes* sorotipo IVb (L), *S. Typhimurium* sorogrupo O:4 (S) utilizados no estudo foram obtidos de superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na área de processamento de cortes cárneos (SERENO et al, 2019; VIANA et al., 2019) pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA). O isolado de *P. aeruginosa* (P) utilizado foi uma cultura padrão (ATCC 27853). Os isolados para o presente estudo permaneceram armazenados de forma congelada a

-18 °C em caldo triptona de soja suplementado com 0,6% extrato de levedura (TSB-YE, Oxoid), contendo 20% (v/v) de glicerol.

4.2.2 Obtenção e preparo do OE de pimenta preta e princípio ativo piperina

O OE de pimenta preta (OEP) (LOTE: 299, CAS: 84929-41-9) e o princípio ativo piperina (1-piperilpiperidina - LOTE: B27666, CAS: 94-62-2) foram adquiridos do fabricante FERQUIMA - Indústria e Comércio Ltda. e *Start Biociência* Materiais para Laboratórios Ltda. As concentrações de trabalho foram preparadas previamente a cada repetição do experimento, mantidas a temperatura ambiente e livre de luz. Para evitar mudanças na concentração dos componentes foram utilizados os mesmos lotes durante todo o trabalho experimental. As soluções foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) adicionado de caldo TSB-YE contendo 0,5% de polissorbato 80 (Teen 80®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) em *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*

A MIC foi determinada através do método de micro diluição em caldo baseado no protocolo *Clinical and Laboratory Standards Instituto* (CLSI, 2003) com modificações. Inóculos dos microrganismos puros de *S. Typhimurium* (S), *L. monocytogenes* (L), *P. aeruginosa* (P) e suas combinações (L+S, P+L, P+S, S+L+P) foram preparadas a partir de cultura de 24 h do microrganismo até atingir a escala 0,5 de *Mc Farland*. Em uma placa de 96 poços, 100 µL de caldo muller hinton (MH) suplementado com 0,5% de polissorbato 80 (Tween 80®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado em cada poço da placa. A seguir, 200 µL do OEP e do princípio ativo de piperina foram inoculados separadamente na primeira linha de poços e realizadas diluições seriadas (1:2) de 200, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,57, 0,78 mg/mL. Logo, foi adicionado mais 80 µL de MH para complementar a diluição seriada e 20 µL de inóculo padronizado em $1,0 \times 10^5$ UFC/mL na concentração final em todos os poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h sob agitação orbital de 120 rpm. A leitura foi realizada de forma macroscópica com a presença ou ausência de crescimento bacteriano nos poços. Após as 24h de incubação, os poços

onde não ocorreu multiplicação celular visível, semeou-se 1 µL com auxílio de um *Pin Replicator* para placas de petri contendo ágar MH e incubou-se a 37 °C por 24 h para avaliar o crescimento microbiano. A fim de verificar o crescimento individual nas combinações microbianas os poços foram repicados em ágar específicos, sendo Oxford listeria agar (OXA, Oxoid) para *L. monocytogenes*, Ágar cetrimide (KASVI) para *P. aeruginosa* e Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD, KASVI) para *S. Typhimurium*. A menor concentração do óleo capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano foi considerada a concentração inibitória mínima.

4.2.4 Formação e eliminação de biofilme multiespécies em superfície de polipropileno com ação do OEP

Os isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foram avaliados para a formação e eliminação de biofilme multiespécies em cupons de polipropileno por até 96 h a 10 °C. Sendo adotadas as seguintes condições:

T1: Formação de biofilme multiespécies (C+);

T2: Formação de biofilme multiespécies com presença da ½ MIC do OEP

T3: Formação de biofilme multiespécies com presença da MIC do OEP

T4: Eliminação do biofilme multiespécies (T1) com ação de OEP;

Para avaliar a atividade anti formação de biofilme (T2 e T3) foram elaboradas condições individuais em caldo TSB-YE adicionados de alíquota do OEP na ½ da MIC e MIC obtidas para a cultura combinada dos três microrganismos (item 4.2.3). Previamente aos ensaios de adesão bacteriana os cupons (1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm) de polipropileno (n=90) foram lavados com álcool 70% p/p (70 °INPM) enxaguados três vezes em água destilada e esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C. A partir do subcultivo, 90 mL de TSB-YE suplementado com 1% de extrato de carne foram ajustados a 0,5 na escala de *Mc Farland* de forma individual para *L. monocytogenes* (30 mL), *S. Typhimurium* (30 mL) e *P. aeruginosa* (30 mL), após, uma alíquota de 1,0 mL dos caldos foi utilizada para a confirmação do inóculo inicial. Nestas condições foram preparados quatro frascos contendo solução bacteriana, sendo um frasco utilizado como controle positivo (T1 e T4), um frasco com adição de uma alíquota de ½ MIC de OEP (T2), um frasco com adição de uma alíquota de MIC de OEP (T3) e um frasco controle negativo incubado nas mesmas condições para avaliar a esterelidade do processo. Os frascos foram incubados por até 96h a 10 °C

sob agitação orbital a 120 rpm. As avaliações do crescimento planctônico e sésil foram realizadas em 1, 12, 24, 48, 72 e 96 h de incubação. Para isso foram retiradas em duplicata alíquotas de 0,1 mL do caldo TSB-YE nos diferentes tempos de incubação para a contagem dos microrganismos planctônicos e dois cupons para a contagem dos microrganismos aderidos a superfície (T1, T2 e T3). Para avaliar a capacidade de eliminação do biofilme formado através da ação do OEP foram removidos dois cupons da condição controle e expostos a solução de OE na concentração de 250 mg (T4) por 10 min.

Para realizar a quantificação de células sésseis, seguiu-se metodologia de Reis- teixeira et al. (2019) com modificações, os cupons foram lavados com 10 mL de tampão fosfato salino (PBS), imersos em 1,0 mL de solução PBS suplementada com 1% de Polissorbato 80, as células sésseis foram extraídas através de banho sonificador (40 KHz por 1,5 min, duas vezes) e vórtex (1,5 min, duas vezes). Após esse procedimento, foram realizadas diluições seriadas apropriadas e retiradas alíquotas de 10 µl para quantificação das células sésseis pela técnica de plaqueamento em gota (Herigstad et al., 2001), inoculados em superfície de ágar triptona de soja (TSA, KASVI) para contagem de população total do biofilme, Oxford listeria ágar (OXA, Oxoid) para *L. monocytogenes*, Ágar cetrimide (KASVI) para *P. aeruginosa* e Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD, KASVI) para *S. Typhimurium*. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48h. O estudo foi realizado em duas repetições para cada condição, e os resultados expressos em log UFC/mL e log UFC/cm² para células planctônicas e sésseis, respectivamente e em percentual de redução logarítmica através da fórmula:

$$\% \text{ Erradicação do biofilme} = \frac{(\log_{10} \text{UFC/cm}^2 \text{ (Biofilme controle)}) - \log_{10} \text{UFC/cm}^2 \text{ (Biofilme tratado)}}{\log_{10} \text{UFC/cm}^2 \text{ (Biofilme controle)}} \times 100$$

4.2.5 Formação de biofilme em superfície de polipropileno com interferência de piperina

Os isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foram avaliados sobre a dinâmica de formação de biofilme multiespécies em cupons de polipropileno com a presença do composto de piperina em 1,12, 24, 48, 72 e 96 h a

10 °C. As condições de crescimento, extração dos biofilmes, contagem, expressão dos resultados foram realizadas como descrito no item 4.2.4.

4.2.6 Distribuição relativa (DR) do biofilme de três espécies

Os números totais de células cultiváveis foram enumerados por plaqueamento através de diluição seriada em placas de agares inespecífico e específicos, como descrito no item 4.2.4. A distribuição relativa em biofilme de três espécies foi relatada como o percentual de cada espécie única (A, B e C) presente no biofilme multiespécies (espécie única A + espécie única B + espécie única C) calculados antes (biofilme controle) e após a exposição ao composto avaliado (interferência de piperina e OEP), como segue:

$$DR (\%) = \frac{\log_{10}UFC/cm^2 \text{ (Espécie única A)}}{\log_{10}UFC/cm^2_{\text{total}} \text{ (Espécie única A + Espécie única B + Espécie única C)}} \times 100$$

4.2.7 Avaliação da expressão de genes relacionados à formação de biofilme de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*

Para avaliação genotípica da interferência do composto de piperina sobre a expressão de genes relacionados à formação de biofilme de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foram avaliados os biofilmes simples e multiespécies nos tempos de 24 e 72 h sem interferência e com interferência da MIC (25 mg) de piperina. Diante disso, foram considerados os genes *agrABCD* e *prfA* para *L. monocytogenes*; *agfA*, *adrA* e *csgD* para *S. Typhimurium*; *rhIL*, *lasL*, *lasR* e *algD* para *P. aeruginosa* (Tabela 1). As células sésseis foram remetidas a extração do RNA com utilização do *Trizol*® (VILLA-RODRIGUES et al, 2018; TADIELO, 2020), a quantidade, qualidade e pureza do material extraído foram avaliadas pelos valores das relações 260/280 e 260/230 (BUSTIN et al., 2009) verificadas em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000) e visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O tratamento do RNA total e o processo de transcrição reversa para a construção da fita DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega®) e *GoScript™ Reverse Transcription System*

(Promega®), respectivamente, seguindo instruções do fabricante. Para o controle de extração, reações contendo todos os reagentes do kit, exceto a enzima transcriptase reversa foram utilizadas como controles negativos para determinar contaminações com DNA (RT -). Uma curva de diluições com os cDNA das amostras dos microrganismos individuais (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) foi realizada para verificar a concentração que apresentava a melhor eficiência de reação para utilização dos primers na reação de qPCR.

Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas e triplicatas analíticas com duas repetições em equipamento *Rotor-Gene Q* (Quiagen®), utilizando *GoTaq® Colorless Master Mix* (Promega®), as reações foram realizadas conforme instruções do fabricante em volume final de 20 µl. Como controle positivo da extração, tratamento, síntese do cDNA e normalização de reação foram utilizados os genes endógenos *rlpD1* (*L. monocytogenes*), *16s rRNA* (*S. Typhimurium*) e *16s rRNA* (*P. aeruginosa*). Os resultados foram analisados em *Rotor-Gene Q Series Software* (Quiagen®). Foi utilizado o método do ciclo de limiar comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para analisar a quantidade relativa de expressão gênica (RAO et al., 2013).

Tabela 1: Genes alvo e sequências dos primers utilizados na avaliação da expressão gênica do biofilme multiespécie de isolados de *P.aeruginosa*, *L.monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

Microrganismo	Gene	Sequência5' - 3'	PB	Função	Referência
<i>P. aeruginosa</i>	<i>16s rRNA</i>	GGCTCAACCTGGGAACGTGCA CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGC	137	Endógeno de <i>Pseudomonas</i> sp.	Hendiani et al., 2019
	<i>rhIL</i>	GTAGCGGGTTTGGCGATG CGGCATCAGGTCTTCATCG	101	Sistema QS	Bahari et al., 2017
	<i>lasL</i>	CGCACATCTGGGAACCTCA CGGCACGGATCATCATCT	176	Sistema QS	Bahari et al., 2017
	<i>lasR</i>	CTGTGGATGCTCAAGGACTAC AACTGGTCTTGCCGATGG	133	Sistema QS	Bahari et al., 2017
	<i>algD</i>	AGAAAGTCCGAACGCCACA TCCAGCTCGCGGTAGAT	250	Biossíntese do alginato	Wu et al., 2015
<i>L. monocytogenes</i>	<i>rplD1</i>	GTCCCTTGACGTAGGGATGC GGAACAAACGCTGGCGAAAT	113	Endógeno de <i>Listeria</i> sp	Miranda et al., 2018
	<i>agrA</i>	CGGTACTTGCCTGTATGAA TGAATAGTTGGCGCTGTCTC	149	QS e formação de biofilme	Pieta et al., 2014
	<i>agrB</i>	AGGTACATTTGGAATTATACTGCTCAAC TCTTCACCGATTAAAGGCAAACT-3	81	QS e formação de biofilme	Autret et al., 2003
	<i>agrC</i>	ATTGACAAGATTCGATGGATAGTATAGA CACAAAGTTAACGCCGCTTCA	88	QS e formação de biofilme	Autret et al., 2003
	<i>agrD</i>	AAATCAGTTGGTAAATTCCTTTCTA AATGGACTTTTGGTTCGTATACA	113	QS e formação de biofilme	Rieu et al., 2007
	<i>prfA</i>	GGAAGCTTGGCTCTATTTC ACAGCTGAGCTATGTGCGAT	145	Formação de biofilme e regulador de virulência	Pieta et al., 2014
	<i>16s rRNA</i>	CAGAAGAAGCACCCGGCTAAC GACTCAAGCCTGCCAGTTTC	167	Endógeno de <i>Salmonella</i> sp.	Yang et al., 2014
	<i>agrA</i>	GAAAGTCGTCGCTGGAAGTC TTCCGCTTAATTTAATGGCCG	101	Produção de fimbrias, adesão e formação de biofilme	Latasa et al., 2005
<i>S. Typhimurium</i>	<i>adrA</i>	GAAAGTCGTCGCTGGAAGTC TTCCGCTTAATTTAATGGCCG	92	Produção de celulose	Latasa et al., 2005
	<i>csgD</i>	TCCTGGTCTTCAGTAGCGTAA TATGATGGAAGCGGATAAGAA	168	Produção de biofilme	Barak et al. 2005

4.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para avaliar se houve diferença da ação do OE na dinâmica de formação e eliminação de biofilme multiespécies entre os tempos quando comparados ao controle, e para avaliação da interferência de piperina na dinâmica de formação de biofilme multiespécies, os dados foram submetidos aos testes estatísticos de *Shapiro-Wilk* e *Kolgomorov-Sminorv* para a verificação da normalidade. Após a realização dos testes de normalidade, aplicou-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* para a comparação estatística das médias das contagens dos diferentes tratamentos e tempos. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico *IBM® SPSS® Statistics Version 2.0*, utilizando nível de significância de 0,05

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

No presente estudo observou-se atividade antimicrobiana sobre os microrganismos em forma isolada e em associação (Tabela 2). OEP exibiu maior atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* de forma isolada, no entanto quando associado a *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a interação entre microrganismos levou a necessidade de aumentar a concentração do OEP para obter inibição do crescimento bacteriano. No entanto, quando confirmado o crescimento bacteriano em ágaros específicos, foi possível observar que *L. monocytogenes* não conseguiu se desenvolver na concentração de CIM no consórcio dos três microrganismos (Anexo 1).

772 Tabela 2: Atividade antimicrobiana do OEP e piperina frente *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P.*
 773 *aeruginosa* em culturas individuais e em associação.

Microrganismo	OEP	Piperina
<i>L. monocytogenes</i> (L)	25	12,5
<i>S. Typhimurium</i> (S)	200	12,5
<i>P. aeruginosa</i> (P)	200	25
L+S	50	12,5
L+P	100	12,5
P+S	100	25
L+S+P	100	25

774 .
 775 Para o princípio de piperina foram obtidos resultados mais favoráveis em
 776 relação ao OEP, sendo necessárias concentrações inferiores para inibir o
 777 crescimento bacteriano. No consórcio dos três microrganismos (L+S+P) foi obtida a
 778 CIM de 25 mg/mL (Tabela 2), considerada 4 vezes menor que a MIC do OEP.

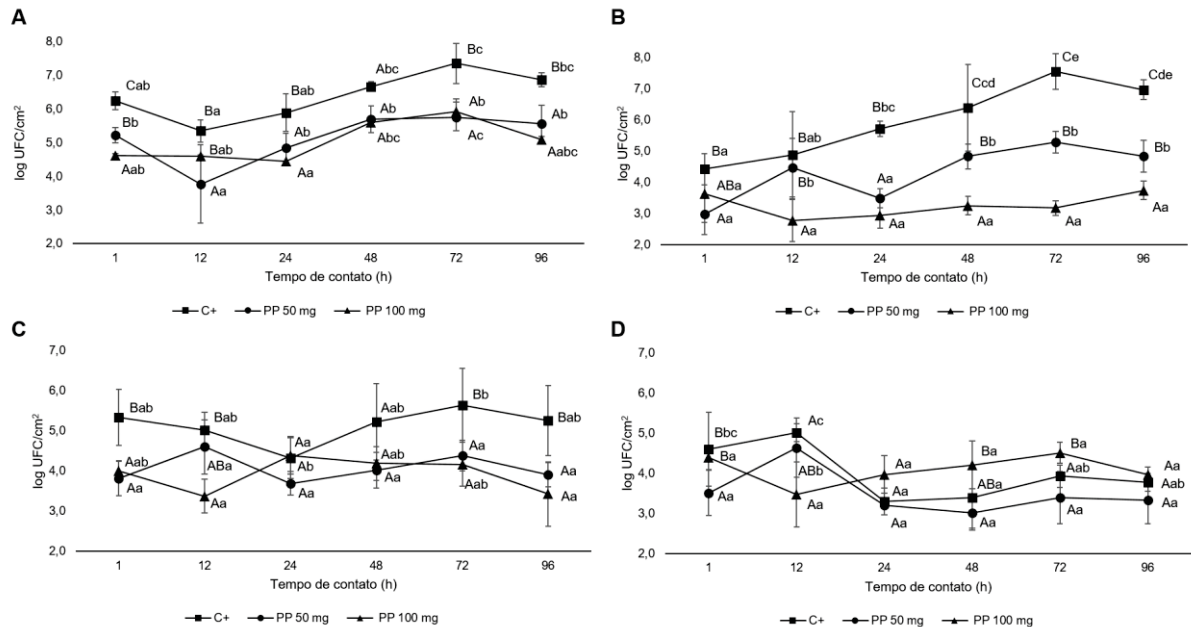
779 780 4.3.2 Atividade do OEP sob o biofilme formado em superfície de polipropileno 781

782 A interferência do OEP pode ser observada na Figura 1A-D. Os resultados
 783 mostraram que o consórcio bacteriano dos três microrganismos para o biofilme
 784 controle (Fig. 1A) avaliado foi capaz de aderir à superfície de polipropileno em 1h a
 785 manter-se por até 96 h, obtendo um maior incremento populacional em 48 e 72 h
 786 (6,66 e 7,35 UFC/cm², respectivamente). Ao avaliar a concentração de OEP, pode-
 787 se observar que a ação do interferente ocorreu dependente da concentração e
 788 tempo avaliado. A concentração de 100 mg/mL demonstrou melhor ação, na adesão
 789 inicial em 1h, contudo, não houve diferença estatística entre as concentrações de
 790 OEP nos demais tempos de avaliação, havendo uma inversão no tempo de 12 h e
 791 posteriormente mantendo o mesmo comportamento. Portanto, as duas
 792 concentrações avaliadas demonstraram ação anti formação de biofilme em relação
 793 ao controle ($p < 0,05$).

794 Ao observar as contagens de células sésseis de forma individual com o
 795 tratamento de 100 mg/mL do OEP, *L. monocytogenes* (Fig. 1B) apresentou as
 796 menores contagens em log quando comparados com *S. Typhimurium* (Fig. 1C) e *P.*
 797 *aeruginosa* (Fig. 1D). Para *S. Typhimurium*, as concentrações testadas obtiveram
 798 melhor ação anti formação de biofilme nos maiores tempos de incubação (72 e 96 h)
 799 (Fig. 1C). Efeito contrário ocorreu com *P. aeruginosa* (Fig. 1D), onde a ação do OEP
 800 foi observado apenas nas primeiras horas de incubação (1 e 12h), sendo que após

esse período obteve-se contagens mais altas do microrganismo com relação ao controle.

Figura 1: Interferência da concentração de 100 mg/ml e 50 mg/ml do OEP na dinâmica de crescimento de biofilme multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °c.

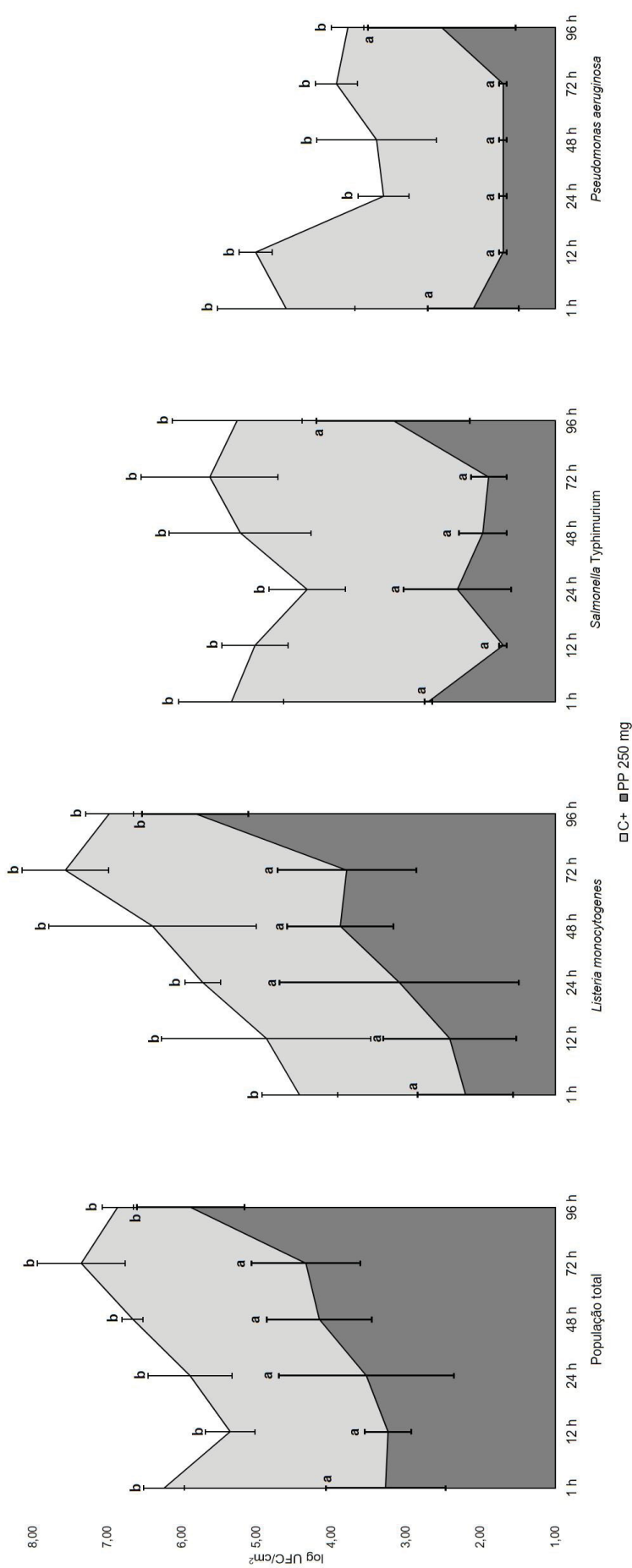


Legenda: Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tempos de incubação ($p < 0,05$), letras maiúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos nos tempos de avaliação. (A) População total, (B) *L. monocytogenes*, (C) *S. Typhimurium*, (D) *P. aeruginosa*.

Com relação ao processo de eliminação do biofilme pré-formado, os resultados podem ser observados na Figura 2. Neste estudo foram obtidas contagens de células sésseis que variaram entre os tempos, com resultados de 5,35 log UFC/cm² a 7,35 log UFC/cm² (ANEXO 2), obtendo o maior crescimento sésil em 72h (Fig. 2A). O percentual de erradicação do biofilme pré-formado pelo consórcio dos três microrganismos (população total) variou de 78,9% (5,88 log UFC/cm²) a 99,8% (4,16 log UFC/cm²), de acordo ao crescimento populacional. O processo de eliminação obteve uma ação distinta ao protocolo empregado na interferência de formação do biofilme, tendo o OEP maior eficácia sobre *S. Typhimurium* com resultados variando de 99 % a 99,9 % em todos os tempos de aplicação, seguido por *P. aeruginosa* com resultados variando de 77,1 % e 99,9 % tendo a melhor ação em 1 h, 12 h e 72 h e *L. monocytogenes* com variação de 86,6 a 99,9% e melhor eficácia em 12 h, 48 h e 72 h. No entanto, devem-se levar em consideração as contagens de células sésseis obtidas de forma individual no biofilme controle

825 (multiespécies), onde *P. aeruginosa* obteve contagens inferiores, expondo um
826 comportamento de competição ambiental (Anexo 2).

Figura 2: Proporção de erradicação do biofilme multiespécie de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* tratado com 250 mg de OEP pelo tempo de 10 min.

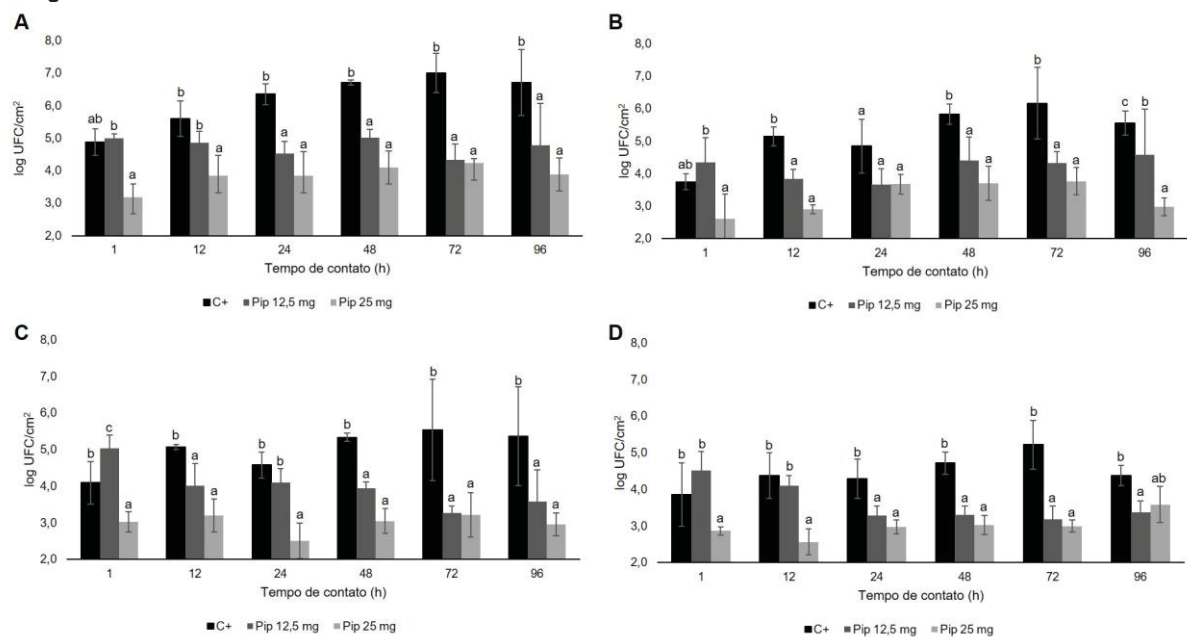


Legenda: Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos com relação ao tempo ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão de dois experimentos realizados em duplicatas biológicas.

4.3.3 Interferência de piperina na formação do biofilme multiespécies

Os efeitos da interferência de diferentes concentrações de piperina no biofilme composto de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* nos diferentes tempos podem ser visualizados na Figura 4. A aplicação do interferente de piperina inibiu a formação do biofilme multiespécies (Fig. 4A) com relação ao controle, tendo sua ação dependente do tempo e não obtendo diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Esse comportamento foi igualmente observado quando as células sésseis em contagens individuais foram avaliadas.

Figura 3: Interferência da concentração de 25 mg/ml (CIM) e 12,5 mg/ml ($1/2$ CIM) de piperina na dinâmica de crescimento de biofilmes multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °C.



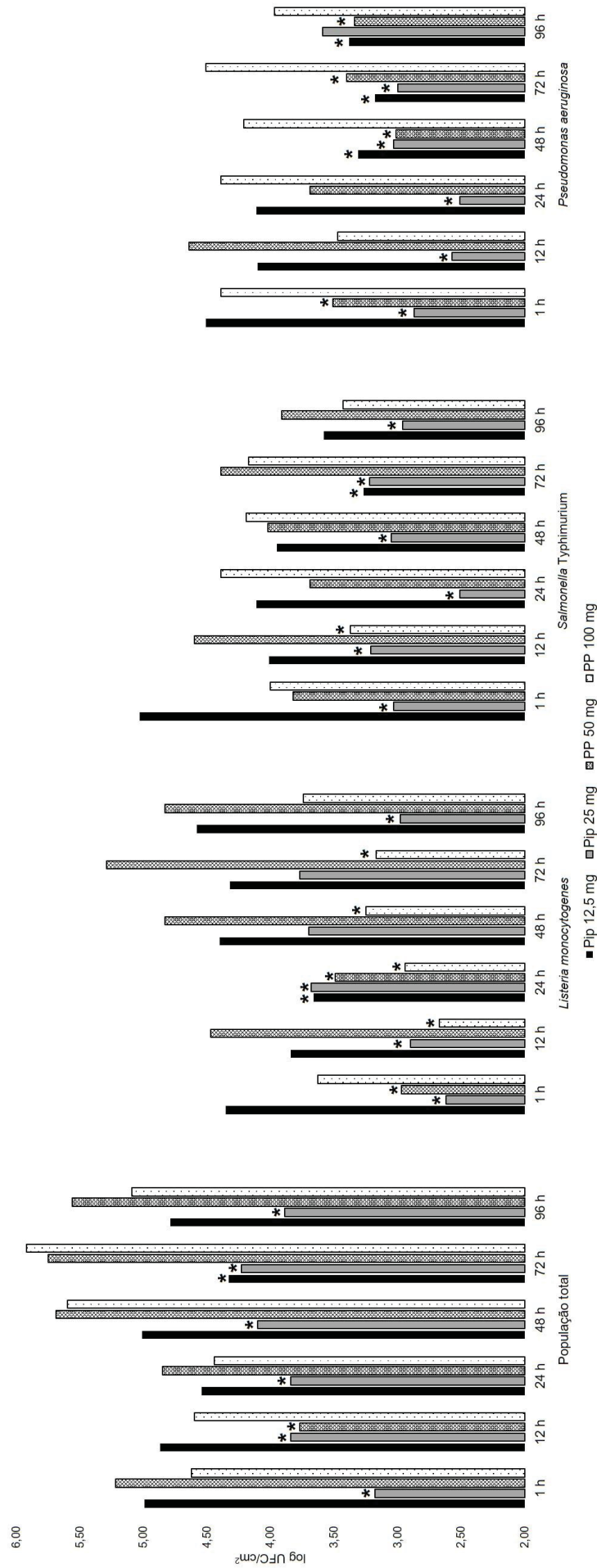
Legenda: Letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos com relação ao tempo de incubação ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão de dois experimentos realizados em duplicatas biológicas. (A) População total, (B) *L. monocytogenes*, (C) *S. Typhimurium*, (D) *P. aeruginosa*

4.3.4 Eficácia comparada do OEP e piperina sobre biofilme multiespécies

Com o intuito de avaliar o melhor tratamento com efeito antibiofilme, os resultados de OEP e piperina foram comparados (Figura 5). Avaliando a população total do biofilme multiespécies é possível observar que a adição de piperina na concentração de CIM (25 mg/mL) obteve as menores contagens de células sésseis

853 quando comparado ao OEP. No entanto, é possível observar o aumento nas
854 contagens de células sésseis após o tempo de 24h, evidenciando um efeito
855 bacteriostático.

Figura 4: Avaliação comparativa de ação entre os tratamentos utilizando piperina e OEP nos diferentes tempos de avaliação.



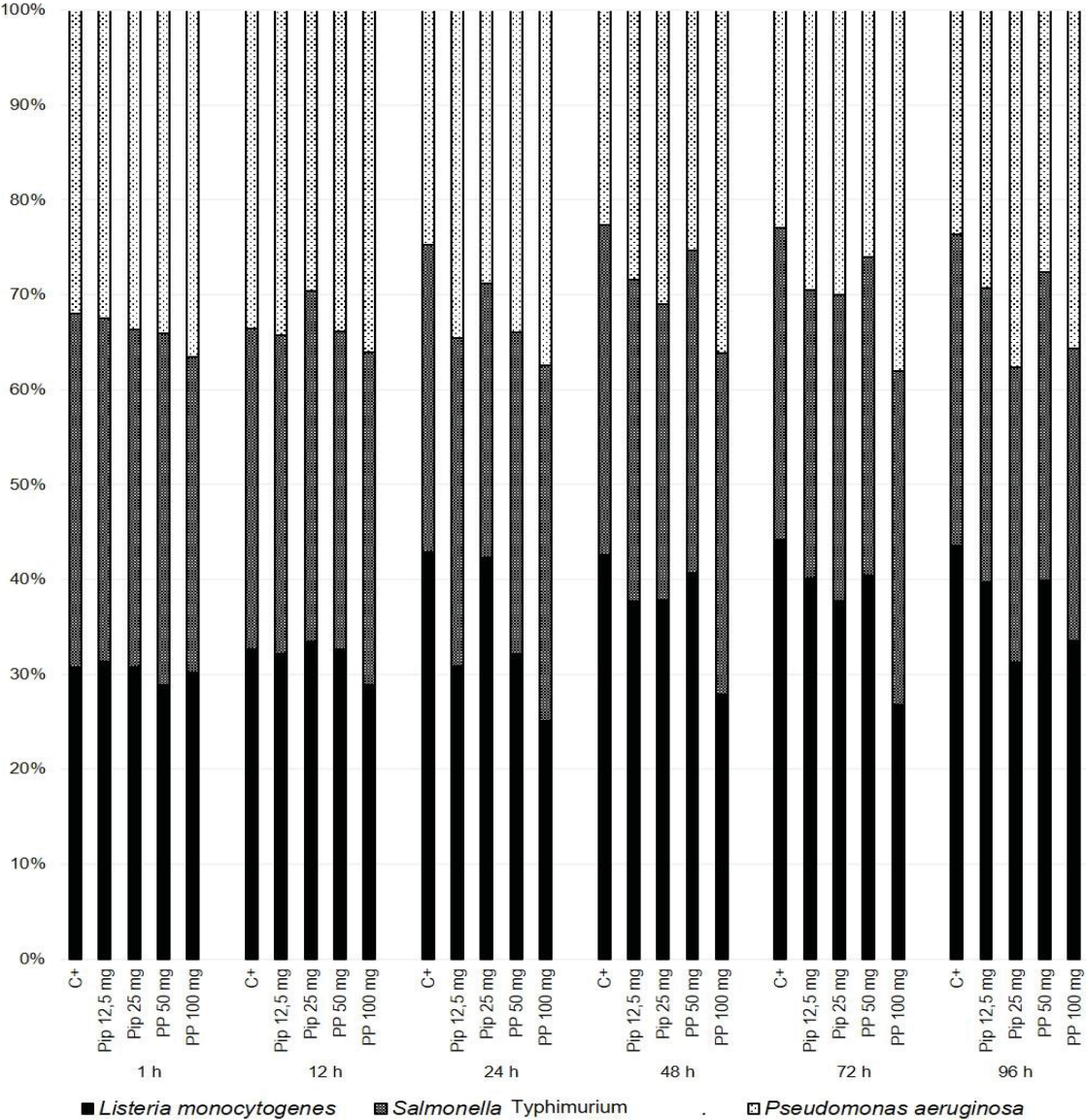
Legenda: *: estimulam diferença estatística (p < 0,05) no tempo de incubação.

856 *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* apresentam comportamento semelhante a
857 quanto à susceptibilidade a piperina quando comparada ao comportamento da
858 população total, sendo mais suscetível a concentração de 25 mg/mL. Este
859 comportamento é visualizado de forma contrária quando são avaliados os resultados
860 de células sésseis individuais de *L. monocytogenes*, onde 100 mg/mL de OEP
861 apresenta as menores contagens nos tempos de 12 a 72 h, demonstrando melhor
862 eficácia quando comparada a piperina, no entanto este comportamento é variável
863 conforme o tempo de incubação.

864 4.3.5 Distribuição relativa (DR) do biofilme de três espécies

865 O consórcio multiespécies com interferência do OEP e piperina foi avaliado
866 através da distribuição relativa da composição microbiana dos biofilmes
867 multiespécies pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC/cm²)
868 para cada população bacteriana em cada momento (Figura 6). Através dessa
869 relação foi possível observar que não houve predominância de uma determinada
870 espécie nas primeiras horas de incubação (1 e 12h), contudo, a partir de 24 h, *L.*
871 *monocytogenes* apresentou as maiores contagens individuais no biofilme controle (>
872 que 40%) assim como, sob interferência de 25 mg/mL de piperina, comportamento
873 que não foi observado quando em contato com o OEP. A partir de 48h, *S.*
874 *Typhimurium* também evidenciou um processo de predominância competindo com *L.*
875 *monocytogenes*. *P. aeruginosa* obtem as menores contagens nos biofilmes com
876 interferência de piperina (ANEXO 3), no entanto demonstra maior crescimento nos
877 biofilmes tratados com o OEP, demonstrando tolerância a concentração avaliada em
878 função da competição bacteriana.

Figura 5: Distribuição relativa da composição microbiana dos biofilmes multiespécies pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC/cm²) para a população bacteriana em cada momento avaliado.



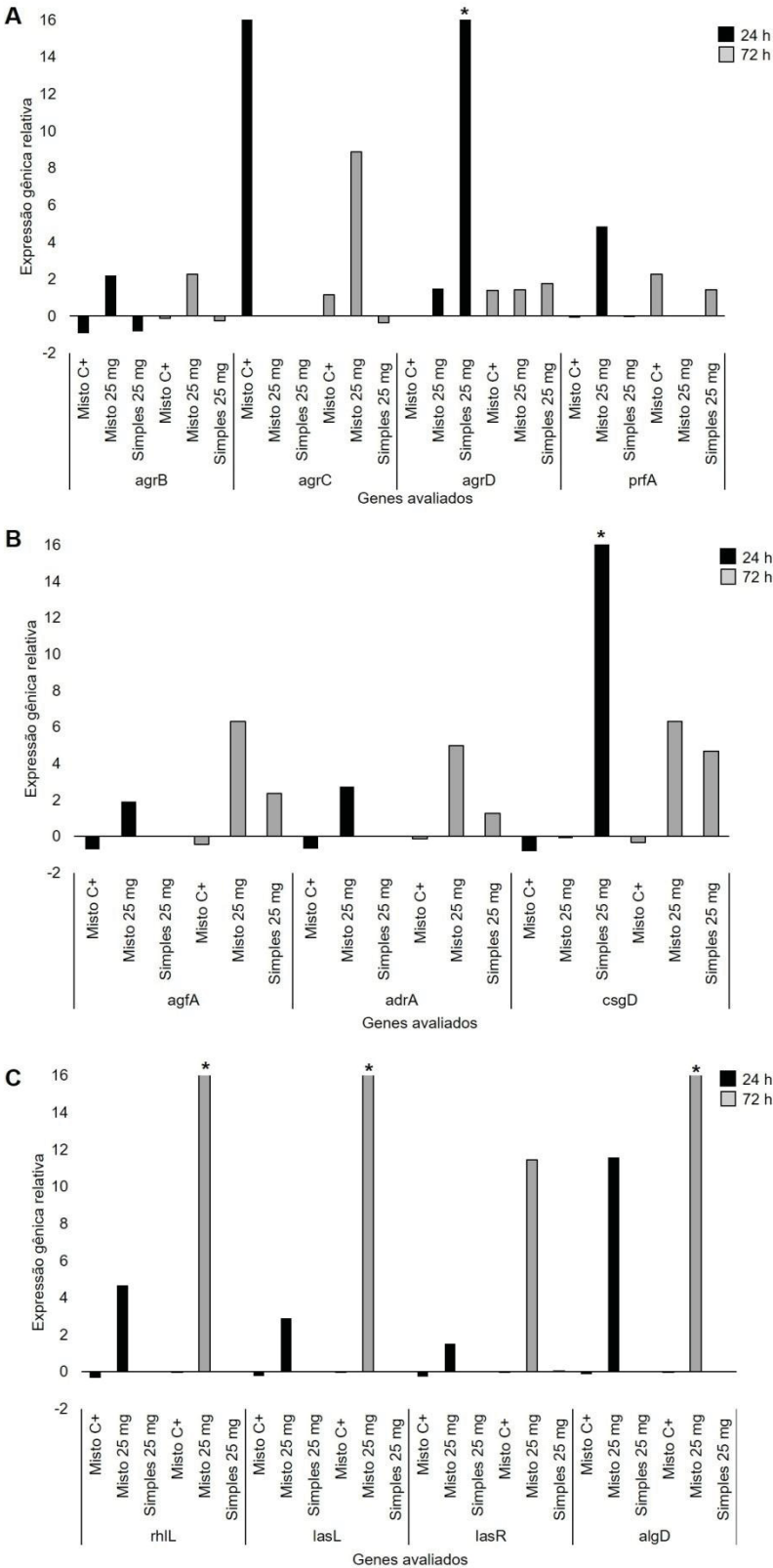
4.3.6 Efeito da piperina na expressão de genes relacionados à formação do biofilme multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*

Foram avaliados de forma qualitativa e quantitativa os genes *agrABCD* e *prfA* para *L. monocytogenes*; *agfA*, *adrA* e *csgD* para *S. Typhimurium*; *rhII*, *lasI*, *lasR* e *algD* para *P. aeruginosa* nos tempos de 24 h e 72 h a 10 °C . Com exceção do gene *agrA* (*L. monocytogenes*), todos os genes estudados apresentaram expressão gênica nos tempos avaliados. Os controles de crescimento foram avaliados através do crescimento em placa para os biofilmes controle e tratado.

No biofilme multiespécies *L. monocytogenes* regulou de forma positiva o gene *agrC* nos tempos de 24 h (19,65 vezes) e 72 h (1,16 vezes), e passou a regular de forma positiva os genes *agrD* (1,38 vezes) e *prfA* (2,27 vezes) com 72 h de *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* mantiveram a regulação gênica negativa para todos os genes avaliados nos tempos de avaliação (Figura 6A-C).

A aplicação de 25mg de piperina no biofilme multiespécies alterou a regulação de genes não apresentados no biofilme controle. *L. monocytogenes* em cultura associada passou a regular de forma positiva os genes *agrB* (24 h e 72 h), *agrC* (72 h), *agrD* (24 h e 72 h) e *prfA* (24 h). Ao observar a expressão de genes em culturas simples sobre a condição tratada, *L. monocytogenes* manteve o comportamento semelhante com o biofilme multiespécies controle, diferindo através do gene *agrD* que é regulado de forma positiva a partir de 24 h de incubação (Figura 6A) e o gene *agrC* com regulação negativa. *S. Typhimurium* em cultura mista passou a regular de forma positiva os genes *agfA* (24 h e 72 h), *adrA* (24 h e 72 h), e *csgD* (72 h), de forma individual mantém o mesmo comportamento que em associação, no entanto passa a regular de forma positiva o gene *csgD* no tempo de 24 h (Figura 6B). *P. aeruginosa* em cultura mista regulou de forma positiva todos os genes avaliados com 24 h e 72 h de incubação e manteve o mesmo nível de regulação gênica (negativa) independente do tempo avaliado em cultura simples (Figura 6C).

935 Figura 6: Expressão gênica relativa dos genes *agrABCD* e *prfA* para *L. monocytogenes*; *agfA*, *adrA* e
936 *csgD* para *S. Typhimurium*; *rhlI*, *lasI*, *lasR* e *algD* para *P. aeruginosa*, normalizada com os genes *rpID*
937 (*L. monocytogenes*), *16s* rRNA (*S. Typhimurium*) e *16s* rRNA (*P. aeruginosa*), para o biofilme
938 multiespécies nos tempos de 24 h e 72 h.



939
940 Legenda: * Resultados acima de 16 foram considerados como infinitas vezes $\pm$ expresso.

4.4 DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram o efeito antibacteriano do OEP contra células de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*, conforme descrito também por Nikolić et al. (2015). No entanto, em nosso estudo foram necessárias concentrações mais elevadas do OEP para inibir o crescimento bacteriano. A melhor ação ocorreu para a inibição de *L. monocytogenes* (25 mg/mL) quando comparada aos demais microrganismos, pois foi necessário uma concentração 8 vezes mais elevada (200 mg/mL). No entanto quando observado o consórcio bacteriano, houve diminuição da concentração da CIM, sendo necessário 100 mg/mL para inibir a combinação de L+S+P. Essa diferença entre os resultados obtidos pode ser atribuída às características dos microrganismos avaliados assim como, a composição química do OEP (BRIDIER et al., 2015; DHIFI et al., 2016). Dhifi et al. (2016) sugere que a atividade do OEP possa ser atribuída à presença dos componentes majoritários, entretanto os principais constituintes do óleo provavelmente não sejam os únicos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Dessa forma, nosso resultado evidencia que o OEP pode atuar como um antimicrobiano natural de amplo espectro e que esta ação pode variar conforme a condição e caracterização química do OE.

Idealizando a utilização de um composto natural com maior possibilidade de replicação sintética (ZARAI et al., 2013), nosso estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana e anti formação de biofilme do princípio ativo de piperina, principal composto extraído da pimenta preta. Estudos anteriores relataram que piperina possui funções biológicas que podem ser utilizadas de forma segura (ZARAI et al., 2013, MICKYMARAY et al., 2019), contudo a avaliação da atividade antimicrobiana foi descrita em poucos estudos avaliando *Streptococcus mutans* (Dwivedi, Singh, 2016), *Chromobacterium violaceum* (VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2020) e *S. Typhimurium* (TOKAM KUATÉ, BISSO NDEZO, DZOYEM, 2021) onde as concentrações de MIC obtidas foram 0,33 mg/mL, 30 mg/mL e 0,512 mg/mL, respectivamente. Estes resultados corroboram com as concentrações encontradas em nosso estudo, onde a maior ação antimicrobiana ocorreu sobre *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* (12,5 mg/mL), onde *P. aeruginosa* apresentou CIM 2 vezes mais elevada (25 mg/mL) com relação aos microrganismos citados. Um dado importante é que a associação entre os microrganismos L+S e L+P não elevou a concentração de CIM (12,5 mg/mL), no entanto quando realizada a associação de

P+S e L+S+P, a adição de *P. aeruginosa* ao consórcio bacteriano resultou em um aumento na concentração da CIM, resultado que difere do comportamento bacteriano quando avaliado frente ao OEP. Dessa forma, se faz necessário o entendimento da interação bacteriana frente a condições de desafio, visto que os microrganismos presentes no consórcio bacteriano possuem influência sobre o crescimento da população como um todo.

Neste estudo avaliamos a capacidade de formação de biofilme em um consórcio formado por três espécies. Através da cinética de formação do biofilme, foi possível observar de forma fenotípica a interação bacteriana com incremento populacional ao longo do tempo, sendo as maiores contagens em 72 h, seguidas de uma queda em 96 h mesmo sobre temperatura de 10°C. Esses resultados correspondem às etapas descritas sobre o processo de formação do biofilme (COOPER et al., 2014), podendo ser o decréscimo populacional após 96 h resultado de uma condição de competição ambiental. Através do cálculo de DR é possível visualizar a distribuição das espécies ao longo do tempo de incubação bem como sob interferência de piperina e OEP. Foi possível observar um comportamento de dominância de *L. monocytogenes* sobre as demais espécies dentro do consórcio bacteriano, situação oposta ao que ocorre com *P. aeruginosa*, que demonstra um decréscimo populacional ao longo do tempo. Em estudo realizado por Yamakawa, Tomita, Sawai (2018), com condições de temperatura semelhante ao nosso observase um comportamento distinto, onde o crescimento de *P. aeruginosa* sobressaiu à população de *L. monocytogenes* aumentando também sua tolerância a nisina.

Observamos que piperina e OEP podem inibir a formação e interferir na manutenção do biofilme multiespécies. Em nosso estudo o OEP obteve um bom resultado sobre a inibição do biofilme multiespécies, realizando a redução de até 98,4% em 96 h, sendo este resultado proporcional ao tempo de tratamento e à concentração utilizada. Resultados que diferem de Walmiki, Rai (2017) que relataram em seu estudo o OEP como sendo um composto ineficaz sobre biofilmes formados por bactérias patogênicas. É importante salientar que a ação independente da concentração pode ser explicada pela interferência metabólica ocorrida no biofilme multiespécies, visto que o processo de adesão e crescimento sofre interferência, havendo uma diminuição no tempo de crescimento das células sésseis, sem realizar erradicação total das células.

Avaliando o efeito de eliminação do biofilme multiespécies pré-formado o OEP obteve uma eficácia de até 99,8% com aplicação de 250mg/mL, demonstrando capacidade de erradicação do biofilme multiespécies. Esse comportamento também é visualizado com relação às contagens de células sésseis individuais. Um comportamento de cooperação celular que é possível visualizar é com relação a *L. monocytogenes*, qual apresentou a menor CIM comparada aos demais microrganismos, no entanto quando em associação com *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* apresentou as maiores contagens de células sésseis e a maior tolerância ao OEP. Pode-se sugerir a importância da microbiota acompanhante em função da sobrevivência de microrganismos mais suscetíveis a condições ambientais críticas, podendo esse comportamento ser atribuído a condição de produção de matriz de EPS de espessura e composição distinta por cada microrganismo (WAHEED et al., 2021), aumentando a barreira de proteção. Outro aspecto importante é o tempo de ação utilizado em nosso estudo, os resultados de erradicação foram obtidos através da aplicação da solução de OEP no tempo de 10 minutos, visto que o tempo de aplicação e ação é um requisito importante a ser considerado na escolha de um produto antibacteriano (VIDÁCS et al., 2018). Até o presente momento, não foram encontrados estudos avaliando esta atividade para o OEP. Uma condição importante é quanto à concentração de uso do OEP. A utilização de compostos naturais é indicada e considerada segura (GRAS) (FDA, 2021), no entanto cabe ressaltar as características aromáticas desses compostos. OEP possui um aroma pungente e amadeirado que pode permanecer sobre a superfície quando aplicado em sua forma convencional. Para amenizar as características aromáticas e melhorar a eficácia do produto com concentrações menores, sugere-se a aplicação em forma de emulsão, encapsulada ou em nanopartículas com liberação controlada de produto (VIDÁCS et al., 2018; PATHANIA et al., 2021), condições que favorecem a manutenção das características bioativas, minimizando os riscos residuais.

Em nosso estudo foi possível avaliar a capacidade dos tratamentos em inibir a adesão celular (1 h e 12 h) em 97,9 e 98% com uma concentração de 25 mg/mL (CIM) para piperina, assim como a interferência na manutenção do biofilme multiespécies ao longo do tempo. Tomam Kuait et al. (2021) avaliou a atividade anti-biofilme de piperina sobre sorotipos de *S. Entérica*, mostrou que o princípio ativo em conjunto a antibióticos aminoglicosídeos resultou em 43,3% de inibição da formação de biofilme e 40% de erradicação do biofilme pré formado, indicando a utilização de

piperina como um bom coadjuvante de ação antimicrobiana. Esses resultados corroboram com o percentual de inibição encontrado em nosso estudo, onde as contagens individuais de células sésseis obtidas para *S. Typhimurium* resultaram na redução do processo de adesão de 93,8 % até 99,6% em 96h de incubação. Piperina possui um caráter insolúvel em água (ZARAI et al., 2013), dessa forma sua aplicação em ambientes industriais como alternativa de controle microbiológico pode ser considerada, visto sua favorável ação antimicrobiana e antibiofilme. No entanto é necessária a avaliação de suas vias de aplicação de modo a tornar o produto mais estável e mantendo suas características de ação antimicrobiana e antibiofilme.

Através da avaliação de genes importantes no processo de adesão, QS e manutenção da estrutura do biofilme para os três microrganismos compondo o biofilme multiespécies, foi possível observar que o tratamento com piperina (25mg) resultou em alterações transcricionais relevantes para a manutenção do biofilme multiespécies. É de importância avaliar a não expressão do gene *agrA* em todas as condições avaliadas o que difere dos resultados obtidos por Gandra et al. (2019), onde ao avaliar a condição de tempo e temperatura de incubação de isolados de *L. monocytogenes* formadoras de biofilme tiveram elevadas transcrições de *agrA*. De forma comum foi observada a transcrição positiva dos genes *agrC*, *agrD* e *prfA* em *L. monocytogenes* em cultura mista com alteração ao longo do tempo, demonstrando a influência dos microrganismos em relação ao seu crescimento na população total, comportamento que também pode ser observado através do cálculo de DR. *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* expressaram todos os genes avaliados na condição mista e individual, no entanto não tiveram alterações na transcrição dos genes avaliados em cultura mista com relação a cultura simples, estes resultados podem ser atribuídos pela influência quanto ao meio e condição de crescimento, evidenciando que o mecanismo de formação de biofilme está associado com o ambiente de crescimento das células.

Ao avaliar a condição mista e individual sobre interferência de piperina foi possível observar a alteração da regulação gênica nos três microrganismos avaliados. *L. monocytogenes* demonstrou comportamento específico conforme condições avaliadas, no entanto genes de importância como *prfA*, *agrD* e *agrB* foram regulados de forma positiva, esse comportamento pode ser considerado um mecanismo de defesa contra os efeitos do tratamento com piperina nas membranas celulares bacterianas (RIEU et al., 2007, RIEU et al., 2008). Outro aspecto a ser

observado é a regulação negativa do gene *agrC* nas condições avaliadas, a regulação de *agrC* em conjunto a *agrA* é responsável por desencadear sinal de transdução e iniciar a regulação de genes responsáveis pela formação de biofilme (RIEDEL et al., 2009). Neste caso, desregulações no locus *agr* pode resultar em alterações no sistema QS interferindo no processo e manutenção da estrutura do biofilme sobre o tratamento avaliado.

No caso de *S. Typhimurium*, *csgD* mostrou regulação positiva nas condições do tratamento avaliado em condição mista e individual, assim como encontrado em nosso estudo, O'Leary et al., (2015) observou que *S. Typhimurium* quando exposta a estresse ácido resultou em um aumento nos níveis de expressão do gene *csgD*. No entanto ao observar as contagens em log/UFC de células sésseis observaram-se contagens inferiores com relação ao controle, o que demonstra que outros fatores são importantes para a formação e manutenção do biofilme, visto que a regulação positiva ocorreu no tempo tardio de 72h, outro aspecto é ressaltar que *csgD* é importante na etapa de maturação do biofilme e dispensável na etapa de adesão celular (GRANTCHAROVA et al., 2010), o que justifica sua expressão tardia. A expressão dos genes *adrA* e *agfA* ocorreu apenas na condição tratada individual e mista, esse comportamento pode ter ocorrido devido a fatores de estresse condicionado as células, como temperatura, competição ambiental e o tratamento aplicado, dessa forma a regulação positiva destes genes sobre estas condições pode ser atribuída a busca pela neutralização da ação da molécula de piperina sobre as células, esta conclusão também é relatada por outros autores (ARTEAGA et al., 2019, PANG et al., 2020).

P. aeruginosa tratada com piperina na condição mista regulou positivamente todos os genes avaliados, no entanto quando avaliado na condição individual refletiu um comportamento inverso, regulando de forma negativa todos os genes avaliados. Este comportamento foi visualizado sobre a contagem de log/UFC onde na condição individual de *P. aeruginosa* obteve um melhor crescimento com relação à condição mista. Nossos resultados diferem de achados na literatura, onde o emprego de produtos naturais como OE e compostos ativos resultaram na regulação negativa dos genes relacionados ao sistema de QS (YIN et al., 2022). Ainda nesses resultados foi possível observar a maior expressão dos genes *rhII*, *lasR* e *lasI* no tempo de 72 h mesmo com contagens de log/UFC inferiores, este comportamento pode ser associado a melhor ação da piperina de forma imediata e nos tempos

1110 iniciais de adesão e formação de biofilme, no entanto também concorda com os
1111 resultados fenotípicos onde se pode observar um prejuízo na eficácia de piperina ao
1112 longo do tempo de incubação, onde as células restantes demonstram capacidade de
1113 metabolizar o tratamento e com uma provável permanência viável na superfície
1114 avaliada.

1115 Os resultados da transcrição observados neste estudo mostram que a
1116 concentração de CIM de piperina causa alterações no perfil de transcrição de genes
1117 responsáveis pelo sistema QS e biofilme de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P.*
1118 *aeruginosa*, no entanto sua melhor ação é demonstrada nos tempos iniciais de
1119 avaliação demonstrando interferência na adesão celular a superfície. A ação
1120 diminuída de piperina ao longo do tempo não deve ser atribuída a um processo
1121 ineficaz e sim a forma aplicada e avaliada neste estudo.

1122 Autores afirmam que o uso de OE é mais eficaz quando comparado a um
1123 princípio isolado, levando em consideração a atividade sinérgica dos compostos
1124 majoritários (DHIFI et al., 2016; VIDÁCS et al., 2018). Em nosso estudo quando
1125 compara as atividades antibiofilmes de piperina e OEP em duas concentrações (CIM
1126 e ½ CIM) foi possível observar a melhor ação de piperina como agente antibiofilme.
1127 A diferença de ação entre os compostos (OEP X piperina) pode ser explicada
1128 através de seus mecanismos de ação e características de volatilidade. Dessa forma
1129 o OEP pode ser menos eficaz devido sua maior volatilidade, essa característica
1130 pode comprometer os maiores tempos de incubação resultando em uma menor
1131 eficácia antimicrobiana.

1132 Avaliando aspectos físico-químicos de estabilidade, padronização de uso e
1133 atividade biológica, piperina poderia ser escolhida como o melhor fito composto para
1134 utilização em escala industrial, devido a sua menor concentração de ação quando
1135 comparada ao OEP, maior estabilidade em condições ambientais, facilidade na
1136 obtenção, caracterização e possível padronização de uso laboratorial com menor
1137 variabilidade da composição química quando comparado ao OEP (ZARAI et al.,
1138 2013; DHIFI et al., 2016). No entanto, mais avaliações físico-químicas seriam
1139 necessárias para concluir sua estabilidade e atividade em longo prazo, bem como as
1140 melhores formas de aplicação sobre as superfícies de manipulação de alimentos,
1141 minimizando os efeitos residuais que possam ocasionar alterações sensoriais em
1142 produtos.

1143

4.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, piperina e OEP demonstraram atividade antimicrobiana e antibiofilme, interferindo no processo de adesão a superfície e na manutenção de biofilmes maduros. Bem como, o OEP apresentou resultados favoráveis na eliminação de biofilme multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* pré-formado em superfície de polipropileno. Piperina se mostrou mais efetiva na inibição da formação do biofilme e com maior possibilidade de utilização independentemente da concentração. Apesar da diferença entre as características dos compostos bioativos avaliados, piperina e OEP podem ser avaliados como possíveis agentes químicos de origem natural para a utilização em superfícies de ambientes de manipulação de alimentos. No entanto, faz-se necessária a realização de testes complementares a fim de avaliar a melhor forma de aplicação destes compostos bioativos.

5 CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE E 6-GINGEROL SOBRE BIOFILME MULTIESPÉCIES DE *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* E *Pseudomonas aeruginosa*

O estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial (OE) de gengibre (GB) e 6-gingerol em biofilme multiespécies formado por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de polipropileno. Os três isolados foram submetidos à avaliação da concentração inibitória mínima do Óleo essencial (OE) de gengibre (GB) e 6-gingerol através do teste de microdiluição em caldo. Posteriormente foi avaliada a capacidade anti formação de biofilme do OEGB (100 mg/mL e 50 mg/mL) e 6-gingerol (1,25 mg/mL) junto ao biofilme multiespécies. A associação dos três microrganismos resultou na CIM de 100 mg/ml para o OEGB e 1,25 mg/ml para 6-gingerol. No estudo foram obtidas contagens de células sésseis que variaram entre os tempos, com resultados de 5,35 log UFC/cm² a 7,35 log UFC/cm², obtendo o maior crescimento sésseis em 72h. Com relação à população total foi verificada a interferência do OEGB, independente da concentração, em relação ao controle no tempo de 1h (redução de 87,1% e 98,9%). Na contagem das células sésseis individuais foi possível observar que a melhor etapa de ação do composto foi entre 1 h e 24 h de incubação. As contagens de células sésseis em superfície de polipropileno para todos os isolados quando expostos a 1,25 mg/mL de 6-gingerol por até 96 h não diferiu ($p > 0,05$) do tratamento controle. O OEGB nas duas concentrações demonstrou maior efetividade quando comparado com a concentração de 1,25 mg/mL de 6-gingerol. Na comparação entre os tratamentos, observa-se um aumento gradual na proporção de *L. monocytogenes* ao longo do tempo no consórcio bacteriano sem interferência dos tratamentos, tendo um aumento de 2,5 log UFC/cm² na biomassa, com as contagens variando de 4,42 a 6,97 log UFC/cm² durante 96 h de incubação. Com o tratamento de 100 mg/ml do OE de GB foi possível observar um comportamento inverso, onde foi observado o crescimento de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium* em detrimento a população de *L. monocytogenes*, com o maior incremento populacional no tempo de 96 h, chegando a 4,3, 4,16 e 2,82 UFC/cm. O OEGB apresentou atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* e atuou como inibidor da formação de biofilme, por sua vez, 6-gingerol foi considerado um possível agente antimicrobiano, no entanto sem eficácia como agente anti formação de biofilme.

Palavras-chave: antibiofilme, antibacteriano, métodos de controle, óleos essenciais

5.1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* possuem capacidade de se aderir e formar biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de alimentos (ZIECH et al., 2016, MORADALI et al., 2017, SERENO et al., 2019). Durante o processo de formação do biofilme os microrganismos secretam matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos, que originam um ecossistema responsável por conferir proteção e manutenção celular em ambientes hostis (COSTERTON, 1999, FAGERLUND et al., 2020). Devido esta barreira, é possível observar o aumento da tolerância às concentrações usuais de biocidas e antibióticos, originando uma contaminação bacteriana persistente no ambiente de produção, com potencial risco à saúde pública (ZIECH et al., 2016).

O uso inadequado de biocidas comerciais tem sido incriminado quanto aos seus efeitos negativos sobre o meio ambiente, acúmulo residual no sistema de produção, redução da eficácia e desenvolvimento de co-resistência em microrganismos patogênicos (CANTON e RUIZ-GARBAJOSA, 2011, ALONSO-CALLEJA et al., 2015, PAUL et al., 2019). Dessa forma, nos últimos anos a comunidade científica tem demonstrado maior interesse pela aplicação de compostos naturais, como óleos essenciais de plantas e seus princípios ativos no âmbito industrial (BRUSOTTI et al., 2014, IMANE et al., 2020), devido as suas características bactericidas e biodegradáveis (NOORI et al., 2018, ABDULLAHI et al., 2020, MANE et al., 2021), com grande apelo ambiental e com menor toxicidade (CHHETRI et al., 2019).

Óleos essenciais (OE) de gengibre (GB) (*Zingiber officinale*) são substâncias líquidas, oleosas e aromáticas extraídas de raízes que possuem potencial antiinflamatório (EZZAT et al., 2018), antioxidante (YOUSFI et al., 2021), antimicrobiano (NOORI et al., 2018) e antifúngico (YAMAMOTO-RIBEIRO et al., 2013). Estes compostos naturais possuem ação sob a integridade da membrana celular de microrganismos, interferindo na síntese de proteínas e sinalizadores microbiológicos como inibidores da atividade de *quorum sensing* (QS) (KUMAR et al., 2014, ÍIRIĆ et al., 2019, MICKYMARAY et al., 2019). Foi descrita a atividade antimicrobiana de compostos não voláteis de gengibre como 6-gingerol como eficazes contra micobactérias (BHASKAR et al., 2020), patógenos multiressistentes

(OYEDEMI et al., 2019) e um fitoquímico com alta capacidade de inibição de QS e fatores de virulência para *P. aeruginosa* (KIM et al., 2015). No entanto, não possui relato até o presente momento sobre sua atividade sobre células sésseis em biofilmes multiespécies. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antimicrobiana e antibiofilme do OEGB e 6-gingerol em biofilme multiespécies formado por *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em superfície de polipropileno.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Isolados utilizados

Os isolados de *L. monocytogenes* sorotipo IVb (L), *S. Typhimurium* sorogrupo O:4 (S) utilizados no estudo foram obtidos de superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na área de processamento de cortes cárneos (SERENO et al, 2019; VIANA et al., 2019) pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA). O isolado de *P. aeruginosa* (P) utilizado foi uma cultura padrão (ATCC 27853). Os isolados para o presente estudo permaneceram armazenados de forma congelada a -18 °C em caldo triptona de soja suplementado com 0,6% extrato de levedura (TSB-YE, Oxoid), contendo 20% (v/v) de glicerol.

5.2.2 Obtenção e preparo do OE de gengibre (GB) e princípio ativo 6-gingerol

O OE de gengibre (GB) (LOTE: 283, CAS: 8007-08-7 – Tabela 1) e o princípio ativo 6- gingerol (LOTE: 59126, CAS: 23513-14-6) foram adquiridos de forma comercial pelas empresas FERQUIMA - Indústria e Comércio Ltda. e *Start BioScience* Materiais para Laboratórios Ltda. A composição do OEGB foi disponibilizada pela empresa FERQUIMA - Indústria e Comércio Ltda. através de laudo técnico. As concentrações de trabalho foram preparadas previamente a cada repetição do experimento, mantidas a temperatura ambiente e livre de luz. Para evitar mudanças na concentração dos componentes foram utilizados os mesmos lotes durante todo o trabalho experimental. As soluções foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) adicionado de caldo

1286 TSB-YE contendo 0,5% de polissorbato 80 (Tween 80®, Sigma-Aldrich, St. Louis,
1287 MO, EUA).

1288 Quadro 1: composição do OEGB contendo os principais compostos majoritários.

Nº	Principais componentes do óleo essencial de Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)*	
	Composto químico	Composição (%)
1	α- Zingiberene	33
2	β- Sesquifelandrene	13
3	α- Curcumene	8
4	β- Bisabolene	6
5	Camphene	6
6	α- Pinene	2

Legenda: * Extração realizada através de destilação a vapor da raiz.

1289
1290
1291

1292 5.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *L. monocytogenes*,
1293 *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*

1294

1295 A CIM foi determinada através do método de microdiluição em caldo
1296 baseado no protocolo CLSI (2020) com modificações. Inóculos dos microrganismos
1297 puros (S, L e P) e em combinação (L+S, P+L, P+S, S+L+P) foram preparados a
1298 partir de uma cultura de recente de 24 h do microrganismo até atingir a escala 0,5 de
1299 *Mc Farland*. Em uma placa de 96 poços, 100 µL de caldo muller hinton (MH)
1300 suplementado com 0,5% de polissorbato 80 (Tween 80 - Vetec®) foi adicionado em
1301 cada poço da placa. A seguir, 200 µL do OEGB e do princípio ativo 6-Gingerol foram
1302 inoculados separadamente na primeira linha de poços e realizadas diluições
1303 seriadas (1:2) de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 mg/mL, para o OEGB
1304 e 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 e 0,15 mg/mL para 6-gingerol. Logo, foi adicionado
1305 mais 80 µL de caldo MH para complementar a diluição e 20 µL do inóculo, com
1306 concentração final de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24
1307 h sob agitação orbital de 120 rpm. A leitura foi realizada de forma macroscópica com
1308 a presença ou ausência visível do crescimento bacteriano, e para confirmação foi
1309 inoculado 1 µL da solução teste com auxílio de *Pin Replicator* em placas de Petri
1310 contendo ágar MH com posterior leitura após incubação a 37 °C por 24 h. Como
1311 controle positivo da ação antimicrobiana foi utilizado antibiótico de uso padrão,
1312 sendo gentamicina para *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* e ampicilina para *P.*

aeruginosa. Como controle positivo de inóculo, foi utilizado caldo MH contendo DMSO suplementado com 0,5% de polissorbato 80 sem a adição da solução teste, para o controle negativo do processo foram incubados poços com caldo MH contendo DMSO e suplementado com 0,5% de polissorbato 80 sem adição de inóculo. A menor concentração do óleo capaz de inibir completamente o crescimento microbiano foi considerada a CIM.

5.2.4 Formação de biofilme em superfície de polipropileno com interferência de OEGB

Os isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foram submetidos à formação de biofilme multiespécies em cupons de polipropileno por até 96 h a 10 °C, sendo adotadas as seguintes condições:

T1: Formação de biofilme multiespécies (C+);

T2: Formação de biofilme multiespécies com ½ CIM de OEGB;

T3: Formação de biofilme multiespécies com CIM de OEGB.

Para avaliar a atividade anti formação de biofilme foram elaboradas condições individuais para cada tratamento. Previamente aos ensaios de adesão bacteriana os cupons (1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm) de polipropileno (n=90) foram lavados com álcool 70% p/p (70 °INPM), enxaguados três vezes em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. A partir do subcultivo, 90 mL de TSB-YE suplementado com 1% de extrato de carne foram ajustados a 0,5 na escala de Mc Farland de forma individual para *L. monocytogenes* (30 mL), *S. Typhimurium* (30 mL) e *P. aeruginosa* (30 mL), após, uma alíquota de 1,0 mL dos caldos foi utilizada para a confirmação do inóculo inicial. Nestas condições foram preparados quatro frascos contendo solução microbiana, sendo um utilizado como controle positivo (T1), e os demais receberam a adição de alíquotas OEGB na concentração da ½ da CIM (T2), CIM (T3) e um frasco controle negativo incubado nas mesmas condições para avaliar a esterilidade do processo. Os frascos foram mantidos a 10 °C sob agitação orbital a 120 rpm, e realizadas avaliações do crescimento planctônico e sésil em 1, 12, 24, 48, 72 e 96 h de incubação. Alíquotas de 1,0 mL do caldo TSB-YE de cada tratamento nos diferentes tempos de incubação foram retiradas em duplicata para a contagem dos microrganismos planctônicos e dois cupons para a contagem dos microrganismos sésseis.

Para realizar a quantificação de células sésseis, seguiu-se metodologia de Reis- teixeira et al. (2019) com modificações, os cupons foram lavados com 10 mL de tampão fosfato salino (PBS), imersos em 1,0 mL de solução PBS suplementada com 1% de polissorbato 80, as células sésseis foram extraídas através de banho sonificador (40 KHz por 1,5 min, duas vezes) e vórtex (1,5 min, duas vezes). Após esse procedimento, foram realizadas diluições seriadas apropriadas e retiradas alíquotas de 10 µl para quantificação das células sésseis pela técnica de plaqueamento em gota (HERIGSTAD et al., 2001), inoculados em superfície de Ágar triptona de soja (TSA, KASVI) para contagem de população total do biofilme, Oxford listeria ágar (OXA, Oxoid) para *L. monocytogenes*, Ágar cetrímide (KASVI) para *P. aeruginosa* e Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD, KASVI) para *S. Typhimurium*. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48h. O estudo foi realizado em duas repetições para cada condição, e os resultados expressos em log UFC/mL e log UFC/cm² para células planctônicas e sésseis, respectivamente e em percentual de redução logarítmica através da fórmula:

$$\% \text{ Erradicação do biofilme} = \frac{(\log_{10} \text{UFC/cm}^2 (\text{Biofilme controle}) - \log_{10} \text{UFC/cm}^2 (\text{Biofilme tratado}))}{\log_{10} \text{UFC/cm}^2 (\text{Biofilme controle})} \times 100$$

5.2.5 Formação de biofilme em superfície de polipropileno com interferência de 6-gingerol

Os isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foram avaliados sobre a dinâmica de formação de biofilme multiespécies em cupons de polipropileno com a presença de 6- gingerol em 1, 12, 24, 48, 72 e 96 h a 10 °C. As condições de crescimento, extração dos biofilmes, contagem, expressão dos resultados foram realizadas como descrito no item 5.2.4.

5.2.6 Distribuição relativa (DR) de biofilmes de três espécies

Os números totais de células cultiváveis foram enumerados por plaqueamento através de diluição seriada em placas de ágar inespecíficos e específicos, como descrito no item 5.2.4. A distribuição relativa em biofilmes de três espécies foi obtida através do percentual de cada espécie única (A, B e C) na

combinação multiespécies (espécie única A + espécie única B + espécie única C) calculados antes (biofilme controle) e após a exposição ao composto avaliado sob interferência do OEGB e 6-gingerol, como segue:

$$DR (\%) = \frac{\log_{10}UFC/cm^2 \text{ (Espécie única A)}}{\log_{10}UFC/cm^2_{\text{total}} \text{ (Espécie única A + Espécie única B + Espécie única C)}} \times 100$$

5.2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para avaliar se houve diferença de ação do OEGB e 6- gingerol na dinâmica de formação de biofilmes multiespécies entre os tempos quando comparados ao controle, os dados foram submetidos aos testes estatísticos de *Shapiro-Wilk* e *Kolgomorov-Sminorv* para a verificação da normalidade. Após a realização dos testes de normalidade, aplicou-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* para a comparação estatística das médias das contagens dos diferentes tratamentos e tempos. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico *IBM® SPSS® Statistics Version 2.0*, utilizando nível de significância de 0,05.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Atividade antimicrobiana do OEGB e 6-gingerol

Os compostos foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana *in vitro* antes de avaliar sua eficácia anti formação de biofilme. Os resultados da avaliação da sensibilidade ao OEGB e 6-gingerol estão descritos na Tabela 1. O princípio ativo 6-gingerol apresentou as menores concentrações necessárias para inibir o crescimento microbiano quando comparado com o OEGB, (tendo sido *L. monocytogenes* a mais sensível). Quando avaliada a ação do 6-gingerol sob *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e nos microrganismos em associação não se obteve diferença nos valores de CIM (1,25 mg/ml).

1411 Tabela 1: Atividade antimicrobiana do OEGB e 6- gingerol frente a *L. monocytogenes*, *S.*
 1412 *Typhimurium* e *P. aeruginosa* em culturas individuais e em associação.
 1413

Microrganismo	MIC (mg/mL)	
	OEGB	6-Gingerol
<i>L. monocytogenes</i> (L)	25	0,62
<i>S. Typhimurium</i> (S)	200	1,25
<i>P. aeruginosa</i> (P)	100	1,25
L+S	50	1,25
L+P	100	1,25
P+S	200	1,25
L+S+P	100	1,25

1414

1415 Quando expostos ao OEGB foi possível observar que a interação microbiana
 1416 levou a respostas distintas da CIM em comparação aos valores obtidos para as
 1417 culturas individuais. Assim como para 6-gingerol o OEGB obteve a melhor ação sob
 1418 *L. monocytogenes* do que para os demais microrganismos. A CIM encontrada variou
 1419 entre os compostos, sendo observada a necessidade de concentrações mais
 1420 elevadas de OEGB para a inibição do crescimento bacteriano.

1421

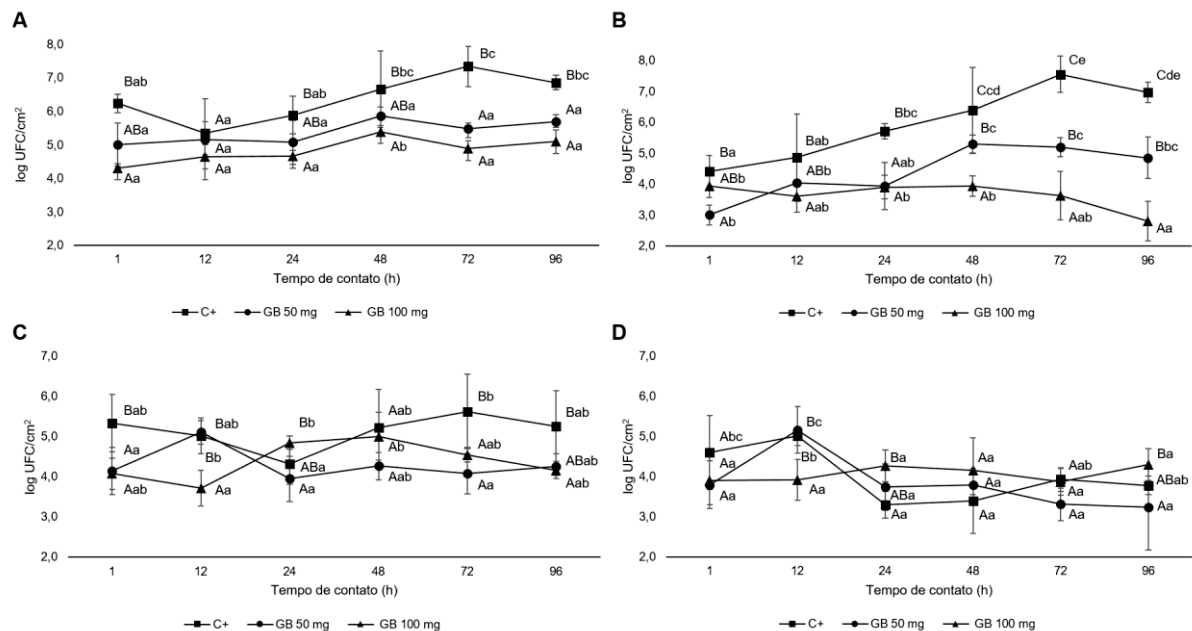
1422 5.3.2 Efeito do OEGB e 6- gingerol na formação de biofilme multiespécies em
 1423 superfície de polipropileno

1424

1425 Os efeitos do OEGB e 6-gingerol na formação do biofilme multiespécies
 1426 foram avaliados utilizando duas concentrações de OEGB (50 e 100 mg/mL) e uma
 1427 concentração de 6-gingerol (1,25 mg/mL). As concentrações testadas não
 1428 diminuíram as contagens de células planctônicas dos isolados avaliados (ANEXO 1).
 1429 Na Figura 1 observa-se o comportamento da população de células sésseis sem
 1430 interferência (T1), com a adição de concentração de $\frac{1}{2}$ CIM (T2) e CIM (T3) do
 1431 OEGB durante os tempos de incubação.

1432

Figura 1: Interferência de 50 mg ($1/2$ CIM) e 100 mg (CIM) de OEGB na dinâmica de crescimento sésil de biofilmes multiespécies de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a 10 °C.



Letras minúsculas diferentes entre os tempos de incubação (1 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h) indicam diferença estatística ($p < 0,05$), letras maiúsculas diferentes indicar diferença estatística entre os tratamentos no tempo de incubação.

(A) população total, (B) *L. monocytogenes*, (C) *S. Typhimurium*, (D) *P. aeruginosa*

Foram avaliadas as contagens individuais de cada microrganismo dentro do biofilme multiespécies, sendo o processo de adesão dependente das condições avaliadas (espécie/tempo). Foi possível observar que ocorreu um rápido aumento no número de células aderidas nas primeiras 48 h de incubação na população total, comportamento semelhante foi visualizado para *L. monocytogenes* (Fig1. B). *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* (Fig1. CD).

Foi possível observar maior crescimento sésil da população total do biofilme controle em 72 h (Fig1. A), a exposição de $1/2$ CIM do OEGB não interferiu no crescimento sésil entre os tempos de incubação, no entanto houve uma diminuição de 99,1 % com relação ao controle. Quando exposto a concentração de CIM do OEGB obteve-se uma diminuição de 99,8 % nas células sésseis com relação ao controle.

A ação dos tratamentos com relação ao tempo também pode ser observada na Figura 1. As diferentes concentrações do OEGB inibem a adesão celular em relação ao controle, no entanto, mantém um comportamento constante do crescimento celular, demonstrando atividade bacteriostática.

A ação das concentrações do OEGB foi observada nos tempos de avaliação, em relação à população total (Fig. 1A) foi verificada a interferência do OEGB,

independentemente da concentração, na adesão inicial em relação ao controle no tempo de 1h (redução de 87,1% e 98,9%), demonstrando um efeito de choque na adesão inicial. Na contagem das células sésseis individuais foi possível observar que a melhor etapa de ação do composto foi entre 1 h e 24 h de incubação, atribuída pelas menores contagens de células sésseis em relação ao biofilme controle.

A ação antibiofilme de 6-gingerol é observada na Tabela 2, onde foi possível observar que, de forma geral, não houve ação significativa ($p > 0,05$) do composto sobre as células sésseis avaliadas.

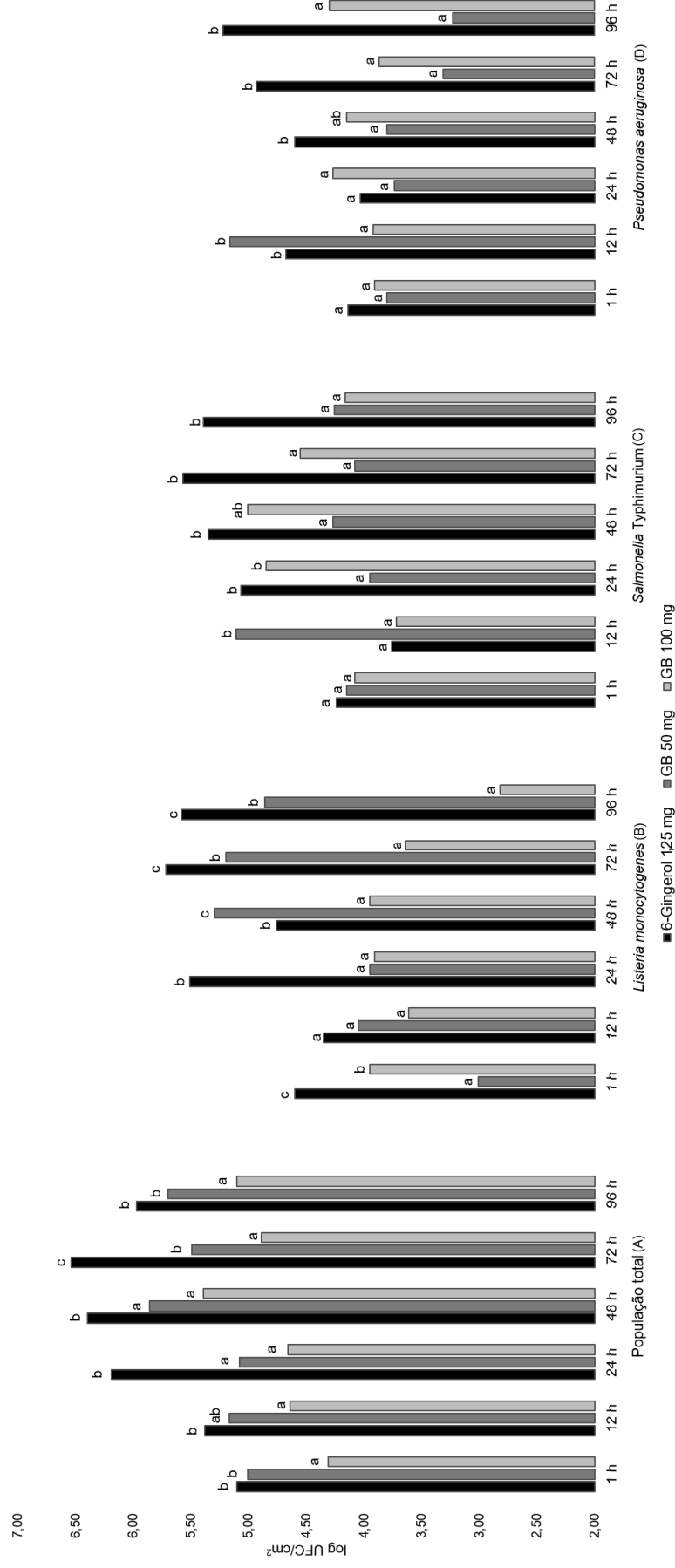
Tabela 2: Atividade de 6- gingerol (1,25 mg/ml) frente a *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em biofilme multiespécies

Microrganismos	Tratamentos	Tempo de contato					
		1h	12h	24h	48h	72h	96h
População total	C+	4,89 ^{A1;a2}	5,07 ^{A;b}	4,85 ^{A;a}	6,71 ^{B;a}	5,54 ^{A;a}	5,56 ^{A;a}
	6- gingerol	5,10 ^{B;a}	3,86 ^{A;a}	5,51 ^{BC;a}	6,40 ^{C;a}	4,72 ^{AB;a}	5,58 ^{BC;a}
<i>L. monocytogenes</i>	C+	5,61 ^{B;b}	4,14 ^{A;a}	3,76 ^{A;a}	7,01 ^{C;b}	4,60 ^{A;a}	5,57 ^{B;a}
	6- gingerol	3,75 ^{A;a}	4,38 ^{AB;a}	4,58 ^{AB;a}	5,83 ^{C;a}	5,22 ^{BC;a}	5,36 ^{BC;a}
<i>S. Typhimurium</i>	C+	4,60 ^{A;a}	5,38 ^{A;a}	5,07 ^{A;a}	4,76 ^{A;a}	6,54 ^{B;a}	5,39 ^{A;a}
	6- gingerol	5,15 ^{A;a}	6,36 ^{B;b}	4,68 ^{A;a}	6,17 ^{B;b}	6,72 ^{B;a}	4,93 ^{A;a}
<i>P. aeruginosa</i>	C+	4,10 ^{A;a}	6,19 ^{C;b}	4,29 ^{A;a}	5,34 ^{BC;a}	5,97 ^{C;a}	4,38 ^{AB;a}
	6- gingerol	4,24 ^{A;a}	4,35 ^{AB;a}	4,03 ^{A;a}	5,35 ^{BC;a}	5,72 ^{C;a}	5,22 ^{BC;a}

¹Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tratamento) para o mesmo micro-organismo. ²Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tempo de contato) para o mesmo micro-organismo.

No que diz respeito à comparação entre a ação do princípio ativo e do óleo essencial, os dados estão dispostos na Figura 2. OEGB nas duas concentrações foi mais efetivo quando comparada com a concentração de CIM de 6-gingerol. Sob efeito do tempo, pode-se observar um efeito na culturabilidade celular, inibindo o crescimento inicial, porém tendo um retorno no crescimento após 48h de incubação.

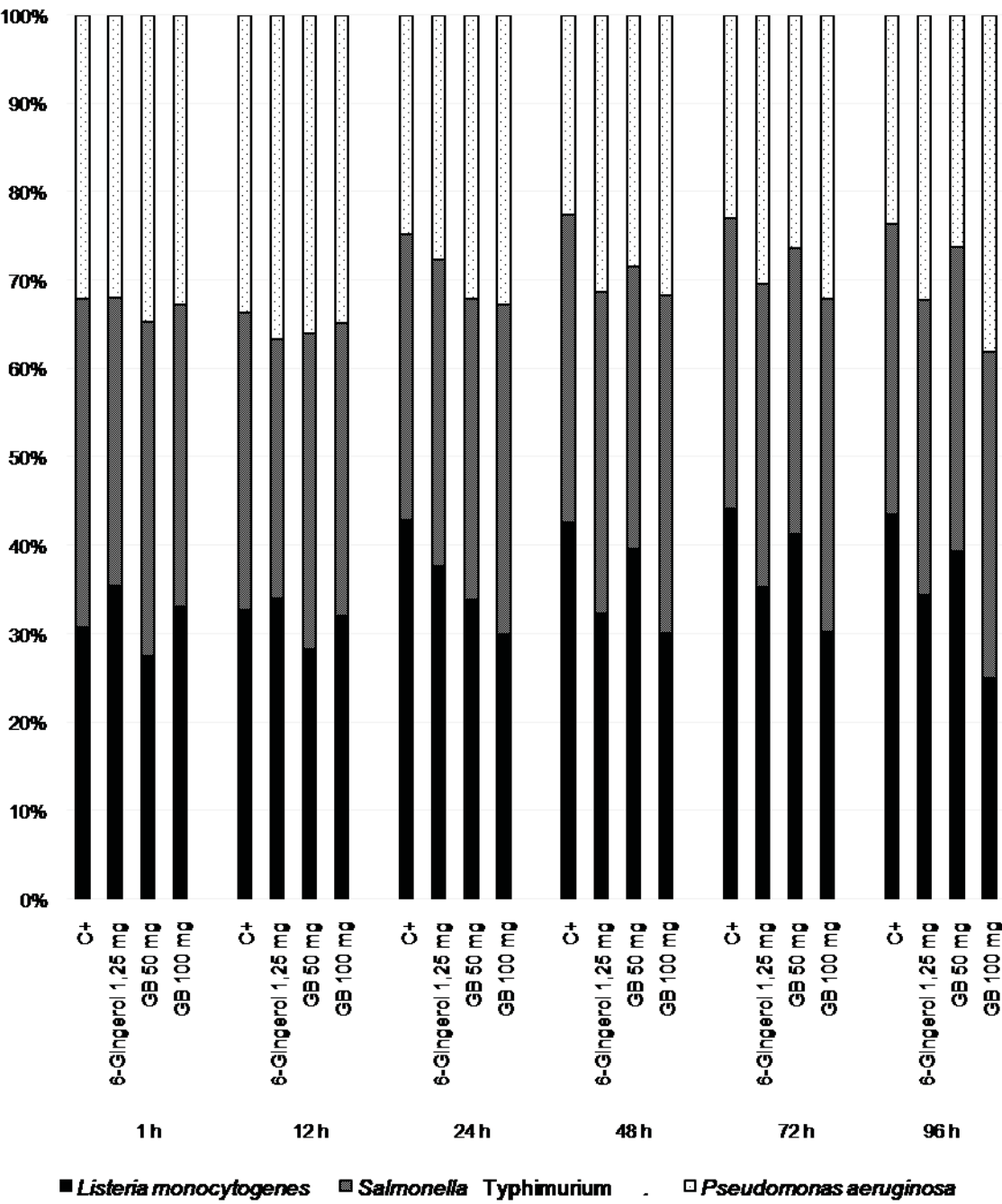
Figura 2: Ação anti formação de biofilme utilizando a concentração de 1,25 mg (CIM) de 6-gingerol, 50 mg ($1/2$ CIM) e 100 mg (CIM) do OEGB



Letras diferentes entre os tratamentos (6-gingerol x OE de GB) estipulam diferença estatística ($p < 0,05$) no tempo de incubação.

A fim de avaliar qual microrganismo prevalece no consórcio formado pelo biofilme com interferência do OEGB e 6- gingerol, a distribuição relativa da composição microbiana dos biofilmes multiespécies foi avaliada pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC/cm²) para cada população microbiana em cada momento (Figura 3). Observa-se que as contagens de células sésseis em superfície de polipropileno para todos os isolados quando expostos a 1,25 mg/mL de 6-gingerol (CIM) por até 96 h não diferiu ($p > 0,05$) daqueles observados para células não expostas ao princípio ativo (biofilme controle) (Fig. 3 A – D). Este resultado demonstra que 6-gingerol possui ação antimicrobiana sob células planctônicas, no entanto não foi capaz de inibir a adesão de células sésseis na superfície avaliada.

1513 Figura 3: Distribuição relativa de cada microrganismo estudado dentro do biofilme multiespécies em
1514 função do tempo e do tratamento aplicado.



1515

1516

1517 Logo observa-se um aumento gradual na proporção de *L. monocytogenes*
1518 ao longo do tempo no consórcio bacteriano sem interferência dos tratamentos, tendo
1519 um aumento 2,5 log UFC/cm² na biomassa, com as contagens variando de 4,42 a 6,97
1520 log UFC/cm² durante 96 h de incubação (ANEXO 2). Quando observada as
1521 proporções no consórcio microbiano exposto à concentração de 100 mg/ml do
1522 OEGB (CIM) foi possível observar um comportamento inverso, onde foi observado o

1523 crescimento de *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium* em detrimento a população de *L.*
1524 *monocytogenes*, com o maior incremento populacional no tempo de 96 h, chegando
1525 a 4,3, 4,16 e 2,82 UFC/cm² (ANEXO 2), respectivamente (Fig. 3). De modo geral, a
1526 composição do biofilme multiespécies sofreu alteração em resultado a exposição do
1527 composto avaliado, sendo as alterações dependentes da concentração aplicada.

1529 5.4 DISCUSSÃO

1531 A utilização de compostos naturais vem sendo avaliada como forma
1532 alternativa e complementar ao uso de biocidas (MICKYMARAY et al., 2019, IMANE
1533 et al., 2020). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os compostos
1534 avaliados, OEGB e 6-gingerol, demonstram ações antimicrobianas distintas.
1535 Estudos anteriores demonstraram que 6-gingerol mostrou atividade inibitória e
1536 bactericida considerável contra células planctônicas de *Staphylococcus aureus* e
1537 *Escherichia coli* em concentrações de 400 µg/mL (SINGH; GANGADHARAPPA;
1538 MRUTHUNJAYA, 2018), 50 µg/mL para micobacterias (BHASKAR et al., 2020) e
1539 100 µg/mL avaliado como coadjuvante da ação de calor sob Vírus da Hepatite A
1540 (PATWARDHAN et al., 2020), no entanto este é o primeiro estudo há avaliar a
1541 atividade antimicrobiana de 6-gingerol contra *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e
1542 *P. aeruginosa*. Em nosso estudo, foi demonstrado o potencial antibacteriano do
1543 princípio ativo 6-gingerol para os microrganismos avaliados tanto em forma individual
1544 como em forma associada, em concentrações semelhantes a outros grupos de
1545 microrganismos.

1546 A ação do OEGB foi descrita, demonstrando atividade antimicrobiana e
1547 evidenciando um comportamento seletivo do OE de acordo ao microrganismo
1548 avaliado (SIVASOTHY et al., 2011; BELLIK et al., 2014). Em nosso estudo, foi
1549 possível observar a diferença de ação antimicrobiana entre os microrganismos
1550 testados, sendo evidenciada melhor ação do OE sob microrganismos gram-positivos
1551 quando comparado aos gram-negativos. Assim em nosso estudo, foi necessária
1552 uma concentração inferior para inibir o crescimento de gram-positivos, o que
1553 corrobora com os resultados de Da Silva et al., (2018), pois devido às características
1554 hidrofóbicas, insolubilidade em água e instabilidade do OEGB sua atividade
1555 antimicrobiana foi avaliada de forma encapsulada frente a isolados de *L.*
1556 *monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*. Desse modo, devido à dificuldade

de padronização no momento da obtenção destes compostos, não é pré-definida uma concentração para classificar a atividade antimicrobiana de compostos naturais (DOS SANTOS REIS et al., 2020; JAYASUNDARA et al., 2021). Segundo Djabou et al., (2013) os compostos naturais poderiam ser classificados como inativo, ativo, moderadamente ativo e extremamente ativo. Tendo em vista essa classificação a ação do princípio ativo de 6-gingerol nesse estudo foi considerada moderadamente ativa, enquanto o OEGB seria considerado inativo.

Muitas espécies de *Zingiber* foram identificadas e seus compostos bioativos descritos, os quais podem estar presentes gingeróis e shogaols, compostos que possuem atividade antimicrobiana (SIVASOTHY et al., 2011, MICKYMARAY et al., 2019). 6-gingerol é um dos principais constituintes não voláteis do rizoma de gengibre, responsável pelo aroma e sabor pungente característico do gengibre fresco (JOLAD et al., 2004). Embora o OEGB contenha um grande número de componentes químicos com atividade antimicrobiana (JAYASUNDARA et al., 2021) alguns autores atribuem a efetividade do OE à atividade sinérgica destes compostos (CHAN et al., 2009, DOS SANTOS REIS et al., 2020), enquanto outra característica que podem ser atribuída à atividade antimicrobiana eficaz esteja relacionada com a estrutura lipofílica, que resulta na desestabilização da membrana celular podendo interferir no transporte de íons e solutos, levando à morte celular (TURINA et al., 2006, BAKKALI et al., 2008). Neste estudo, os dois compostos bioativos avaliados demonstraram ação antimicrobiana sobre os microrganismos estudados, dessa forma sendo proposto como fontes de compostos com propriedades antimicrobianas.

Diversas condições favorecem a adesão celular e formação de biofilme, como a presença de resíduos que fornecem substratos associado às características de determinadas superfícies como hidrofobicidade e presença de rugosidades, que podem resultar no aumento da fixação bacteriana (FAGERLUND et al., 2020). Neste estudo, os isolados avaliados exibiram capacidade de formação de biofilme na superfície de polipropileno em 96 h de incubação a 10 °C e ao avaliar a ação antibiofilme do OEGB e 6-gingerol foi possível observar um comportamento de ação distinto sob células expostas.

6-gingerol demonstrou ação antimicrobiana em células planctônicas, necessitando de baixas concentrações para inibir o crescimento bacteriano. No entanto, quando avaliada a concentração de CIM como interferente na adesão

celular, não foi possível visualizar ação eficaz, reforçando a necessidade de uma concentração mais elevada quando trabalhado com células sésseis, visto que a diferença no comportamento metabólico no interior do biofilme multiespécies pode impedir a ação do composto avaliado (BOUCHER et al, 2021). Esse comportamento é evidenciado através da contagem de células de *L. monocytogenes*, quais a MIC tolerada (0,62 mg/ml) foi inferior a CIM exposta no biofilme multiespécies. *L. monocytogenes* foi capaz de aderir à superfície de polipropileno (3,75UFC/cm²) e sobreviver no tempo de 96 h a 10 °C, demonstrando o comportamento simbiótico entre as células bacterianas, onde *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* demonstram um comportamento de proteção permitindo a sobrevivência de *L. monocytogenes* em uma condição hostil. Resultados distintos foram encontrados por Kim et al. (2015), onde 6-gingerol inibiu a adesão de *P. aeruginosa* em 19-53% (tratamento com 10 µM) em superfícies de vidro. No entanto, não há publicação anterior sobre a eficácia de 6-gingerol contra células sésseis de *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

Quando avaliada a eficácia antibiofilme do OEGB, tanto a concentração de CIM como ½ CIM demonstraram melhor eficácia contra células sésseis quando comparado ao 6-gingerol ($p > 0,05$). A melhor atividade do OEGB pode ser atribuída a sua característica lipofílica proporcionando alterações físico-químicas na superfície celular e atividade antioxidante que interfere na interação célula-superfície, impedindo a adesão celular (BELLIK et al., 2014; YOUSFI et al., 2021), comportamento demonstrado em nosso estudo, onde houve uma redução da biomassa celular quando comparada ao controle, contudo não havendo eliminação total das células sésseis, dado também avaliado pela presença de células planctônicas durante as 96 h de incubação (ANEXO 1). Fato importante a ser discutido é a melhor efetividade do OEGB em reduções logarítmicas ocorrendo nas primeiras horas de incubação (1 – 48 h) para os três microrganismos avaliados, um fato que deve ser considerado para a diferença de ação entre os maiores tempos de incubação é a possível volatilidade do OE, mesmo na temperatura de 10 °C, resultando em uma ação menos eficaz nos tempos de 72 h e 96 h. Nosso estudo condiz com os resultados encontrados por Reis-Teixeira et al. (2019) onde o OEGB teve efeito na diminuição de contagens sésseis de biofilme único de *L. monocytogenes*.

Esse resultado deve ser considerado de forma a empregar o uso de compostos naturais como coadjuvantes no processo de sanitização, visto que a etapa de higienização no processo de trabalho industrial se intercala a cada 24 h. De forma semelhante, Chakotiya et al. (2017) avaliou a capacidade de formação do biofilme de *P. aeruginosa* demonstrando a redução de 68,13–88,63% dos biofilmes utilizando a concentração de 50 a 200 µg/mL de OEGB. De forma distinta, Mazzarrino et al. (2015) não encontrou atividade antimicrobiana do OEGB sobre células de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

5.5 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi avaliada a ação do OEGB sob biofilme multiespécies em superfície de polipropileno. Em nosso estudo, foi considerado o OEGB como possível agente antimicrobiano e encontramos potencial atividade antibiofilme contra biofilme multiespécies formado por *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* a depender da concentração empregada. Os resultados desse estudo destacam que 6-gingerol possui potencial antibacteriano para células planctônicas, no entanto não empregando o mesmo potencial para células sésseis em associação, enquanto o OEGB possui eficácia antimicrobiana e antibiofilme contra microrganismos patogênicos representando uma estratégia promissora no controle de biofilme multiespécies. Portanto, a utilização do OEGB como coadjuvante na etapa de higienização pode ser considerada ecologicamente correta no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes na indústria de alimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os quatro compostos avaliados demonstraram atividade antibacteriana sobre isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* avaliados neste estudo. Quando avaliado a efetividade dos compostos sobre células sésseis, piperina demonstrou ser mais efetivo quando comparado ao OEP e OEGB quando comparado a 6-gingerol. Por sua vez 6-gingerol demonstrou atividade antibacteriana sobre os isolados avaliados, e não demonstrou atividade anti formação de biofilme na concentração avaliada.

O consórcio bacteriano formado por *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* foi capaz de aderir à superfície de polipropileno mantendo a contagem de células (UFC/cm²) em todos os tempos avaliados. Observando a distribuição relativa dos microrganismos presentes no biofilme multiespecies, foi possível observar que os tratamentos aplicados resultaram em uma alteração da população no interior do biofilme, favorecendo o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, microrganismo até então sensível as concentrações avaliadas, este comportamento foi observado para os quatro compostos.

Biofilmes isolados de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*, bem como a associação dos microrganismos expressou genes de importância na formação e manutenção de biofilme. A aplicação de piperina resultou em uma desregulação gênica nos biofilmes simples e multiespécies.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a possível aplicação do OEP, OEGB e piperina como compostos adjuvantes no processo de sanitização em superfícies de manipulação de alimentos, no entanto são necessários mais estudos a respeito da aplicação adequada destes compostos, visando aproveitar seu potencial antibacteriano e anti formação de biofilme e minimizando efeitos residuais nestas superfícies.

REFERÊNCIAS

- 1684
- 1685
- 1686 AFONSO, T. B.; SIMÕES, L. C.; LIMA, N. Occurrence of filamentous fungi in drinking
1687 water: their role on fungal-bacterial biofilm formation. **Research in Microbiology**, v.
1688 172, n. 1, 2020.
- 1689 AHMER, B. M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella*
1690 *enterica*. **Molecular microbiology**, v. 52, n. 4, p. 933-945, 2004.
- 1691 ALONSO-CALLEJA, C.; GUERRERO-RAMOS, E.; ALONSO-HERNANDO, A.;
1692 CAPITA, R. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to
1693 several food-grade biocides. **Food Control**, v. 56, p. 86-94, 2015.
- 1694 AMALRAJ, A.; HAPONIUK, J. T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Preparation,
1695 characterization and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol/gum arabic/chitosan
1696 composite films incorporated with black pepper essential oil and ginger essential
1697 oil. **International journal of biological macromolecules**, v. 151, p. 366-375, 2020.
- 1698 DE ALMEIDA, F. A.; PINTO, U. M.; VANETTI, M. C. D. Novel insights from molecular
1699 docking of SdiA from *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* with quorum sensing
1700 and quorum quenching molecules. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 178-190,
1701 2016.
- 1702 AMRUTHA, B.; SUNDAR, K.; SHETTY, P. H. Spice oil nanoemulsions: Potential
1703 natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and
1704 vegetables. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 152-159, 2017.
- 1705 ARTEAGA, V.; LAMAS, A.; REGAL, P.; VÁZQUEZ, B.; MIRANDA, J. M.; CEPEDA,
1706 A.; FRANCO, C. M. Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella*
1707 *enterica* strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and
1708 gene expression. **Microbial pathogenesis**, v. 137, p. 103771, 2019.
- 1709 AUTRET, N.; RAYNAUD, C.; DUBAIL, I.; BERCHE, P.; CHARBIT, A. Identification of
1710 the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. **Infection and**
1711 **immunity**, v. 71, n.8, p. 4463-4471, 2003.
- 1712 BABU, K. N.; HEMALATHA, R.; SATYANARAYANA, U.; SHUJAUDDIN, M.; HIMAJA,
1713 N.; BHASKARACHARY, K.; KUMAR, B. D. Phytochemicals, polyphenols, prebiotic
1714 effect of *Ocimum sanctum*, *Zingiber officinale*, *Piper nigrum* extracts. **Journal of**
1715 **herbal medicine**, v.13, p. 42-51, 2018.
- 1716 BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; ROUDASHTI, S.; HAGHI, F.
1717 Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory
1718 concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. **Journal of global**
1719 **antimicrobial resistance**, v. 10, p. 21-28, 2017.
- 1720 BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of
1721 essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475,
1722 2008.

- 1723 BANERJEE, P.; SAHOO, P. K.; ADHIKARY, A.; RUHAL, R., JAIN, D. Molecular and
1724 structural facets of c-di-GMP signalling associated with biofilm formation in
1725 *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Aspects of Medicine**, p. 101001, 2021.
- 1726 BARAK, J. D.; GORSKI, L.; NARAGHI-ARANI, P.; CHARKOWSKI, A. O. Salmonella
1727 enterica virulence genes are required for bacterial attachment to plant
1728 tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 5685-5691, 2005.
- 1729 BARBOSA, J.; CUPPINI, M.; FLACH, J.; STEFFENS, C.; CANSIAN, R. L.;
1730 TONIAZZO, G. Removal of *Escherichia coli* in boning knives with different
1731 sanitizers. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 309-315, 2016.
- 1732 BÉATRICE, J.; MAUD, P.; STÉPHANE, A.; FRANÇOIS, C.; FRÉDÉRIC, G.;
1733 BENOIT, G.; MARIE-ODILE, H. Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa*
1734 virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in
1735 rats. **FEMS microbiology letters**, v. 243, n. 1, p. 271-278, 2005.
- 1736 BELLIK, Y. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and
1737 oleoresin of *Zingiber officinale Roscoe*. **Asian Pacific Journal of Tropical**
1738 **Disease**, v.4, n.1, p. 40-44, 2014.
- 1739 BHASKAR, A.; KUMARI, A.; SINGH, M.; KUMAR, S.; KUMAR, S.; DABLA, A.;
1740 CHATURVEDI, S.; YADAV, V.; CHATTOPADHYAYD.; DWIVEDI, V. P. [6]-Gingerol
1741 exhibits potent anti-mycobacterial and immunomodulatory activity against
1742 tuberculosis. **International Immunopharmacology**, v. 87, p. 106809, 2020.
- 1743 BRASIL. **Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamento da Inspeção
1744 Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal. Diário Oficial da União, Brasília,
1745 DF, 30 de agosto de 2017.
- 1746 BRASIL. Ministério da Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão
1747 Hídrica e Alimentar. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**.
1748 2019. Disponível em:
1749 <[https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-](https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf)
1750 [Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf](https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf)>. Acesso em: 20/09/2021
- 1751 BRASILEIRO, I. S.; BARBOSA, M.; IGARASHI, M. C.; BISCOLA, V.; MAFFEI, D.F.;
1752 LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Use of growth inhibitors for control of *Listeria*
1753 *monocytogenes* in heat- processed ready-to-eat meat products simulating post-
1754 processing contamination. **LWT - Food Science and Technology**, v.74, p. 7-13,
1755 2016.
- 1756 BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M., PIARD, J. C.; NAITALI, M.;
1757 BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food**
1758 **microbiology**, v. 45, p.167-178, 2015.
- 1759 BROCHOT, A.; GUILBOT, A.; HADDIOUI, L.; ROQUES, C. Antibacterial, antifungal,
1760 and antiviral effects of three essential oil blends. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 4, p.
1761 e00459, 2017.
- 1762 BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G.
1763 Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role

- 1764 of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of pharmaceutical and**
1765 **biomedical analysis**, v.87, p. 218-228, 2014.
- 1766 BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H.
1767 Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless
1768 steel using milk and different conditions of cultivation. **Food Science and**
1769 **Technology**, v. 29, p. 886-895, 2009.
- 1770 BOUCHER, C.; WAITE-CUSIC, J.; STONE, D.; KOVACEVIC, J. Relative
1771 performance of commercial citric acid and quaternary ammonium sanitizers against
1772 *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to food industry. **Food**
1773 **Microbiology**, v. 97, p. 103752, 2021.
- 1774 BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C.; WHITING,
1775 R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-
1776 response, ecology, and risk assessments. **Food control**, v. 75, p. 1-13, 2017.
- 1777 BUCHER, T.; OPPENHEIMER-SHAANAN, Y.; SAVIDOR, A.; BLOOM-
1778 ACKERMANN, Z.; KOLODKIN-GAL, I. Disturbance of the bacterial cell wall
1779 specifically interferes with biofilm formation. **Environmental Microbiology Reports**,
1780 v.7, p. 990 – 1004, 2015.
- 1781 BUSTIN, S. A.; VLADIMIR B.; JEREMY A. G.; JAN H.; JIM H.; MIKAEL K.;
1782 REINHOLD M.; TANIA N.; MICHAEL W. P.; GREGORY L. S.; JO V.; CARL T. W.
1783 The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time
1784 PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- 1785 CANTON, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria
1786 and resistance genes, **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, p. 477-485, 2011.
- 1787 CAMPANA, R.; CIANDRINI, E.; BAFFONE, W. Experimental approach for a possible
1788 integrated protocol to determine sanitizer activity against both planktonic bacteria and
1789 related biofilms. **Food Research International**, v. 111, p. 472-479, 2018
- 1790 CARNEIRO JUNIOR, J. F. C.; DE LIMA, J. M.; DA SILVA, A. L. P. Análise de
1791 mercado da pimenta do reino no período de 1990 a 2015. **Tecnologia e**
1792 **Ciência Agropecuária**, v.11, n. 6, p. 139-145, 2017.
- 1793 CASTRO, M. S. R.; DA SILVA FERNANDES, M.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.
1794 Modelling *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm
1795 formation on stainless steel surfaces and controlling through sanitisers. **International**
1796 **Dairy Journal**, v. 114, p. 104945, 2021.
- 1797 CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Foodborne Outbreak
1798 Tracking and Reporting (FOOD Tool). Disponível em:
1799 <https://wwwn.cdc.gov/norsddashboard/> Acesso em: 20/09/2021
- 1800 CHAKOTIYA, A. S.; TANWAR, A.; NARULA, A.; SHARMA, R. K. *Zingiber officinale*:
1801 Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated
1802 by flow cytometry. **Microbial pathogenesis**, v.107, p. 254-260, 2017.

- 1803 CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.;
1804 YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of
1805 leaves and tea of ginger species. **Food chemistry**, v. 113, n.1, p. 166-172, 2009.
- 1806 CHAN, K. G.; LIU, Y. C.; CHANG, C. Y. Inhibiting N-acyl-homoserine lactone
1807 synthesis and quenching Pseudomonas quinolone quorum sensing to attenuate
1808 virulence. **Frontiers in microbiology**, v.6, p.1173, 2015.
- 1809 CHEN, D.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Single-and mixed-species biofilm formation by
1810 Escherichia coli O157: H7 and Salmonella, and their sensitivity to levulinic acid plus
1811 sodium dodecyl sulfate. **Food Control**, v. 57, p. 48-53, 2015.
- 1812 CHHETRI, R. K.; BAUN, A.; ANDERSEN, H. R. Acute toxicity and risk evaluation of
1813 the CSO disinfectants performic acid, peracetic acid, chlorine dioxide and their by-
1814 products hydrogen peroxide and chlorite. **Science of The Total Environment**, v.
1815 677, p. 1-8, 2019
- 1816 CHUA, S. L., LIU, Y., YAM, J. K. H., CHEN, Y., VEJBORG, R. M., TAN, B. G. C.,
1817 STAFFAN KJELLEBERG, S.; TIM TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; YANG, L.
1818 Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to
1819 planktonic lifestyles. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-12,2014.
- 1820 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods For
1821 Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically;
1822 Approved Standard-Sixth Edition. CLSI document M07-A6. NCCLS document M7-A6
1823 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne,
1824 Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
- 1825 COOPER, R. A.; BJARNSHOLT, T.; ALHEDE, M. Biofilms in wounds: a review of
1826 present knowledge. **Journal of Wound Care**, v. 23, p. 570-582, 2014.
- 1827 COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial**
1828 **Agents**, v. 11, p. 217–221, 1999.
- 1829 CZAJKOWSKI, R.; JAFRA, S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent
1830 quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta*
1831 *BiochimicaPolonica*, v.56, n. 1, p. 1-16, 2009.
- 1832 DALLA COSTA, K. A.; FERENZ, M.; DA SILVEIRA, S. M.; MILLEZI, A. F.; Formação
1833 de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de
1834 alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, v. 2, p. 75-
1835 82,2016.
- 1836 DA SILVA, F. T.; DA CUNHA, K. F.; FONSECA, L. M.; ANTUNES, M. D.; EL HALAL,
1837 S. L. M.; FIORENTINI, Â. M.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Actionof ginger
1838 essentialoil (*Zingiberofficinale*) encapsulated in
1839 proteinsultrafinefibersontheantimicrobialcontrol in situ. **International journal of**
1840 **biological macromolecules**, v. 118, p.107-115, 2018.
- 1841 DEANS, S. G. Black Pepper, *Piper nigrum*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial
1842 Profiles-PA. In: Ravindran (Ed.) Harwood Academic Publishers, The
1843 Netherlands, Phytochemistry, 2001, p. 827-828.

- 1844 DE FILIPPIS, F.; VALENTINO, V.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; COTTER, P. D.;
 1845 ERCOLINI, D. Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality
 1846 and safety in the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v.38, p. 168-176,
 1847 2020.
- 1848 DEL MAR CENDRA, M.; TORRENTS, E. Pseudomonas aeruginosa biofilms and
 1849 their partners in crime. **Biotechnology Advances**, p. 107734, 2021.
- 1850 DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W. Essential oils' chemical
 1851 characterization and investigation of some biological activities: A critical
 1852 review. **Medicines**, v. 3, n.4, p.25, 2016.
- 1853 DIVAKAR, M. C.; AMANI AL-SIYABI, S.; VARGHESE, S.; AL RUBAIE, M. The
 1854 practice of ethnomedicine in the northern and southern provinces of Oman. **Oman**
 1855 **Medical Journal**, v.31, n.4, p. 245, 2016.
- 1856 DJABOU, N.; LORENZI, V.; GUINOISEAU, E.; ANDREANI, S.; GIULIANI, M. C.;
 1857 DESJOBERT, J. M.; MUSELLI, A. Phytochemical composition of *Corsican Teucrium*
 1858 essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens.
 1859 **Food Control**, v. 30, n.1, p. 354-363, 2013.
- 1860 DOS SANTOS REIS, N.; DE SANTANA, N. B.; DE CARVALHO TAVARES, I. M.;
 1861 LESSA, O. A.; DOS SANTOS, L. R.; PEREIRA, N. E.; SOARES, G. A.; Oliveira, R.
 1862 A.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Enzymeextractionbylab-scalehydrodistillationof
 1863 ginger essentialoil (ZingiberofficinaleRoscoe): Chromatographic and
 1864 micromorphological analyses. **Industrial Crops and Products**, v. 146, p. 112210,
 1865 2020.
- 1866 DWIVEDI, D.; SINGH, V. Effects of the natural compounds embelin and piperine on
 1867 the biofilm-producing property of Streptococcus mutans. **Journal of traditional and**
 1868 **complementary medicine**, v. 6, n.1, p. 57-61, 2016.
- 1869 EMBRAPA. Manual segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino.
 1870 Brasília: Embrapa, 2004.
- 1871 EZZAT, S. M.; EZZAT, M. I.; OKBA, M. M.; MENZE, E. T.; ABDEL-NAIM, A. B. The
 1872 hidden mechanism beyond ginger (Zingiber officinale Rosc.) potent in vivo and in
 1873 vitro anti-inflammatory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 214, p. 113-123,
 1874 2018.
- 1875 FARBER, J. M., ZWIETERING, M., WIEDMANN, M., SCHAFFNER, D., HEDBERG,
 1876 C. W., HARRISON, M. A., HARTNETT, E.; CHAPMAN, B.; DONNELLY, C.
 1877 W.;GOODBURN, K. E.; GUMMALLA, S. Alternative approaches to the risk
 1878 management of Listeria monocytogenes in low risk foods. **Food Control**, v. 123, p.
 1879 107601, 2021.
- 1880 FARIA, T. R. B.; FURLETTI-GOES, V. F.; FRANZINI, C. M.; DE ARO, A. A.; DE
 1881 ANDRADE, T. A. M.; SARTORATTO, A.; DE MENEZES, C. C. Anti-inflammatory and
 1882 antimicrobial effects of Zingiber officinale mouthwash on patients with fixed
 1883 orthodontic appliances. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial**
 1884 **Orthopedics**, v. 159, n. 1, 21-29, 2021.

- 1885 FAGERLUND, A.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T. Microbial diversity and ecology of
1886 biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes*
1887 persistence. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 171-178, 2020.
- 1888 FALCÓ, I.; VERDEGUER, M.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G.; RANDAZZO, W.
1889 Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food**
1890 **Science and Emerging Technologies**, v. 51, p. 220-228, 2019.
- 1891 FANG, K.; PARK, O. J.; HONG, S. H. Controlling biofilms using synthetic biology
1892 approaches. **Biotechnology Advances**, v. 40, n. 107518, 2019.
- 1893 FENG, Q.; LUO, L.; CHEN, X.; ZHANG, K.; FANG, F.; XUE, Z.; LI, C.; CAO, J.; LUO,
1894 J. Facilitating biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* via exogenous N-Acy-L-
1895 homoserine lactones stimulation: Regulation on the bacterial motility, adhesive ability
1896 and metabolic activity. **Bioresource Technology**, v. 341, p. 125727, 2021.
- 1897 FDA. Food and Drug Administration. Food Additive Status List. Disponível em:
1898 <[https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/](https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm091048.htm#additives)
1899 [ucm091048.htm#additives](https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm091048.htm#additives)>. Acesso em: 04/11/2021
- 1900 FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. Approaches to dispersing medical biofilms,
1901 **Microorganisms**, v. 5, p. 15, 2017.
- 1902 GALIE, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F.
1903 Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in**
1904 **microbiology**, v. 9, n. 898, 2018.
- 1905 GANDRA, T. K. V.; VOLCAN, D.; KRONING, I. S.; MARINI, N.; DE OLIVEIRA, A. C.;
1906 BASTOS, C. P.; DA SILVA, W. P. Expression levels of the *agr* locus and *prfA* gene
1907 during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and
1908 polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37° C. **International journal of food**
1909 **microbiology**, v. 300, p. 1-7, 2019.
- 1910 GARCÍA, B.; LATASA, C.; SOLANO, C.; PORTILLO, F. G. D.; GAMAZO, C.; LASA, I.
1911 Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm
1912 formation. **Molecular microbiology**, v. 54, n. 1, p. 264-277, 2004.
- 1913 GARMYN, D.; AUGAGNEUR, Y.; GAL, L.; VIVANT, A.; PIVETEAU, P. *Listeria*
1914 *monocytogenes* Differential Transcriptome Analysis Reveals Temperature-
1915 Dependent Agr Regulation and Suggests Overlaps with Other Regulons. **PLOS**
1916 **ONE**, v. 7, n.9, p. 1-13, 2012.
- 1917 GERSTEL, U.; PARK, C.; RÖMLING, U. Complex regulation of *csgD* promoter
1918 activity by global regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, v. 49, p. 639-654.
1919 2003.
- 1920 GHAFOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. Role of exopolysaccharides in
1921 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Applied and**
1922 **environmental microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5238-5246, 2011.

- 1923 GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; MØRETRØ, T.;
 1924 LANGSRUD, S.; DOULGERAKI, A.; NYCHAS, G. J.; KAČÁNIOVÁ, M.; CZACZYK,
 1925 K.; SIMÕES, M.; ÖLMEZ, H. Intra-and inter-species interactions within biofilms of
 1926 important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v.6, n.841,
 1927 2015.
- 1928 GOVAERT, M.; SMET, C.; WALSH, J. L.; VAN IMPE, J. F. Dual-species model
 1929 biofilm consisting of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*:
 1930 development and inactivation with cold atmospheric plasma (CAP). **Frontiers in**
 1931 **microbiology**, v. 10, p. 2524, 2019.
- 1932 GRANTCHAROVA, N.; PETERS, V.; MONTEIRO, C.; ZAKIKHANY, K.; RÖMLING,
 1933 U. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica*
 1934 serovar typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 456-466, 2010.
- 1935 GVR, GRAND VIEW RESEARCH. Essential oils market size, share & trends analysis
 1936 report by application (food & beverages, spa & relaxation), by product (orange,
 1937 peppermint), by sales channel, and segment forecasts, California, EUA,
 1938 2020. Disponível em: <[https://www.grandviewresearch.com/industry-](https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market)
 1939 [analysis/essential-oils-market](https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market)>. Acesso em: 07/11/2021
- 1940 GU, T.; MEESRISOM, A.; LUO, Y.; DINH, Q. N.; LIN, S.; YANG, M.; SHARMA, A.;
 1941 TANG, R.; ZHANG, J.; JIA, Z.; MILLNER, P. A.; PEARLSTEIN, A. J.; ZHANG, B.
 1942 *Listeria monocytogenes* biofilm formation as affected by stainless steel surface
 1943 topography and coating composition. **Food Control**, v. 130, p. 108275, 2021.
- 1944 GUŁA, G.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; KORZEKWA, K.; VALVANO, M. A.; DRULIS-
 1945 KAWA, Z. Complex signaling networks controlling dynamic molecular changes in
 1946 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Current medicinal chemistry**, v.26, n. 11,
 1947 p.1979-1993, 2019.
- 1948 GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow.
 1949 *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.
- 1950 GUZMÁN-SOTO, I.; MCTIERNAN, C.; GONZALEZ, M.; ROSS, A.; GUPTA, K.;
 1951 SUURONEN, E. J.; MA, H. F.; GRIFFITH, M.; ALARCON, E. I. Mimicking biofilm
 1952 formation and development: Recent progress in In Vitro and In Vivo biofilm
 1953 models. **Iscience**, p.102443, 2021.
- 1954 HAM, S. Y.; KIM, H. S.; JANG, Y.; SUN, P. F.; PARK, J. H.; LEE, J. S.; BYUN, Y.;
 1955 PARK, H. D. Control of membrane biofouling by 6-gingerol analogs: Quorum sensing
 1956 inhibition. **Fuel**, v. 250, p. 79-87, 2019.
- 1957 HAY, I. D.; UR REHMAN, Z.; GHAFOR, A.; REHM, B. H. Bacterial biosynthesis of
 1958 alginates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n.6, p. 752-
 1959 759, 2010.
- 1960 HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate
 1961 method for enumerating bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 44, n. 2,
 1962 p.121-129, 2001.

- 1963 HITOMI, S., ONO, K., TERAOKA, K., MATSUMOTO, C., MIZUNO, K.,
 1964 YAMAGUCHI, K.; IMAI, R.; OMIYA, Y.; HATTORI, T.; KASE, T.; INENAGA, K. [6]-
 1965 gingerol and [6]-shogaol, active ingredients of the traditional Japanese medicine
 1966 hangeshashinto, relief oral ulcerative mucositis-induced pain via action on Na⁺
 1967 channels. **Pharmacological research**, v.117, p. 288-302, 2017.
- 1968 IMANE, N. I.; FOUZIA, H.; AZZAHRA, L. F.; AHMED, E.; ISMAIL, G.; IDRIS, D.;
 1969 MOHAMED, H. H.; SIRINE, F.; HOUCINE, O.; NOUREDDINE, B. Chemical
 1970 composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against
 1971 multidrug resistant bacteria. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 35, p.
 1972 101074, 2020.
- 1973 IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; AVILA-NOVOA, M. G. Kinetics of
 1974 biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that
 1975 mimic the poultry, meat, and egg processing industries. **International journal of**
 1976 **food microbiology**, v. 303, p. 32-41, 2019.
- 1977 JARA, J.; PÉREZ-RAMOS, A.; DEL SOLAR, G.; RODRÍGUEZ, J. M.; FERNÁNDEZ,
 1978 L.; ORGAZ, B. Role of Lactobacillus biofilms in Listeria monocytogenes adhesion to
 1979 glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 334, p. 108804,
 1980 2020.
- 1981 JARDAK, M.; MNIF, S.; AYED, R. B.; REZGUI, F.; AIFA, S. Chemical composition,
 1982 antibiofilm activities of Tunisian spices essential oils and combinatorial effect against
 1983 Staphylococcus epidermidis biofilm. **LWT**, v. 140, p. 110691, 2021.
- 1984 JAYASUNDARA, N. D. B., ARAMPATH, P. Effect of variety, location & maturity stage
 1985 at harvesting, on essential oil chemical composition, and weight yield of Zingiber
 1986 officinale roscoe grown in Sri Lanka. **Heliyon**, v.7, n.3, p. e06560, 2021.
- 1987 JI, J.; SHANKAR, S.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Combined effects of
 1988 microencapsulated essential oils and γ -irradiation on microbiological and
 1989 physicochemical properties of dry fermented sausages during ripening and
 1990 storage. **Food Control**, p.108624, 2021.
- 1991 JOLAD, S. D.; LANTZ, R. C.; SOLYOM, A. M.; CHEN, G. J.; BATES, R. B.;
 1992 TIMMERMAN, B. N. Fresh organically grown ginger (Zingiber officinale):
 1993 composition and effects on LPS-induced PGE2 production. **Phytochemistry**, v.65,
 1994 n.13, p. 1937-1954, 2004.
- 1995 KADAM, S.; MADHUSOODHANAN, V.; DHEKANE, R., BHIDE, D.; UGALE, R.;
 1996 TIKHOLE, U.; KAUSHIK, K. S. Milieu matters: An in vitro wound milieu to recapitulate
 1997 key features of, and probe new insights into, mixed-species bacterial
 1998 biofilms. **Biofilm**, v. 3, p. 100047, 2021.
- 1999 KANG, J.; JIN, W.; WANG, J.; SUN, Y.; WU, X.; LIU L. Antibacterial and anti-biofilm
 2000 activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. **LWT - Food**
 2001 **Science and Technology**, v. 101, p. 639-645, 2019.
- 2002 KANNIAH, P.; CHELLIAH, P.; THANGAPANDI, J. R.; GNANADHAS, G.;
 2003 MAHENDRAN, V.; ROBERT, M. Green synthesis of antibacterial and cytotoxic silver
 2004 nanoparticles by Piper nigrum seed extract and development of antibacterial silver

- 2005 based chitosan nanocomposite. **International Journal of Biological**
2006 **Macromolecules**, v. 189, p. 18-33, 2021.
- 2007 KIM, H. S.; LEE, S. H.; BYUN, Y.; PARK, H. D. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas*
2008 *aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. **Scientific**
2009 **reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.
- 2010 KWOK, T. Y.; MA, Y.; CHUA, S. L. Biofilm dispersal induced by mechanical cutting
2011 leads to heightened foodborne pathogen dissemination. **Food Microbiology**, 2021.
- 2012 KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of
2013 biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food-processing context. **LWT - Food**
2014 **Science and Technology**, v. 84, p. 47-57, 2017.
- 2015 KUMAR, N. V.; MURTHY, P. S.; MANJUNATHA, J. R.; BETTADAIAH, B. K.
2016 Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of
2017 ginger and their derivatives, **Food Chemistry**, v. 159, p. 451-457, 2014.
- 2018 LATASA, C.; ROUX, A.; TOLEDO-ARANA, A.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.;
2019 PENADÉS, J. R.; LASA, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm
2020 formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Molecular**
2021 **microbiology**, v. 58, n.5, p. 1322-1339, 2005.
- 2022 LEE, S. H.; JUNG, B. Y.; RAYAMAHJI, N.; LEE, H. S.; JEON, W. J.; CHOI, K. S.;
2023 KWEON, C. H.; YOO, H. S. A multiplex real-time PCR for differential detection and
2024 quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and
2025 Enteritidis in meats. **Journal of Veterinary Science**, v.10, n.1, p. 43-51, 2009.
- 2026 LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas*
2027 *aeruginosa*. **Protein & cell**, v.6, n.1, p. 26-41, 2015.
- 2028 LEE, K. -J.; LEE, M. -A.; HWANG, W.; PARK, H.; LEE, K. -H. Deacylated
2029 lipopolysaccharides inhibit biofilm formation by Gram-negative bacteria **Biofouling**,
2030 v. 32, p. 711-723, 2016.
- 2031 LEE, S. W.; PHILLIPS, K. S.; GU, H.; KAZEMZADEH-NARBAT, M.; REN, D. How
2032 microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and
2033 biofilm formation. **Biomaterials**, v. 268, p. 120595, 2020.
- 2034 LI, Y. X.; ZHANG, C.; PAN, S.; CHEN, L.; LIU, M.; YANG, K.; ZENG, X.; TIAN, J.
2035 Analysis of chemical components and biological activities of essential oils from black
2036 and white pepper (*Piper nigrum* L.) in five provinces of southern China. **Lwt**, v.117,
2037 p.108644, 2020.
- 2038 LI, J.; ZHAO, X. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but
2039 non-culturable state. **Food Research International**, v. 137, p. 109742, 2020.
- 2040 LIU, Y.; ORSI, R. H.; GABALLA, A.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J.; GUARIGLIA-
2041 OROPEZA, V. Systematic review of the *Listeria monocytogenes* σ B regulon supports
2042 a role in stress response, virulence and metabolism. **Future microbiology**, v. 14,
2043 n.9, p. 801-828, 2019.

- 2044 LIU, Q.; WANG, J.; HE, R.; HU, H.; WU, B.; REN, H. Bacterial assembly during the
2045 initial adhesion phase in wastewater treatment biofilms. **Water Research**, v. 184, p.
2046 116147, 2020.
- 2047 LORIES, B.; ROBERFROID, S.; DIELTJENS, L.; DE COSTER, D.; FOSTER, K. R.;
2048 STEENACKERS, H. P. Biofilm bacteria use stress responses to detect and respond
2049 to competitors. **Current Biology**, v. 30, n. 7, p. 1231-1244, 2020.
- 2050 MAGGIO, F.; ROSSI, C.; CHIAVERINI, A.; RUOLO, A.; ORSINI, M.; CENTORAME,
2051 P.; ACCIARI, V.A.; LÓPEZ, C. C.; SALINI, R.; TORRESI, M.; SERIO, A.; POMILIO,
2052 F.; PAPARELLA, A. Genetic relationships and biofilm formation of *Listeria*
2053 *monocytogenes* isolated from the smoked salmon industry. **International Journal of**
2054 **Food Microbiology**, v. 356, p.109353, 2021.
- 2055 MANE, M. B.; BHANDARI, V. M.; RANADE, V. V. Safe water and technology
2056 initiative for water disinfection: Application of natural plant derived materials. **Journal**
2057 **of Water Process Engineering**, v.43, p. 102280, 2021.
- 2058 MANGALAGIRI, N. P.; PANDITI, S. K.; JEEVIGUNTA, N. L. L. Antimicrobial activity
2059 of essential plant oils and their major components. **Heliyon**, v.7, n.4, p. e06835,
2060 2021.
- 2061 MAO, Q. Q.; XU, X. Y.; CAO, S. Y.; GAN, R. Y.; CORKE, H.; LI, H. B. Bioactive
2062 compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods**, v. 8, n.6,
2063 p.185, 2019.
- 2064 MARÁKOVÁ, N., HUMPOLÍČEK, P., KAŠPÁRKOVÁ, V., CAPÁKOVÁ, Z.,
2065 MARTINKOVÁ, L., BOBER, P.; TRCHOVÁ, M.; STEJSKAL, J. Antimicrobial activity
2066 and cytotoxicity of cotton fabric coated with conducting polymers, polyaniline or
2067 polypyrrole, and with deposited silver nanoparticles. **Applied Surface**
2068 **Science**, v.396, p. 169-176, 2017.
- 2069 MARUTHAPANDI, M.; SARAVANAN, A.; LUONG, J. H.; GEDANKEN, A.
2070 Antimicrobial Properties of Polyaniline and Polypyrrole Decorated with Zinc-Doped
2071 Copper Oxide Microparticles. **Polymers**, v. 12, n. 6, 1286, 2020.
- 2072 MAZAHARI, T.; CERVANTES-HUAMÁN, B. R.; BERMÚDEZ-CAPDEVILA, M.;
2073 RIPOLES-AVILA, C.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. *Listeria monocytogenes* biofilms in
2074 the food industry: is the current hygiene program sufficient to combat the persistence
2075 of the pathogen?. **Microorganisms**, v. 9, n.1, p. 181, 2021.
- 2076 MAZZARRINO, G.; PAPARELLA, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; FABERI, A.; SERGI, M.;
2077 SIGISMONDI, C.; COMPAGNONE, D.;SERIO, A. *Salmonella enterica* and *Listeria*
2078 *monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential
2079 oils. **Food Control**, v. 50, p. 794-803, 2015.
- 2080 MCKNIGHT, SL.; IGLEWSKI, BH.; PESCI, EC. The *Pseudomonas* QuinoloneSignal
2081 Regula *rhl*QuorumSensing em *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of**
2082 **Bacteriology**,v.182, p. 2702–2708, 2000.

- 2083 MERINO, L.; PROCURA, F.; TREJO, F. M.; BUENO, D. J.; GOLOWCZYC, M. A.
2084 Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and
2085 eradication strategies. *Food Research International*, v. 119, p. 530-540, 2019.
- 2086 MICKYMARAY, S. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and
2087 bioactive compounds against clinically important pathogens. **Antibiotics**, v.8, n. 4, p.
2088 257, 2019.
- 2089 MILLEZI, A. F.; PICCOLI, R. H.; OLIVEIRA, J. M.; PEREIRA, M. O. Anti-biofilm and
2090 antibacterial effect of essential oils and their major compounds. **Journal of Essential**
2091 **Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 3, p. 624-631, 2016.
- 2092 MIRANDA, R. O.; CAMPOS-GALVÃO, M. E. M.; NERO, L. A. Expression of genes
2093 associated with stress conditions by *Listeria monocytogenes* in interaction with nisin
2094 producer *Lactococcus lactis*. **Food Research International**, v. 105, p. 897-904,
2095 2018.
- 2096 MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a
2097 paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in cellular and**
2098 **infection microbiology**, v. 7, n. 39, 2017.
- 2099 MOTA, J. D. O., BOUE, G., PREVOST, H., MAILLET, A., JAFFRES, E., MAIGNIEN,
2100 T.; ARNICH, N.; SANAA, M.; FEDERIGHI, M. Environmental monitoring program to
2101 support food microbiological safety and quality in food industries: a scoping review of
2102 the research and guidelines. **Food Control**, p. 108283, 2021.
- 2103 MULANI, M. S.; KAMBLE, E. E.; KUMKAR, S. N.; TAWRE, M. S.; PARDESI, K. R.
2104 Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial
2105 resistance: a review. **Frontiers in microbiology**, v.10, p. 539, 2019.
- 2106 NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V. D. Essential oils and
2107 antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.
- 2108 NIKOLIĆ M.; STOJKOVIĆ D.; GLAMOČLIJA J.; ĆIRIĆ A.; MARKOVIĆ T.;
2109 SMILJKOVIĆ M.; SOKOVIĆ M. Could essential oils of green and black pepper be
2110 used as food preservatives?. **Journal of food science and technology**, v.52, n.10,
2111 p. 6565-73, 2015.
- 2112 NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of
2113 nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential
2114 oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food**
2115 **control**, v. 84, p. 312-320, 2018.
- 2116 O'LEARY, D.; MCCABE, E. M.; MCCUSKER, M. P.; MARTINS, M.; FANNING, S.;
2117 DUFFY, G. Acid environments affect biofilm formation and gene expression in
2118 isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. **International journal of food**
2119 **microbiology**, v. 206, p. 7-16, 2015.
- 2120 OLSZEWSKA, M. A.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Inactivation and induction of sublethal
2121 injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. **Food**
2122 **Control**, v. 70, p. 371-379, 2016.

- 2123 OSAE, R.; APALIYA, M. T.; KWAW, E.; CHISEPO, M. T.; YARLEY, O. P. N.; ANTIRI,
2124 E. A.; ALOLGA, R. N. Drying techniques affect the quality and essential oil
2125 composition of Ghanaian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Industrial Crops and**
2126 **Products**, v.172, p. 114048, 2021.
- 2127 OYEDEMI, B. O.; KOTSIA, E. M.; STAPLETON, P. D.; GIBBONS, S. Capsaicin and
2128 gingerol analogues inhibit the growth of efflux-multidrug resistant bacteria and R-
2129 plasmids conjugal transfer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 245, p. 111871,
2130 2019.
- 2131 PANG, X.; YUK, H. G. Effects of the colonization sequence of *Listeria*
2132 *monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on survival of biofilm cells under
2133 food-related stresses and transfer to salmon. **Food microbiology**, v. 82, p. 142-150,
2134 2019.
- 2135 PANG, X.; CHEN, L.; YUK, H. G. Stress response and survival of *Salmonella*
2136 *Enteritidis* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*
2137 following repeated exposure to quaternary ammonium compounds. **International**
2138 **journal of food microbiology**, v. 325, p. 108643, 2020.
- 2139 PAPAIOANNOU, E.; GIAOURIS, E. D.; BERILLIS, P.; BOZIARIS, I. S. Dynamics of
2140 biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species
2141 and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection
2142 challenges. **International Journal of Food Microbiology**, v. 267, p. 9-19, 2018.
- 2143 PATHANIA, D.; SHARMA, M.; KUMAR, S.; THAKUR, P.; TORINO, E.; JANAS, D.;
2144 THAKUR, S. Essential oil derived biosynthesis of metallic nano-particles:
2145 Implementations above essence. **Sustainable Materials and Technologies**, v.30, p.
2146 e00352, 2021.
- 2147 PATWARDHAN, M.; MORGAN, M. T.; DIA, V.; D'SOUZA, D. H. Heat sensitization of
2148 hepatitis A virus and Tulane virus using grape seed extract, gingerol and
2149 curcumin. **Food microbiology**, v. 90, p. 103461, 2020.
- 2150 PAUL, D.; CHAKRABORTY, R.; MANDAL, S. M. Biocides and health-care agents are
2151 more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in
2152 microbes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 174, p. 601-610, 2019.
- 2153 PERIGO, C. V.; TORRES, R. B.; BERNACCI, L. C.; GUIMARAES, E. F.; HABER, L.
2154 L.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; QUECINI, V.; MARQUES, M. O. M. The
2155 chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct
2156 rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial crops and products**, v. 94, p.
2157 528-539, 2016.
- 2158 PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption,
2159 detachment or dispersion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 30, p. 67-78, 2016.
- 2160 PIETA, L.; GARCIA, F. B.; RIBOLDI, G. P.; DE OLIVEIRA, L. A. FRAZZON, A. P.
2161 G.; FRAZZON, J. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation,
2162 stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different
2163 temperatures. **Annals of microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1707-1714, 2014.

- 2164 PIRONTI, C.; DELL'ANNUNZIATA, F.; GIUGLIANO, R.; FOLLIERO, V.; GALDIERO,
2165 M.; RICCIARDI, M.; MOTTA, O.; PROTO, A.; FRANCI, G. Comparative analysis of
2166 peracetic acid (PAA) and permaleic acid (PMA) in disinfection processes. **Science of**
2167 **The Total Environment**, v. 797, p. 149206, 2021
- 2168 RAO, X.; HUANG, X.; ZHOU, Z.; LIN, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$
2169 method for quantitative real-time polymerase chain reaction data
2170 analysis. **Biostatistics, bioinformatics and biomathematics**, v.3, n.3, p.71, 2013.
- 2171 RAPOSO, A.; PÉREZ, E.; DE FARIA, C. T.; FERRÚS, M. A.; CARRASCOSA, C.
2172 Food spoilage by *Pseudomonas* spp.—an overview. **Food borne pathogens and**
2173 **antibiotic resistance**, p. 41-58, 2017.
- 2174 REIS-TEIXEIRA, F. B.; SOUSA, I. P.; ALVES, V. F.; FURTADO, N. A. J. C.; DE
2175 MARTINIS, E. C. P. Evaluation of lemongrass and ginger essential oils to inhibit
2176 *Listeria monocytogenes* in biofilms. **Journal of Food Safety**, v.39, n.4, p.e12627,
2177 2019.
- 2178 RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P.
2179 S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species
2180 biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.
- 2181 RIEDEL, C. U.; MONK, I. R.; CASEY, P. G.; WAIDMANN, M. S.; GAHAN, C. G.;
2182 HILL, C. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion,
2183 virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular**
2184 **microbiology**, v.71, n.5, p. 1177-1189, 2009.
- 2185 RIEU, A.; WEIDMANN, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Agr system of
2186 *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression
2187 pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 19, p. 6125-6133,
2188 2007.
- 2189 RIEU, A.; LEMAÎTRE, J. P.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species
2190 biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of
2191 *Staphylococcus aureus*. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 1-2,
2192 p. 76-82, 2008.
- 2193 RÍOS-CASTILLO, A. G.; RIPOLLES-AVILA, C.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Detection
2194 of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* biofilm cells exposed to
2195 different drying and pre-enrichment times using conventional and rapid
2196 methods. **International journal of food microbiology**, v.324, p.108611, 2020.
- 2197 RODRÍGUEZ-MELCÓN, C.; ALONSO-HERNANDO, A.; RIESCO-PELÁEZ, F.;
2198 GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Biovolume and
2199 spatial distribution of foodborne Gram-negative and Gram-positive pathogenic
2200 bacteria in mono- and dual-species biofilms. **Food Microbiology**, v. 94, p. 103616,
2201 2021.
- 2202 RÖMLING, U.; ROHDE, M.; OLSÉN, A.; NORMARK, S.; REINKÖSTER, J. AgrD, the
2203 checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium*
2204 regulates at least two independent pathways. **Molecular microbiology**, v.36, n. 1, p.
2205 10-23, 2000.

- 2206 ROSSI, C., SERIO, A., CHAVES-LÓPEZ, C., ANNIBALLI, F., AURICCHIO, B.,
2207 GOFFREDO, E.; CENCI-GOGA, B. T.; LISTA, F.; FILLO, S.; PAPARELLA, A. Biofilm
2208 formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the
2209 dairy industry. **Food Control**, v. 86, p. 241-248, 2018.
- 2210 ROSSI, C.; CHAVES-LÓPEZ, C.; MOŽINA, S. S.; MATTIA, C. D.; SCUOTA, S.;
2211 LUZZI, I.; JENIČ, T.; PAPARELLA, A.; SERIO, A. *Salmonella* enterica adhesion:
2212 Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on lettuce. **LWT - Food Science and**
2213 **Technology**, v. 111, p. 16-22, 2019.
- 2214 ROY, P. K., HA, A. J. W., MIZAN, M. F. R., HOSSAIN, M. I., ASHRAFUDOULLA, M.,
2215 TOUSHIK, S. H., NAHAR, S.; KIM, Y. K.; HA, S. D. Effects of environmental
2216 conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella*
2217 enterica serotype Kentucky and virulence gene expression. **Poultry Science**,p.
2218 101209, 2021.
- 2219 RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in Gram-positive and Gram-negative
2220 bacteria. **Microbiological Research**, v. 251, p. 126829, 2021
- 2221 SALEHI, B., ZAKARIA, Z. A., GYAWALI, R., IBRAHIM, S. A., RAJKOVIC, J.,
2222 SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.;
2223 VALUSSI, M.; TUMER, B. T.; FIDALGO, M. L.; MARTORELL, M. M.; SETZER, W. N.
2224 Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities
2225 and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p.1364, 2019.
- 2226 SCOBIE, A.; KANÁGARAJAH, S.; HARRIS, R.J.; BYRNE, L.; AMAR C.; GRANT, K.;
2227 GODBOLE, G. Mortality risk factors for listeriosis - A 10 year review of non-
2228 pregnancy associated cases in England 2006–2015. **Journal of Infection**, v. 78, p.
2229 208-214, 2019.
- 2230 SCORTTI, M.; MONZÓ, H. J.; LACHARME-LORA, L.; LEWIS, D. A.; VÁZQUEZ-
2231 BOLAND, J. A. The PrfA virulence regulon. **Microbes and Infection**, v. 9,n. 10, p.
2232 1196-1207, 2007.
- 2233 SEED, P. C.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B. H. Activation of the *Pseudomonas*
2234 aeruginosa *lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an
2235 autoinduction regulatory hierarchy. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 654-659,
2236 1995.
- 2237 SERENO, M.J.; VIANA, C.; PEGORARO, K.; DA SILVA, D. A. L.; YAMATOGLI, R. S.;
2238 NERO, L. A.; BERSOT, L. S. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic
2239 resistance of persistence *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil.
2240 **Food Microbiology**, v. 84, n. 103234, 2019.
- 2241 SHITYAKOV, S.; BIGDELIAN, E.; HUSSEIN, A. A.; HUSSAIN, M. B.; TRIPATHI, Y.
2242 C.; KHAN, M. U.; SHARIATI, M. A. Phytochemical and pharmacological attributes of
2243 piperine: A bioactive ingredient of black pepper. **European journal of medicinal**
2244 **chemistry**, v. 176, p. 149-161, 2019.
- 2245 SINGH, R. P.; GANGADHARAPPA, H. V.; MRUTHUNJAYA, K. Phytosome
2246 complexed with chitosan for gingerol delivery in the treatment of respiratory infection:

- 2247 In vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical**
2248 **Sciences**, v.122, p. 214-229, 2018.
- 2249 SIVASOTHY, Y.; CHONG, W. K.; HAMID, A.; ELDEEN, I. M.; SULAIMAN, S. F.;
2250 AWANG, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their
2251 antibacterial activities. **Food chemistry**, v. 124, n. 2, p. 514-517, 2011.
- 2252 SMITH, A.; HEARN, J.; WHEELHOUSE, C. T. N.; KACZMAREK, M.; MOORHOUSE,
2253 E.; SINGLETON, I. *Listeria monocytogenes* isolates from ready to eat plant produce
2254 are diverse and have virulence potential. **International Journal of Food**
2255 **Microbiology**, v. 299, p. 23-32, 2019.
- 2256 SOOWANNAYAN, C., BOONMEE, S., PUCKCHAROEN, S., ANATAMSOMBAT, T.,
2257 YATIP, P., NG, W. K.; THITAMADEE, S.; TUCHINDA, P.; MUNYOO, B.; CHABANG,
2258 N.; NUANGSAENG, B.; SONTHI, M.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Ginger and its
2259 component shogaol inhibit *Vibrio* biofilm formation in vitro and orally protect shrimp
2260 against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Aquaculture**, v. 504, p.
2261 139-147, 2019.
- 2262 SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; GIRÓN, J.A.; KAPER, J.B. Quorum Sensing Is a
2263 Global Regulatory Mechanism in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
2264 **Journal of Bacteriology**, n.17. p. 5187– 5197. 2001
- 2265 SRINIVASAN, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health
2266 beneficial potentials. **PharmaNutrition**, v. 5, n.1, p. 18-28, 2017.
- 2267 SUDAGIDAN, M.; OZALP, V. C.; ÖZTÜRK, O.; YURT, M. N. Z.; YAVUZ, O.;
2268 TASBASI, B. B.; UCAKS.; MAVILI, Z. S.; COBAN, A.; AYDIN, A. Bacterial surface,
2269 biofilm and virulence properties of *Listeria monocytogenes* strains isolated from
2270 smoked salmon and fish food contact surfaces. **Food Bioscience**, v. 41, p. 101021,
2271 2021.
- 2272 SOARES, V. M.; VIANA, C.; PEREIRA, J. G.; DESTRO, M. T.; NERO, L. A.; DOS
2273 SANTOS B. L.; PINTO, J. P. D. A. N. Absence of a continuous water spray system
2274 does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in chicken
2275 slaughterhouses. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97,p. 414-418, 2018.
- 2276 TADIELO, L. E. **Dinâmica da formação de biofilmes puros e mistos de *Listeria***
2277 ***monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* em superfície de polipropileno.**
2278 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Departamento de Medicina VETERINÁRIA,
2279 Universidade Federal do Paraná, Palotina (PR), 2020. Disponível em: <
2280 [https://www.prppg.ufpr.br/signa/visitante/trabalhoConclusaoWS?idpessoal=79074&idp](https://www.prppg.ufpr.br/signa/visitante/trabalhoConclusaoWS?idpessoal=79074&idprograma=40001016077P6&anobase=2020&idtc=71)
2281 [rograma=40001016077P6&anobase=2020&idtc=71](https://www.prppg.ufpr.br/signa/visitante/trabalhoConclusaoWS?idpessoal=79074&idprograma=40001016077P6&anobase=2020&idtc=71)>. Acessoem: 12/08/2021.
- 2282 TAKOOREE, H.; AUMEERUDDY, M. Z.; RENGASAMY, K. R.; VENUGOPALA, K.
2283 N.; JEEWON, R., ZENGIN, G.; MAHOMOODALLY, M. F. A systematic review on
2284 black pepper (*Piper nigrum* L.): From folk uses to pharmacological
2285 applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.59, n.1, p. 210-S243,
2286 2019.

- 2287 TAN, L. Y.; YIN, W. F.; CHAN, K. G. Piper nigrum, Piper betle and Gnetumgnemon-
2288 Natural Food Source with Anti-Quorum Sensing Properties. **Sensors**, v.13, n.3, p.
2289 3975-3985, 2013.
- 2290 TOKAM KUATÉ, C. R.; BISSO NDEZO, B.; DZOYEM, J. P. Synergistic Antibiofilm
2291 Effect of Thymol and Piperine in Combination with Aminoglycosides Antibiotics
2292 against Four Salmonella enterica Serovars. **Evidence-Based Complementary and**
2293 **Alternative Medicine**, 2021.
- 2294 TOMAŚ, N.; MYSZKA, K.; WOLKO, Ł.; NUC, K.; SZWENGIEL, A.; GRYGIER, A.;
2295 MAJCHER, M. Effect of black pepper essential oil on quorum sensing and efflux
2296 pump systems in the fish-borne spoiler *Pseudomonas psychrophila* KM02 identified
2297 by RNA-seq, RT-qPCR and molecular docking analyses. **Food Control**, p.
2298 108284, 2021.
- 2299 TURINA, A. D. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural
2300 terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical chemistry**, v. 122,
2301 n. 2, p. 101-113, 2006.
- 2302 VAZQUEZ-ARMENTA, F. J.; HERNANDEZ-OÑATE, M. A.; MARTINEZ-TELLEZ, M.
2303 A.; LOPEZ-ZAVALA, A. A.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; GUTIERREZ-PACHECO,
2304 M. M.; AYALA-ZAVALA, J. F. Quercetin repressed the stress response factor (sigB)
2305 and virulence genes (prfA, actA, inlA, and inlC), lower the adhesion, and biofilm
2306 development of *L. monocytogenes*. **Food microbiology**, v. 87, p. 103377, 2020.
- 2307 VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, J.; BUITEMEA-CANTÚA, G. V.; GUTIERREZ-VILLAGOMEZ,
2308 J. M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, J. P.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E.; MOLINA-TORRES, J.
2309 Bioautography and GC-MS based identification of piperine and trichostachine as the
2310 active quorum quenching compounds in black pepper. **Heliyon**, v.6, n.1, p. e03137,
2311 2020.
- 2312 VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; GALVÃO, J.A.; AMBRÓSIO, C.M.S.; GLORIA, E.M.;
2313 OETTERER, M. Single and binary applications of essential oils effectively control
2314 *Listeria monocytogenes* biofilms. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 452-
2315 460, 2018.
- 2316 VIANA, C.; SERENO, M.J.; PEGORARO, K.; YAMATOIGI, R. S.; CALL, D.R.;
2317 BERSOT, L. S.; NERO, L. A. Distribution, diversity, virulence genotypes and
2318 antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain.
2319 **International Journal of Food Microbiology**, v. 310, n. 108310, 2019.
- 2320 VIDÁCS, A.; KERÉKES, E.; RAJKÓ, R.; PETKOVITS, T.; ALHARBI, N. S.; KHALED,
2321 J. M.; VÁGVÖLGYI, C.; KRISCH, J. Optimization of essential oil-based natural
2322 disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on
2323 polypropylene surfaces. **Journal of Molecular Liquids**, v. 255, p.257-262, 2018.
- 2324 VIDAL, M. D. F. Evolução do cultivo de pimenta-do-reino na área de atuação do
2325 BNB. Caderno Setorial ETENE, a.5, v. 146, 2020. Disponível em:
2326 [https://www.bnb.gov.br/documents/80223/8330297/2020_CDS_146.pdf/32584f2b-](https://www.bnb.gov.br/documents/80223/8330297/2020_CDS_146.pdf/32584f2b-b9f9-9754-1fd3-d285be923804)
2327 [b9f9-9754-1fd3-d285be923804](https://www.bnb.gov.br/documents/80223/8330297/2020_CDS_146.pdf/32584f2b-b9f9-9754-1fd3-d285be923804) Acesso em: 21/10/2021

- 2328 WAHEED, H.; MEHMOOD, C. T.; YANG, Y.; TAN, W.; FU, S.; XIAO, Y. Dynamics of
2329 biofilms on different polymeric membranes—A comparative study using five
2330 physiologically and genetically distinct bacteria. **Journal of Membrane Science**,
2331 v.642, p.120000, 2021.
- 2332 WALMIKI, M. R.; RAVISHANKAR RAI, V. Cell attachment inhibition and anti-biofilm
2333 activity of *Syzygium aromaticum*, *Cuminum cyminum* and *Piper nigrum* essential oils
2334 against pathogenic bacteria. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.20, n.1, p.
2335 59-68, 2017.
- 2336 WANG, S.; ZHANG, C.; YANG, G.; YANG, Y. Biological properties of 6-gingerol: a
2337 brief review. **Natural product communications**, v. 9, n. 7, p. 1934578X1400900736,
2338 2014.
- 2339 WANG, H.; DONG, Y.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. Effect of growth media on gene
2340 expression levels in *Salmonella Typhimurium* biofilm formed on stainless steel
2341 surface. **Food control**, v. 59, p. 546-552, 2016.
- 2342 WANG, J.; LI, G.; YIN, H.; AN, T. Bacterial response mechanism during biofilm
2343 growth on different metal material substrates: EPS characteristics, oxidative stress
2344 and molecular regulatory network analysis. **Environmental research**, v. 185, p.
2345 109451, 2020.
- 2346 WHITE, A. P.; GIBSON, D. L.; KIM, W.; KAY, W. W.; SURETTE, M. G. Thin
2347 aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of
2348 *Salmonella*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3219-3227, 2006.
- 2349 WILLE, J.; COENYE, T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening
2350 Pandora's box?. **Biofilm**, v. 2, p. 100027, 2020.
- 2351 WU, D. Q.; CHENG, H.; DUAN, Q.; HUANG, W. Sodium houttuynfonate inhibits biofilm
2352 formation and alginate biosynthesis-associated gene expression in a clinical strain of
2353 *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 10,
2354 n. 2, p. 753-758, 2015.
- 2355 YAMAKAWA, T.; TOMITA, K.; SAWAI, J. Characteristics of biofilms formed by co-
2356 culture of *Listeria monocytogenes* with *Pseudomonas aeruginosa* at low
2357 temperatures and their sensitivity to antibacterial substances. **Biocontrol science**, v.
2358 23, n. 3, p. 107-119, 2018.
- 2359 YAMANI, L.; ALAMRI, A.; ALSULTAN, A.; ALFIFI, S.; ANSARI, M. A.; ALNIMR, A.
2360 Inverse correlation between biofilm production efficiency and antimicrobial resistance
2361 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial pathogenesis**, v. 157, p.
2362 104989, 2021.
- 2363 YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G.; GRESPAN, R.; KOHIYAMA, C. Y.; FERREIRA, F.
2364 D.; MOSSINI, S. A. G.; SILVA, E. L.; DE ABREU-FILHO, B. A.; MIKCHA, J. A. M.;
2365 JUNIOR, M. M. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides*
2366 and fumonisin production. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3147-3152, 2013.
- 2367 YANG, Y.; KHOO, W. J.; ZHENG, Q.; CHUNG, H. J.; YUK, H. G. Growth
2368 temperature alters *Salmonella Enteritidis* heat/acid resistance, membrane lipid

- 2369 composition and stress/virulence related gene expression. **International journal of**
2370 **food microbiology**, v.172, p.102-109, 2014.
- 2371 YIN, L.; ZHANG, Y.; AZI, F.; ZHOU, J.; LIU, X.; DAI, Y.; WANG, Z.; DONG, M.; XIA,
2372 X. Inhibition of biofilm formation and quorum sensing by soy isoflavones in
2373 *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Control**, v. 133, p. 108629, 2022.
- 2374 YOO, A. Y.; YU, J. E.; YOO, H.; LEE, T. H.; LEE, W. H.; OH, J. I.; KANG, H. Y. Role
2375 of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. **Biochemical and**
2376 **biophysical research communications**, v. 430, n. 1, p. 131-136, 2013.
- 2377 YOUSFI, F.; ABRIGACH, F.; PETROVIC, J. D.; SOKOVIC, M.; RAMDANI, M.
2378 Phytochemical screening and evaluation of the antioxidant and antibacterial potential
2379 of *Zingiber officinale* extracts. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 433-440,
2380 2021.
- 2381 ZHANG, F.; ZHANG, J. G.; QU, J.; ZHANG, Q.; PRASAD, C.; WEI, Z. J. Assessment
2382 of anti-cancerous potential of 6-gingerol (Tongling White Ginger) and its synergy with
2383 drugs on human cervical adenocarcinoma cells. **Food and chemical toxicology**, v.
2384 109, p. 910-922, 2017.
- 2385 ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; GARGOUR, Y.;
2386 SAYARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts,
2387 piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **Lwt-Food science and technology**, v.
2388 50, n. 2, p. 634-641, 2013.
- 2389 ZETZMANN, M.; SÁNCHEZ-KOPPER, A.; WAIDMANN, M. S.; BLOMBACH, B.;
2390 RIEDEL, C. U. Identification of the agr peptide of *Listeria monocytogenes*. **Frontiers**
2391 **in microbiology**, v. 7, n. 989, 2016.
- 2392 ZIECH, R. E.; PERIN, A. P.; LAMPUGNANI, C.; SERENO, M.J.; VIANA, C.;
2393 SOARES, V.M.; PEREIRA, J.G.; PINTO, J.P.A.N.; BERSOT, L.S. Biofilm-producing
2394 ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian
2395 poultry processing plants. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 85-90,
2396 2016.

Anexo 1: Determinação da concentração inibitória mínima dos OE de pimenta preta e gengibre em culturas individuais e mistas

Meio de cultura	OE	MIC (mg/ml)						
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	L+S	L+P	P+S	L+P+S
Muller Hinton (MH)	PP	25	200	200	50	100	100	100
População Total	GB	25	200	100	50	100	200	100
Ágar Oxford	PP	-	-	-	25	25	-	25
<i>L. monocytogenes</i>	GB	-	-	-	25	50	-	25
Ágar XLD	PP	-	-	-	50	-	100	100
<i>S.Typhimurium</i>	GB	-	-	-	50	-	200	100
Ágar Cetrimide	PP	-	-	-	-	100	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	GB	-	-	-	-	100	100	100

Anexo 2: Média $\pm$ desvio padrão das contagens bacterianas (UFC/cm²) na etapa de eliminação de biofilmes tratados com OEP (250 mg) ao longo de 96 h de contato

Microorganismos	Tratamentos	Tempo de contato					
		1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
População total	C+	6,24 ($\pm 0,28$) ^{B1; b2}	5,35 ($\pm 0,34$) ^{A; b}	5,89 ($\pm 0,56$) ^{AB; b}	6,66 ($\pm 1,14$) ^{BC; a}	7,35 ($\pm 0,60$) ^{C; b}	6,86 ($\pm 0,22$) ^{C; b}
	Eliminação	5,22 ($\pm 0,24$) ^{B; a}	3,77 ($\pm 1,17$) ^{A; a}	4,85 ($\pm 0,43$) ^{AB; a}	5,69 ($\pm 0,41$) ^{B; a}	5,75 ($\pm 0,56$) ^{C; a}	5,56 ($\pm 0,56$) ^{BC; a}
<i>L. monocytogenes</i>	C+	4,42 ($\pm 0,51$) ^{A; b}	4,87 ($\pm 1,41$) ^{AB; a}	5,72 ($\pm 0,25$) ^{B; b}	6,39 ($\pm 1,39$) ^{BC; a}	7,56 ($\pm 0,59$) ^{C; b}	6,97 ($\pm 0,33$) ^{C; b}
	Eliminação	2,97 ($\pm 0,65$) ^{A; a}	4,47 ($\pm 0,94$) ^{B; a}	3,49 ($\pm 0,30$) ^{AB; a}	4,83 ($\pm 0,40$) ^{B; a}	5,29 ($\pm 0,35$) ^{B; a}	4,83 ($\pm 0,52$) ^{B; a}
<i>S. Typhimurium</i>	C+	5,34 ($\pm 0,71$) ^{A; b}	5,02 ($\pm 0,44$) ^{A; a}	4,32 ($\pm 0,51$) ^{A; b}	5,22 ($\pm 0,96$) ^{A; a}	5,63 ($\pm 0,93$) ^{A; b}	5,26 ($\pm 0,88$) ^{A; b}
	Eliminação	3,82 ($\pm 0,44$) ^{AB; a}	4,60 ($\pm 0,68$) ^{B; a}	3,69 ($\pm 0,29$) ^{A; a}	4,02 ($\pm 0,44$) ^{AB; a}	4,39 ($\pm 0,38$) ^{B; a}	3,91 ($\pm 0,30$) ^{AB; a}
<i>P. aeruginosa</i>	C+	4,60 ($\pm 0,92$) ^{BC; a}	5,01 ($\pm 0,23$) ^{C; a}	3,30 ($\pm 0,34$) ^{A; a}	3,39 ($\pm 0,81$) ^{AB; a}	3,93 ($\pm 0,29$) ^{AB; a}	3,78 ($\pm 0,23$) ^{A; a}
	Eliminação	3,51 ($\pm 0,56$) ^{A; a}	4,64 ($\pm 0,75$) ^{B; a}	3,21 ($\pm 0,06$) ^{A; a}	3,01 ($\pm 0,38$) ^{A; a}	3,40 ($\pm 0,65$) ^{A; a}	3,34 ($\pm 0,60$) ^{A; a}

¹Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (P < 0,05) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tratamento) para o mesmo microorganismo. ²Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (P < 0,05) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tempo de contato) para o mesmo microorganismo.

Anexo 3: Média das contagens bacterianas (UFC/cm²) na etapa de formação de biofilmes tratados com OEP (100 mg e 50 mg) e piperina (12,5 mg e 25 mg) ao longo de 96 h de contato

Microorganismos	Tratamentos (mg/ml)	Tempo de contato					
		1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
População total	Pip 25	3,18 ^{A1a2}	3,84 ^{AB:a}	3,84 ^{AB:a}	4,10 ^{B:a}	4,23 ^{B:a}	3,89 ^{AB:a}
	Pip 12,5	4,99 ^{A:bc}	4,87 ^{A:b}	4,54 ^{A:ab}	5,01 ^{A:b}	4,33 ^{A:a}	4,79 ^{A:ab}
	PP 100	4,62 ^{A:b}	4,60 ^{A:b}	4,44 ^{A:ab}	5,60 ^{BC:c}	5,92 ^{C:b}	5,09 ^{AB:b}
	PP 50	5,22 ^{BC:c}	3,77 ^{A:a}	4,85 ^{B:b}	5,69 ^{C:c}	5,75 ^{C:b}	5,56 ^{C:b}
<i>L. monocytogenes</i>	Pip 25	2,62 ^{A:a}	2,90 ^{AB:a}	3,68 ^{B:a}	3,70 ^{B:ab}	3,77 ^{B:ab}	2,98 ^{AB:a}
	Pip 12,5	4,35 ^{AB:b}	3,84 ^{A:b}	3,66 ^{A:a}	4,40 ^{AB:bc}	4,32 ^{AB:b}	4,58 ^{B:c}
	PP 100	3,63 ^{B:ab}	2,77 ^{A:a}	2,94 ^{A:a}	3,25 ^{AB:a}	3,17 ^{AB:a}	3,74 ^{B:b}
	PP 50	2,97 ^{A:a}	4,47 ^{B:b}	3,49 ^{A:a}	4,83 ^{B:c}	5,29 ^{B:c}	4,83 ^{B:c}
<i>S. Typhimurium</i>	Pip 25	3,03 ^{A:a}	3,21 ^{A:a}	2,51 ^{A:a}	3,05 ^{A:a}	3,22 ^{A:a}	2,96 ^{A:a}
	Pip 12,5	5,03 ^{B:c}	4,01 ^{A:ab}	4,11 ^{A:b}	3,95 ^{A:b}	3,27 ^{A:a}	3,58 ^{A:ab}
	PP 100	4,00 ^{AB:b}	3,37 ^{A:a}	4,39 ^{B:b}	4,19 ^{B:b}	4,17 ^{B:ab}	3,43 ^{A:ab}
	PP 50	3,82 ^{A:ab}	4,60 ^{A:b}	3,69 ^{A:ab}	4,02 ^{A:b}	4,39 ^{A:b}	3,91 ^{A:b}
<i>P. aeruginosa</i>	Pip 25	2,87 ^{A:a}	2,57 ^{A:a}	2,51 ^{A:a}	3,03 ^{AB:a}	3,00 ^{AB:a}	3,59 ^{B:ab}
	Pip 12,5	4,51 ^{C:b}	4,10 ^{BC:b}	4,11 ^{BC:bc}	3,31 ^{A:a}	3,18 ^{A:a}	3,38 ^{AB:a}
	PP 100	4,39 ^{B:b}	3,47 ^{A:ab}	4,39 ^{B:c}	4,21 ^{B:b}	4,51 ^{B:b}	3,97 ^{AB:b}
	PP 50	3,51 ^{A:a}	4,64 ^{B:b}	3,69 ^{A:b}	3,01 ^{A:a}	3,40 ^{A:a}	3,34 ^{A:ab}

¹Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (P < 0,05) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tratamento) para o mesmo micro-organismo. ²Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (P < 0,05) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tempo de contato) para o mesmo micro-organismo.

Anexo 1: Média $\pm$ desvio padrão (UFC/cm²) de células planctônicas tratados com OE de GB ao longo 96 h de contato.

Microrganismos	Tratamentos	Tempo de contato					
		1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
População total	C+	8,19 ($\pm 0,24$)	8,48 ($\pm 0,00$)	8,40 ($\pm 0,47$)	8,73 ($\pm 0,30$)	9,35 ($\pm 0,26$)	9,06 ($\pm 0,40$)
	GB 50 mg	7,98 ($\pm 0,05$)	8,30 ($\pm 0,00$)	7,57 ($\pm 0,28$)	7,89 ($\pm 0,30$)	8,50 ($\pm 0,42$)	8,70 ($\pm 0,26$)
	GB 100 mg	8,19 ($\pm 0,24$)	8,37 ($\pm 0,20$)	7,59 ($\pm 0,02$)	7,93 ($\pm 0,16$)	7,88 ($\pm 0,27$)	7,74 ($\pm 0,22$)
<i>L. monocytogenes</i>	C+	7,67 ($\pm 0,3$)	7,04 ($\pm 1,20$)	7,92 ($\pm 0,65$)	8,25 ($\pm 0,62$)	8,64 ($\pm 0,50$)	8,90 ($\pm 0,18$)
	GB 50 mg	7,26 ($\pm 0,45$)	7,92 ($\pm 0,09$)	7,40 ($\pm 0,38$)	7,51 ($\pm 0,60$)	7,89 ($\pm 0,60$)	7,85 ($\pm 0,32$)
	GB 100 mg	8,19 ($\pm 0,24$)	7,90 ($\pm 0,19$)	7,53 ($\pm 0,04$)	7,50 ($\pm 0,06$)	7,46 ($\pm 0,28$)	7,50 ($\pm 0,05$)
<i>S. Typhimurium</i>	C+	6,83 ($\pm 0,97$)	7,93 ($\pm 0,03$)	8,12 ($\pm 0,41$)	8,44 ($\pm 0,57$)	9,10 ($\pm 0,25$)	8,71 ($\pm 0,66$)
	GB 50 mg	6,70 ($\pm 0,76$)	7,87 ($\pm 0,03$)	7,58 ($\pm 0,24$)	7,88 ($\pm 0,45$)	8,08 ($\pm 0,37$)	8,02 ($\pm 0,42$)
	GB 100 mg	7,92 ($\pm 0,57$)	7,35 ($\pm 0,26$)	6,82 ($\pm 0,21$)	7,29 ($\pm 0,16$)	6,71 ($\pm 0,28$)	6,60 ($\pm 0,17$)
<i>P. aeruginosa</i>	C+	7,05 ($\pm 0,54$)	8,74 ($\pm 0,30$)	7,27 ($\pm 0,20$)	7,49 ($\pm 0,41$)	7,44 ($\pm 0,43$)	7,35 ($\pm 0,40$)
	GB 50 mg	7,71 ($\pm 0,10$)	8,74 ($\pm 0,30$)	7,30 ($\pm 0,10$)	7,83 ($\pm 0,30$)	8,10 ($\pm 0,10$)	8,01 ($\pm 0,11$)
	GB 100 mg	7,68 ($\pm 0,14$)	7,69 ($\pm 0,11$)	7,22 ($\pm 0,17$)	7,20 ($\pm 0,09$)	7,07 ($\pm 0,08$)	7,48 ($\pm 0,26$)

Anexo 2: Média $\pm$ desvio padrão (UFC/cm²) de células sésseis tratados com OE de GB ao longo 96 h de contato

Microrganismos	Tratamentos	Tempo de contato					
		1 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
População total	C+	6,24 ($\pm 0,28$) ^{b1; AB2}	5,35 ($\pm 0,34$) ^{a; A}	5,89 ($\pm 0,56$) ^{b; AB}	6,66 ($\pm 1,14$) ^{b; BC}	7,35 ($\pm 0,60$) ^{b; C}	6,86 ($\pm 0,22$) ^{b; BC}
	GB 50 mg	5,01 ($\pm 0,65$) ^{ab; A}	5,17 ($\pm 1,21$) ^{a; A}	5,08 ($\pm 0,09$) ^{ab; A}	5,86 ($\pm 0,28$) ^{ab; A}	5,49 ($\pm 0,17$) ^{a; A}	5,70 ($\pm 0,21$) ^{a; A}
	GB 100 mg	4,31 ($\pm 0,12$) ^{a; A}	4,64 ($\pm 0,07$) ^{a; A}	4,66 ($\pm 0,18$) ^{a; A}	5,39 ($\pm 0,46$) ^{a; B}	4,89 ($\pm 0,29$) ^{a; A}	5,10 ($\pm 0,35$) ^{a; A}
<i>L. monocytogenes</i>	C+	4,42 ($\pm 0,51$) ^{b; A}	4,87 ($\pm 1,41$) ^{b; AB}	5,72 ($\pm 0,25$) ^{b; BC}	6,39 ($\pm 1,39$) ^{c; CD}	7,56 ($\pm 0,59$) ^{c; E}	6,97 ($\pm 0,33$) ^{c; DE}
	GB 50 mg	3,01 ($\pm 0,32$) ^{a; B}	4,05 ($\pm 0,08$) ^{ab; B}	3,95 ($\pm 0,80$) ^{a; AB}	5,30 ($\pm 0,29$) ^{b; C}	5,20 ($\pm 0,31$) ^{b; C}	4,86 ($\pm 0,67$) ^{b; BC}
	GB 100 mg	3,95 ($\pm 0,37$) ^{ab; B}	3,61 ($\pm 0,51$) ^{a; AB}	3,91 ($\pm 0,38$) ^{a; B}	3,95 ($\pm 0,33$) ^{a; B}	3,64 ($\pm 0,78$) ^{a; AB}	2,82 ($\pm 0,64$) ^{a; A}
<i>S. Typhimurium</i>	C+	5,34 ($\pm 0,71$) ^{b; AB}	5,02 ($\pm 0,44$) ^{b; AB}	4,32 ($\pm 0,51$) ^{ab; A}	5,22 ($\pm 0,96$) ^{a; AB}	5,63 ($\pm 0,93$) ^{b; B}	5,26 ($\pm 0,88$) ^{b; AB}
	GB 50 mg	4,15 ($\pm 0,59$) ^{a; A}	5,11 ($\pm 0,29$) ^{b; B}	3,95 ($\pm 0,25$) ^{a; A}	4,27 ($\pm 0,34$) ^{a; AB}	4,08 ($\pm 0,50$) ^{a; A}	4,26 ($\pm 0,31$) ^{ab; AB}
	GB 100 mg	4,08 ($\pm 0,39$) ^{a; AB}	3,72 ($\pm 0,45$) ^{a; A}	4,85 ($\pm 0,17$) ^{b; B}	5,01 ($\pm 0,60$) ^{a; B}	4,55 ($\pm 0,18$) ^{a; AB}	4,16 ($\pm 0,12$) ^{a; AB}
<i>P. aeruginosa</i>	C+	4,60 ($\pm 0,92$) ^{a; BC}	5,01 ($\pm 0,23$) ^{b; C}	3,30 ($\pm 0,34$) ^{a; A}	3,39 ($\pm 0,81$) ^{a; A}	3,93 ($\pm 0,29$) ^{a; AB}	3,78 ($\pm 0,23$) ^{ab; AB}
	GB 50 mg	3,80 ($\pm 0,60$) ^{a; A}	5,16 ($\pm 0,58$) ^{b; B}	3,74 ($\pm 0,15$) ^{ab; A}	3,80 ($\pm 0,25$) ^{a; A}	3,31 ($\pm 0,40$) ^{a; A}	3,23 ($\pm 1,15$) ^{a; A}
	GB 100 mg	3,91 ($\pm 0,61$) ^{a; A}	3,92 ($\pm 0,51$) ^{a; A}	4,27 ($\pm 0,40$) ^{b; A}	4,15 ($\pm 0,81$) ^{a; A}	3,87 ($\pm 0,33$) ^{a; A}	4,30 ($\pm 0,40$) ^{b; A}

¹Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (P < 0,05) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tratamento) para o mesmo micro-organismo.²Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (P < 0,05) pelo teste de Mann-Whitney (fixado o tempo de contato) para o mesmo micro-organismo.