

NANCY SAYURI UCHIDA

EFEITO DO CARVACROL SOBRE BIOFILMES DE *Salmonella* spp. EM
AÇO INOXIDÁVEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de concentração: Saúde Humana

Orientadora: Prof^a Dr^a Jane Martha G. Mikcha

Maringá
2012

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais, a minha irmã e a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido sabedoria, saúde, proteção e força para que hoje eu pudesse concluir mais uma etapa de minha formação. Obrigada, Senhor!

Aos meus pais e irmãs, pelo apoio, confiança, incentivo, compreensão e carinho, durante toda a caminhada para conquista do meu título de mestre.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Jane Martha Graton Mikcha, pela confiança quando aceitou me orientar e pela ajuda durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Aparecida Donizeti Bidóia e Manoel Nogueira pelo, carinho e apoio, que sempre a disposição me ajudou em tudo, quando foi necessário.

As minhas colegas de laboratório Michelle Piovezan e Simone Hoffmann pelos momentos de descontração e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman e Dr^ª. Renata Grespan que sempre estiveram à disposição quando precisei.

A Prof^ª. Dr^ª. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski por contribuições na banca de qualificação.

A Cristiane Shinobo (laboratório de micologia); Felipe R. Fernandes (departamento de farmácia); Izabel (autoclave); Eliana, Angelo e Regina Cintia Carnelós (COMCAP); Aline Castilho e Edilene Gobbi (laboratório de bacteriologia); Eliana Guilhermetti e Viviane Amaral (laboratório microbiologia) **e a todos** que direta ou indiretamente ajudaram em meu trabalho, o meu sincero agradecimento !

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas do:

Journal of Applied Microbiology

Disponível em:

<[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)13652672/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)13652672/homepage/ForAuthors.html) >

SUMÁRIO

Artigo: EFEITO DO CARVACROL SOBRE BIOFILMES DE *Salmonella* spp. EM AÇO INOXIDÁVEL

| | |
|--------------------|----|
| Resumo | 09 |
| Abstract | 10 |
| Introdução | 11 |
| Material e Métodos | 12 |
| Resultados | 16 |
| Discussão | 17 |
| Referências | 21 |
| Anexo | 29 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do carvacrol sobre isolados de Salmonella spp. utilizados no presente estudo | 25 |
| Tabela 2 Efeito do carvacrol sobre o biofilme formado e o biofilme em formação na superfície de aço inox por S.Saintpaul..... | 26 |
| Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura do biofilme formado em 48 h sem tratamento com carvacrol. (A) aumento de 600 (B) aumento de 1500 aumento de 3000(C)..... | 27 |
| Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura do biofilme formado (I) e do biofilme em formação (II) por S. Saintpaul em superfície de aço inoxidável sem tratamento (A) e tratados com carvacrol $117 \mu\text{g ml}^{-1}$ (B); $78 \mu\text{g ml}^{-1}$ (C) e $39 \mu\text{g ml}^{-1}$ (D). Aumento de 1500x | 28 |

**Artigo: “EFEITO DO CARVACROL SOBRE BIOFILMES DE
Salmonella spp. EM AÇO INOXIDÁVEL”**

EFEITO DO CARVACROL SOBRE BIOFILMES DE *Salmonella* spp. EM AÇO INOXIDÁVEL

Effect of carvacrol on *Salmonella* spp. biofilms on stainless steel surface

N. S. Uchida¹, M. Piovezan¹, R. Grespan¹, E. C. Ferreira¹, J. M. G. Mikcha²

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

2 Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina

Av. Colombo, 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do carvacrol sobre biofilmes por *Salmonella* spp. em aço inoxidável.

Métodos e Resultados: O efeito do carvacrol em células planctônicas foi avaliado pela determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima. A eficiência do carvacrol em biofilmes de *Salmonella* spp. na superfície de aço inox foi avaliada no biofilme já formado e em formação pela contagem do número de células bacterianas aderidas e pela visualização por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram forte atividade antimicrobiana do carvacrol em células planctônicas de *Salmonella* spp. A maior diminuição do número de células aderidas na superfície de aço inox ocorreu no biofilme em formação quando exposto ao carvacrol nas diferentes concentrações sub-inibitórias testadas.

Conclusão: O carvacrol reduziu o número de células bacterianas aderidas em superfície de aço, mostrando que este composto pode ser uma alternativa para o controle de *Salmonella* spp.

Significância e Impacto do estudo: Infecção por *Salmonella* spp. constitui um problema de saúde pública em muitos países e sua capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies torna difícil sua eliminação sendo importante investigar a ação de compostos que sejam eficazes para seu controle.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., biofilme, carvacrol, aço inoxidável.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of carvacrol on *Salmonella* spp. biofilms on stainless steel surface.

Methods and Results: The effect of carvacrol on planktonic cells was evaluated by determining minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration. The action of carvacrol on *Salmonella* spp. biofilms on stainless steel surface was evaluated on mature biofilm and on biofilm formation by enumerating the number of bacterial cells adhered and by scanning electron microscopy. A strong antimicrobial activity of carvacrol in planktonic cells of *Salmonella* spp. was observed. The highest inhibitory activity of carvacrol was observed on biofilm formation at different sub inhibitory concentrations tested.

Conclusion: The carvacrol reduced the number of bacterial cells adhered to stainless steel surface, which makes it a potential compound for *Salmonella* spp. control.

Significance and Impact Study: *Salmonella* spp. infection is a public health problem in many countries. Due to difficulty of eliminating *Salmonella* spp. in biofilms, studies of alternative compounds for its control are essential.

Keywords: *Salmonella* spp. biofilm, carvacrol, stainless steel

1. Introdução

Infecção por *Salmonella* constitui um problema de saúde pública em muitos países. Milhões de casos de salmonelose são relatados em todo o mundo (WHO, 2011). Estima-se que nos Estados Unidos, *Salmonella* spp. seja a principal bactéria causadora de doenças transmitidas por alimentos, sendo responsável por mais de 1 milhão de casos, cerca de 19.000 hospitalizações e 378 mortes a cada ano (CDC - *Center for Disease Control and Prevention* 2011a). Além disso, o índice de salmonelose nos Estados Unidos não diminuiu há 15 anos. A redução deste índice é difícil, pois *Salmonella* spp. é encontrada em vários tipos de alimentos, inclusive naqueles processados (CDC 2011b).

A capacidade de *Salmonella* spp. aderir e formar biofilme é reconhecida como um dos fatores que contribuem para sua resistência e persistência em diversos ambientes e é especialmente importante em locais onde se processam alimentos (Steenackers *et al.* 2012). Em indústrias alimentares, as superfícies de equipamentos e utensílios são conhecidas por serem os principais locais de adesão de bactérias e formação de biofilme, conseqüentemente atuam como fonte potencial de contaminação que pode levar à deterioração de alimentos ou transmissão de doenças por alimentos (Chmielewski e Frank 2003; Shi e Zhu 2009; Van Houdt e Michiels 2010; Oliveira *et al.* 2010).

Várias estratégias para controlar a adesão bacteriana em superfícies têm sido propostas, entre elas a utilização de produtos naturais. Vários estudos têm demonstrado a ação dos óleos essenciais na adesão de bactérias em diferentes superfícies (Pérez-Conesa *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2010).

O carvacrol é um componente importante dos óleos essenciais de orégano e tomilho, é considerado um antimicrobiano de amplo espectro, eficaz contra bactérias e fungos (Burt 2004; Tiwari *et al.* 2009). Embora o efeito antimicrobiano do carvacrol seja bem documentado, poucos trabalhos avaliaram sua ação na adesão bacteriana (Knowles e Roller 2001; Knowles *et al.* 2005; Pérez-Conesa *et al.* 2006; Nostro *et al.* 2007; Pérez-Conesa *et al.* 2011; Soumya *et al.* 2011).

O efeito do carvacrol sobre biofilmes bacterianos foi demonstrado frente a várias bactérias em diferentes superfícies: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* aderidos em poliestireno (Nostro *et al.* 2007); *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157: H7 em aço inox e em membranas de policarbonato (Pérez-

Conesa *et al.* 2006; Pérez-Conesa *et al.* 2011) e *Pseudomonas aeruginosa* em poliestireno (Soumya *et al.* 2011). Além disso, Iannitelli *et al.* (2011) comprovaram a capacidade de nanopartículas de carvacrol desestruturar biofilmes formados por *S. epidermidis*.

A ação do carvacrol na aderência de *Salmonella* Typhimurium NCTC 74, *L. monocytogenes* NCTC 11994, *S. aureus* NCTC 10788 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 87 em aço inoxidável foi avaliada por Knowles e Roller (2001) e por Knowles *et al.* (2005), contudo de acordo com o nosso conhecimento não há relatos da ação do carvacrol sobre a aderência de sorotipos de *Salmonella* isolados de diferentes fontes.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação do carvacrol em biofilmes de *Salmonella* spp. isolada de alimentos incriminados em surtos de doença transmitida por alimentos e de matéria-prima para alimentação animal em aço inoxidável.

2. Materiais e Métodos

2.1 Micro-organismos

Foram utilizados 10 isolados de *Salmonella* de diferentes sorotipos, provenientes de alimentos incriminados em surtos de doença transmitida por alimentos e de matéria-prima para alimentação animal que estavam armazenados em bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá (Tabela 1).

2.2 Efeito do carvacrol em células planctônicas

A concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol (Sigma-Aldrich, Germany, 98% de pureza) foi determinada utilizando método de micro diluição em caldo segundo o documento M7-A8 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2009). O carvacrol foi diluído em etanol e testado em concentrações finais que variaram de 19 a 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A cada concentração de carvacrol foram adicionados 10 μl da suspensão bacteriana padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de Mc Farland e diluída de forma a obter 5×10^5 UFC ml^{-1} (unidades formadoras de

colônia por mililitro). Após incubação a 35°C por 18 a 24 h a CIM foi determinada em leitor de microplaca (Asys Expert Plus) a 620 nm e também foi realizada leitura visual. A CIM foi considerada como a menor concentração do carvacrol que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Foram incluídos no teste, controle de crescimento bacteriano em Caldo Mueller Hinton (MHB – Difco™, France) e etanol 0,5% (v/v) e controle do carvacrol em MHB. A ampicilina foi usada como droga padrão nas concentrações de 0.5 µg ml⁻¹ a 128 µg ml⁻¹, frente à *E. coli* ATCC 25922.

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foram retirados 10 µl dos poços onde não ocorreu crescimento microbiano visível. Estes foram semeados em placa contendo Ágar Hektoen (Difco™, France) e incubados a 35°C durante 18 a 24 h. A CBM foi considerada como a menor concentração do carvacrol que não permitiu crescimento bacteriano.

2.3 Formação de biofilme em microplaca de poliestireno

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços (TPP®) de acordo com a metodologia proposta por Stepanovic *et al.* (2004) com modificações. Os isolados bacterianos foram cultivados em Tryptic Soy Broth (TSB - Merck, Darmstadt, Germany) a 35°C *overnight* e diluídos 1:100 no mesmo meio de cultura de forma a obter 10⁷ UFC ml⁻¹, confirmado através da contagem de UFC em placas de Hektoen.

Foram colocados 100 µl do cultivo bacteriano nos 96 orifícios das microplacas que foram incubadas a 35°C por 24 h. O conteúdo dos poços foi aspirado, as microplacas foram lavadas com solução salina 0,85% estéril (SSE) estéril e coradas com Cristal Violeta 1% por 10 min. O excesso de corante foi removido por lavagem com água destilada, as microplacas foram secas, o corante ligado às células bacterianas aderidas foi solubilizado com 200 µl de etanol 95% e em seguida foi realizada a leitura em leitor de microplaca em 550nm. O controle negativo foi realizado utilizando TSB estéril e os controles positivos foram *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Os isolados de *Salmonella* spp. foram classificados em não aderentes, fracamente aderentes, moderadamente aderentes e fortemente aderentes segundo Stepanovic *et al.* (2004) comparando as absorbâncias encontradas para cada isolado com o controle negativo.

2.4 Formação de biofilme em aço

2.4.1 Superfície de aço inoxidável

Foram utilizados cupons de aço inox AISI 304 (1 x 8 x 9 mm). Todos os cupons foram lavados individualmente por imersão em acetona 100%, secos e limpos com álcool a 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram lavados com água destilada, secos por 2 h a 60°C e autoclavados a 121°C por 15 min.

2.4.2 Preparação do inóculo bacteriano

Para a formação de biofilme em aço foi escolhido um isolado bacteriano pertencente ao sorotipo Saintpaul selecionado por demonstrar melhores resultados nos ensaios de formação de biofilmes em microplaca.

Este micro-organismo foi cultivado em TSB a 35°C *overnight*, diluído 1:100 no mesmo meio de cultura de forma a obter 10^7 UFC ml⁻¹, confirmado através da contagem de UFC em placas de Hektoen.

2.4.3 Formação do biofilme

Os cupons de aço inox foram individualmente dispostos em microtubos estéreis, em triplicata, contendo 1500 µl do cultivo bacteriano (item 2.4.2) e incubados a 35°C por 24 h. Depois da incubação o conteúdo foi aspirado, substituído por 1500 µl de TSB e os microtubos foram reincubados a 35°C por 24 h. Para o controle negativo foi utilizado TSB estéril e para controles positivos *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 700603.

2.5 Efeito do carvacrol no biofilme

2.5.1 Biofilme formado

Após a formação do biofilme em aço inox por 48 h (item 2.4.3), os cupons com as bactérias aderidas foram lavados com SSE e expostos ao carvacrol nas concentrações de 39 µg ml⁻¹, 78 µg ml⁻¹ e 117 µg ml⁻¹, que correspondem a 25%, 50% e 75% da CIM, respectivamente, por 1 h em temperatura ambiente. Foi incluído no experimento controle da formação de biofilme sem carvacrol. Os testes foram realizados em triplicata em dois experimentos diferentes.

2.5.2 Biofilme em formação

Para a avaliação do efeito do carvacrol na formação do biofilme, o carvacrol nas mesmas concentrações ($39 \mu\text{g ml}^{-1}$, $78 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $117 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi adicionado aos microtubos, contendo os cupons e o inóculo bacteriano preparado conforme descrito no item 2.4.3. Após as primeiras 24 h de incubação o conteúdo dos microtubos foi substituído por 1500 μl de TSB seguido de incubação a 35°C por 24 h. Foi incluído no teste controle da formação de biofilme com mesmo inóculo e sem carvacrol. Os testes foram realizados em triplicata com duas repetições independentes.

2.6 Enumeração das células bacterianas aderidas

Após as 48 horas de incubação o conteúdo dos microtubos foi aspirado, os cupons controles (sem adição de carvacrol) e os cupons expostos às diferentes concentrações de carvacrol foram lavados com PBS estéril, colocados em SSE e submetidos a banho de ultra som a 25 Hz por 5 min (Ultra Cleaner 750A, Unique). Foram realizadas diluições seriadas em SSE que foram semeadas em Ágar Muller-Hinton (MHA - Himedia[®], Índia) e incubadas a 35°C por 24 h. Os resultados foram expressos em $\log \text{UFC cm}^{-2}$.

2.7 Microscopia eletrônica de varredura

A formação de biofilme em aço inoxidável foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) segundo Marques *et al.* (2007) com modificações. Os cupons foram lavados com SSE, fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e mantidos por até 48 h sob refrigeração. Os cupons foram lavados duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e desidratados uma vez em etanol nas concentrações de 50, 70, 80, 90 e duas vezes em etanol 100%. As amostras foram submetidas ao ponto crítico em CO_2 e recobertas com ouro no metalizador (Shimadzu IC-50) para posterior leitura em microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu, SS-550 Superscan).

2.8 Análise Estatística

Análise estatística foi realizada nos *softwares* Statistica 8.0 e R 2.14.0. Foram utilizadas medidas descritivas (média e desvio padrão) seguidos do teste-*t* para comparação da diferença entre o grupo controle com os grupos tratados com o carvacrol. Os níveis de significância estatística foram estabelecidos em $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Efeito do carvacrol em células planctônicas

Foi evidenciada uma CIM de $156 \mu\text{g ml}^{-1}$ de carvacrol frente as células planctônicas de oito isolados de *Salmonella* spp. e de $312 \mu\text{g ml}^{-1}$ para dois isolados. A CBM foi idêntica à CIM nos dez isolados bacterianos avaliados (Tabela 1).

3.2 Formação do biofilme em microplaca de poliestireno

A densidade óptica (DO) variou de 2,0 a 0,59 em nove isolados de *Salmonella* spp. que foram considerados fortemente aderentes. Um isolado, *Salmonella* Anatum, foi considerado moderadamente aderente, com DO de 0,18. Os controles positivos, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, mostraram-se fortemente aderentes com DO de aproximadamente 2,5.

3.3 Formação do biofilme em aço

O número de células de *S. Saintpaul* aderidas na superfície de aço inox foi de aproximadamente $8 \log \text{UFC cm}^{-2}$ (Tabela 2). A adesão bacteriana em aço ocorreu uniformemente como demonstra Fig. 1.

3.4 Efeito do carvacrol sobre o biofilme formado

A ação do carvacrol em biofilmes previamente formados por *S. Saintpaul* em aço inox está apresentada na Tabela 2. A maior redução nas contagens bacterianas foi verificada na presença de $117 \mu\text{g ml}^{-1}$ de carvacrol (75% da CIM), em que foi observada uma diminuição de aproximadamente 3 ciclos log na contagem bacteriana. No entanto, a redução nas contagens bacterianas não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$) em nenhuma das concentrações sub-inibitórias testadas (75%, 50% e 25% da CIM), comparando o grupo controle com os que receberam tratamento com o carvacrol.

Na análise do efeito do carvacrol em biofilmes previamente formados em aço inox por MEV (Fig. 2) foi observada redução na adesão bacteriana nos cupons tratados com maiores concentrações de carvacrol quando comparado com cupon controle sem tratamento.

3.5 Efeito do carvacrol no biofilme em formação

A redução do número de células de *S. Saintpaul* aderidas no aço inox após o tratamento com carvacrol está apresentada na Tabela 2. Foi observada redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em biofilmes tratados com as três concentrações $39 \mu\text{g ml}^{-1}$, $78 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $117 \mu\text{g ml}^{-1}$ (25%, 50% e 75% da CIM) de carvacrol respectivamente.

A observação por MEV, apresentada na Fig. 2, mostra a ação do carvacrol nas três concentrações testadas, durante a formação do biofilme por *S. Saintpaul* em aço. O biofilme foi reduzido, sendo quase ausente em 75% da CIM.

4 Discussão

No presente estudo foi avaliada a ação do carvacrol sobre células planctônicas e biofilmes de *Salmonella* spp. Este composto apresentou forte atividade antimicrobiana e inibiu a formação de biofilme por *S. Saintpaul* em aço inox.

Biofilmes por *Salmonella* spp. em superfícies de contato com os alimentos estão amplamente difundidos nos ambientes de processamento de alimentos (Steenackers *et al.* 2012). A utilização do carvacrol, como agente antimicrobiano é uma alternativa eficaz para o controle de *Salmonella* spp. (Zhou *et al.* 2007). No entanto, poucos estudos têm relatado a ação do carvacrol na adesão por *Salmonella* spp. em superfícies de aço inoxidável (Knowles e Roller 2001; Knowles *et al.* 2005).

O carvacrol foi capaz de inibir o crescimento bacteriano nas concentrações de $156 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $312 \mu\text{g ml}^{-1}$, indicando atividade antimicrobiana forte, segundo a classificação proposta por Aligiannis *et al.* (2001), além de apresentar efeito bactericida em concentrações coincidentes à CIM. Rivas *et al.* (2010) e Zhou *et al.* (2007), comprovaram o efeito antimicrobiano do carvacrol contra *S. Typhimurium* nas concentrações de 400, 800, 1000 e 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, superiores às encontradas no presente trabalho.

A atividade antibacteriana do carvacrol tem sido atribuída aos seus efeitos sobre as propriedades estruturais e funcionais da membrana. Devido à natureza hidrofóbica do carvacrol, este composto interage com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática, causando perda de integridade e de extravazamento do

material celular, tais como íons, ATP e ácido nucléico (Xu *et al.* 2008; Bajpai *et al.* 2012).

Na avaliação da formação de biofilme em placas de poliestireno, nove isolados foram considerados fortemente aderentes, segundo classificação proposta por Stepanovic *et al.* (2004), confirmando os resultados obtidos por estes autores em *Salmonella* spp. isoladas de humanos, animais e alimentos, avaliando a mesma superfície. Solomon *et al.* (2005) comprovaram que todos os isolados de *Salmonella* spp., incluindo *S. Saintpaul*, formaram biofilme em poliestireno independente da fonte do micro-organismo. A maioria das amostras de *S. Typhimurium* testadas por Malcova *et al.* (2008), foi altamente capaz de formar biofilme neste material.

No presente estudo *S. Saintpaul* foi o sorotipo mais eficiente em aderir em microplaca de poliestireno, por esta razão foi escolhido para os estudos de formação de biofilme sobre aço inox. Este sorotipo também é de grande interesse, pois foi um dos mais frequentemente identificados em surtos de salmonelose reportados ao CDC no ano de 2008 (CDC 2008) e continua sendo isolado de vários alimentos incriminados em surtos (Beutlich *et al.* 2010; Mody *et al.* 2011). Além disso, Frausto e Oliveira (2011) identificaram *S. Saintpaul* como um dos sorotipos mais frequentemente isolados de carne frango no ano de 2009 no Paraná.

Na formação de biofilme sobre aço inox, o número de células de *S. Saintpaul* aderidas após 48 h de incubação foi de 7,61 e 8,77 log UFC cm⁻². Esses achados estão de acordo com vários estudos que avaliaram a formação de biofilme por *Salmonella* spp. em aço utilizando períodos de incubação de 12 a 120 h e obtiveram contagens variando de 5,26 a 8,01 UFC cm⁻² (Kim e Wei 2007; Jun *et al.* 2010; Speranza *et al.* 2011). Kim e Wei (2007) verificaram que a adesão inicial de *Salmonella* spp. em aço ocorreu após 12 h de incubação, com formação de microcolônias após 24 h, e após 48 h de incubação o biofilme maduro se encontrava formado. De acordo com Andrade *et al.* (1998), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de células aderidas de 10⁷ UFC cm⁻² (7 log UFC cm⁻²) enquanto Ronner e Wong (1993) e Wirtanen *et al.* (1996) consideram como biofilme um número de 10⁵ e 10³ UFC cm⁻² (5 log e 3 log UFC cm⁻²), respectivamente. Sugerindo que a adesão bacteriana encontrada neste estudo indica a formação de biofilme sobre aço inox.

Conforme a fig 1, a adesão bacteriana em aço foi uniforme, as bactérias apresentavam-se individualizadas sem presença de agregados bacterianos e de

matriz extracelular. Padrão semelhante ao encontrado por Kim e Wei (2007), em cultivo realizado em caldo de alface, entretanto houve formação de microcolônias quando *Salmonella* foi cultivada em caldo de carne e caldo de peru. De fato, segundo Steenackers *et al.* (2012) os componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* spp. variam consideravelmente com as condições ambientais o que pode explicar este resultado.

Carvacrol foi pouco eficiente sobre o biofilme previamente formado, a maior ação do carvacrol ocorreu com o tratamento utilizando 75% da CIM de carvacrol, porém esta redução não foi estatisticamente significativa quando comparado ao biofilme controle (Tabela 2). Por outro lado o efeito do carvacrol no biofilme em formação foi mais significativo. Os resultados demonstraram que o tratamento com as três concentrações de carvacrol resultaram em diminuição significativa do número de células aderidas aos cupons, comparado ao controle (Tabela 2).

Esses resultados podem ser explicados pelas características da formação do biofilme que ocorre em duas fases, durante a fase inicial a adesão é reversível e as bactérias são facilmente removidas pela aplicação de força mínima (Chmielewski e Frank 2003), por outro lado, no biofilme maduro a adesão é irreversível e a remoção das células é mais difícil. Nesse caso seria necessário aplicação de uma força mecânica ou interrupção química da aderência por aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfetantes ou calor (Oliveira *et al.* 2010).

Nos estudos realizados por Knowles e Roller (2001), o carvacrol em pequenas concentrações (0,5 mM) também não teve efeito nos biofilmes formados por *S. Typhimurium*, mas na maior concentração (2,0 mM) o carvacrol reduziu 2,6 log CFU/superfície evidenciando um efeito dependente da concentração.

Segundo Knowles *et al.* (2005), durante as 24 h iniciais do desenvolvimento do biofilme sobre aço, o número de células viáveis de *S. Typhimurium* foi reduzido em 3 log UFC quando tratadas com 1 mmol/h (150 µg ml⁻¹) de carvacrol. Após esse período houve uma recuperação rápida do número de células viáveis que excedeu ou se igualou ao número de células no biofilme sem tratamento. No biofilme maduro de *S. Typhimurium*, após 12 dias de formação, o carvacrol (1mmol/h) também causou uma redução de 3 log após a exposição inicial e uma média de redução de 1 log durante o tratamento subsequente.

Nostro *et al.* (2007), também observaram diferenças significativas na formação de biofilme por *S. aureus* e *S. epidermidis* quando tratado com diferentes

concentrações de carvacrol. A concentração de 0,5 da CIM produziu maior redução no número de bactérias aderidas em microplacas. Os autores observaram pela MEV que na presença de carvacrol na concentração de 0,25 da CIM a quantidade de biofilme já foi reduzida, sendo quase ausente em 0,5 da CIM.

Bons resultados também foram observados por Perez-Conesa *et al.* (2011), com carvacrol encapsulado, na inativação de biofilmes em aço inox por *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7. A avaliação da morfologia do biofilme e da viabilidade celular demonstrou um aumento do número de células mortas quando o biofilme era tratado com carvacrol, além da diminuição nas contagens bacterianas.

O mecanismo exato de inibição de biofilmes bacterianos pelo carvacrol não está elucidado. Segundo Knowles *et al.* (2005) a exposição contínua dos biofilmes bacterianos ao carvacrol levou a uma potente redução na concentração de proteínas e inibição da formação da matriz extracelular. Alternativamente, os compostos fenólicos, como o carvacrol, podem interagir com as proteínas, levando a uma alteração da superfície bacteriana e comprometendo, em parte, a fase de adesão inicial (Juven *et al.* 1994). De acordo com Nostro *et al.* (2007), o carvacrol, devido à sua hidrofobicidade, pode se difundir através da matriz polissacarídica do biofilme e desestabilizá-lo devido à sua potente propriedade antimicrobiana.

Nossos resultados demonstraram que o carvacrol foi capaz de reduzir o número de células bacterianas aderidas, durante o processo de formação de biofilme por *Salmonella* spp. sobre aço inox e mostra que este composto pode ser uma alternativa para o controle de *Salmonella* spp. Uma ação do carvacrol em conjunto com outros compostos naturais pode aumentar seu efeito contra biofilmes bacterianos e até mesmo substituir o uso de produtos químicos na desinfecção de superfícies durante a produção de alimentos.

Agradecimentos

Ao Programa Nacional de Pós-Doutorado - MEC/CAPES e MCT/FINEP e ao Complexo de Central de Apoio a Pesquisa (COMCAP) MCT/FINEP/UEM.

REFERÊNCIAS

- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., and Chinou, I.B. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* **49**, 4168-4170.
- Andrade, N. S., Bridgeman, T.A. and Zotolla E.A. (1998) Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached too stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot* **61**, 833 – 838.
- Bajpai, V.K., Baek, K-H. and Kang, S.H. (2012) Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *J Food Research Int* in press.
- Beutlich J., Rodríguez I., Schroeter A., Kaßbohrer A., Helmuth R., and Guerra B. (2010) A predominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Saintpaul clonal line in German turkey and related food products. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3657-3667.
- Burt, S.A. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods—a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223–253.
- CDC Center for Disease Control and Prevention (2008) Outbreak of *Salmonella* Serotype Saintpaul Infections Associated with Multiple Raw Produce Items — United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **57**, 929-934.
- CDC Center for Disease Control and Prevention (2011a) Estimates of Foodborne Illness in the United State. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html> Acesso em: 21 de nov de 2011.
- CDC Center for Disease Control and Prevention (2011b) Making Food Safer to Eat. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/FoodSafety/index.html> Acesso em: 21 de nov de 2011.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Int J Food Sci Technol* **2**, 22–32.
- CLSI Clinical Laboratory Standards Institute (2009) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, approved standard M07-A8. **29** Clinical Laboratory Standards Institute.
- Frausto, H. S. and Oliveira, T. C. R. M. (2011) Sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carne de frango produzida no Paraná em 2009. Tese mestrado. Universidade Estadual de Londrina.
- Iannitelli, A., Grande, R., Di Stefano, A., Di Giulio, M, Sozio, P., Bessa, L.J., Laserra, S., Paolini, C., Protasi, F. and Cellini, L. (2011) Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *Int J Mol Sci* **12**, 5039-5051.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. (1994) Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* **76**, 626–631.

Jun, W., Kim, M.S., Cho, B-K., Millner, P.D., Chao, K. and Chan, D.E. (2010) Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *J Food Engineering* **99**, 314–322.

Kim, S-H. and Wei, C-I. (2007) Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT 104 and other pathogens. *J Food Prot* **70**, 22 - 29.

Knowles, J. and Roller, S. (2001) Efficacy of chitosan, carvacrol and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *J Food Prot* **64**, 1542– 1548.

Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B. and Naidu, A. S. (2005) Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* **71**, 797–803.

Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R. and Rychlik, I. (2008) Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Vet Microbiol* **129**, 360–366.

Marques S.C., Rezende J.G.O.S., Alves L.A.F., Silva B.C., Alves E., Abreu L.R. and Piccoli R.H. (2007) Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol* **38**, 538-543.

Mody, R.K, Greene,S.A., Gaul,L., Sever,A., Pichette, S., Zambrana, I., Dang,T., Gass, A., Wood R., Herman,K., Cantwell, L. B., Falkenhorst, G., Wannemuehler, K., Hoekstra, R.M., McCullum, I., Cone, A., Franklin, L., Austin, J., Delea, K., Behravesh, C.B., Sodha, S.V., Yee, J.C., Emanuel, B., Al-Khaldi, S.F., Jefferson, V., Williams, I.T., Griffin, P.M. and Swerdlow, D.L. (2011) National outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections: importance of Texas restaurant investigations in implicating jalapeno peppers. *PLoS ONE* **6**, 1-7.

Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F. and Blanco, A. R. (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol* **56**, 519–523.

Oliveira, M. M. M., Brugnera, D.F, Cardoso, M. G., Alves E. and Piccoli, R.H. (2010) Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* **21**, 549–553.

- Perez-Conesa, D., McLandsborough, L. and Weiss, J. (2006) Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot* **69**, 2947–2954.
- Pérez-Conesa, D., Cao, J., Chen, L., McLandsborough, L., and Weiss, J. (2011) Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot* **74**, 55–62.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. and Duffy, G. (2010) Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol* **139**, 70–78.
- Ronner, A.B. and Wong, A.C.L. (1993) Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless-steel and buna-N rubber. *J Food Prot* **56**, 750-758.
- Shi, X. and Zhu, X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Food Science & Technology* **20**, 407- 413.
- Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M. and Annous, B.A.A. (2005) Biofilm Formation, Cellulose Production, and Curli Biosynthesis by *Salmonella* Originating from Produce, Animal, and Clinical Sources. *J Food Prot* **68**, 906–912.
- Soumya, E. A., Saad, I. K., Hassan, L., Ghizlane, Z., Hind, M. and Adnane, R. (2011) Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. *African J Microbiol Research* **5**, 3229-3232.
- Speranza, B., Corbo, M.R. and Sinigaglia, M. (2011) Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *J Food Sci* **76**, 12 – 16.
- Steenackers, H., Hermans K., Vanderleyden J. and De Keersmaecker, S.C.J. (2012) *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *J Food Research Int* in press.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L. and Svabic-Vlahovic, M. (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* **38**, 428–432.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., Donnell, C.P.O, Muthukumarappan, K., Bourk, E.P. and Cullen, P.J. (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Che* **57**, 5987–6000.
- Van Houdt, R. and Michiels, C.W. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* **109**, 1117–1131.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.-P., Pei, R.-S. and Xu, N. (2008) The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* **47**, 174–179.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang H., Yang, Z., Li, J., Li, J. and Yan, W. (2007) The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations

against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium. *J. Food Safety* **27**, 124-133.

Wirtanen, G., Husmark, U. and Mattila-Sandholm T. (1996) Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food processing systems. *J Food Prot* **59**, 727-733.

WHO. World Health Organization (2011) Drug-resistant *Salmonella*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> Acesso em 21 de nov de 2011.

Tabela 1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do carvacrol sobre isolados de *Salmonella* spp. utilizados no presente estudo

| Identificação | Sorotipo | Fonte | CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | CBM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) |
|---------------|----------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 642/98 | Schwarzengrund | Macarronada com sardinha e maionese | 156 | 156 |
| 730/96 | Enteritidis | Recheio de coxinha de carne e frango | 156 | 156 |
| 1640/01 | Coeln | Pavê | 156 | 156 |
| 66/99 | Infantis | Linguça frescal | 156 | 156 |
| 502/00 | Enteritidis | Couro de boi | 156 | 156 |
| 312/02 | Anatum | Farinha de carne e osso | 312 | 312 |
| 1044/97 | Riesen | Farinha de carne e osso | 312 | 312 |
| 510/03 | Saintpaul | Farinha de sangue | 156 | 156 |
| 406/02 | London | Couro de boi | 156 | 156 |
| 284/95 | Mbandaka | Crisálida congelada | 156 | 156 |

Tabela 2 Efeito do carvacrol sobre o biofilme formado e o biofilme em formação na superfície de aço inox por *S. Saintpaul*.

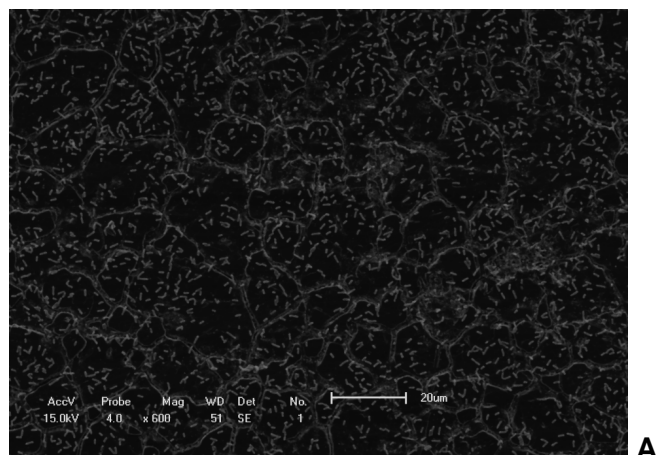
| Biofilme | Concentração de carvacrol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)* | log UFC cm^{-2} | DP | <i>P</i> valor † |
|-------------|--|--------------------------|-------|------------------|
| Formado | 0 | 7,61 | 0,900 | Referência |
| | 117 | 4,76 | 4,179 | 0,3126 |
| | 78 | 6,49 | 1,732 | 0,3762 |
| | 39 | 8,25 | 0,366 | 0,3182 |
| Em formação | 0 | 8,77 | 0,113 | Referência |
| | 117 | 5,18 | 0,233 | 0,00001‡ |
| | 78 | 5,35 | 0,078 | 0,00001‡ |
| | 39 | 7,00 | 0,620 | 0,0082 ‡ |

Testes realizados em triplicata em dois experimentos diferentes

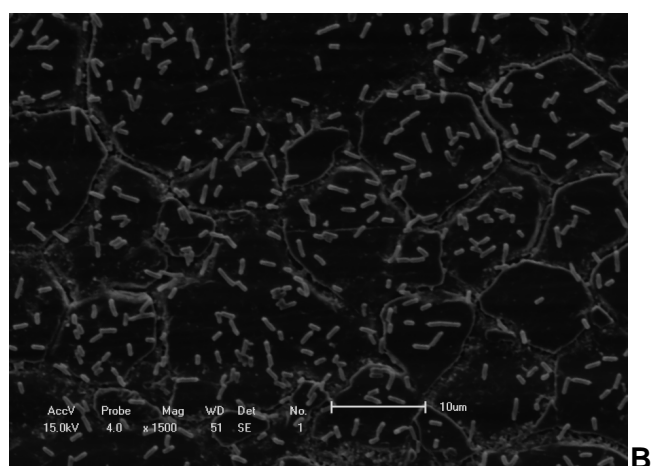
* $117 \mu\text{g ml}^{-1}$ (75% CIM); $78 \mu\text{g ml}^{-1}$ (50% CIM) e $39 \mu\text{g ml}^{-1}$ (25% CIM)

† Teste *t* não pareado utilizando como referência o grupo sem tratamento

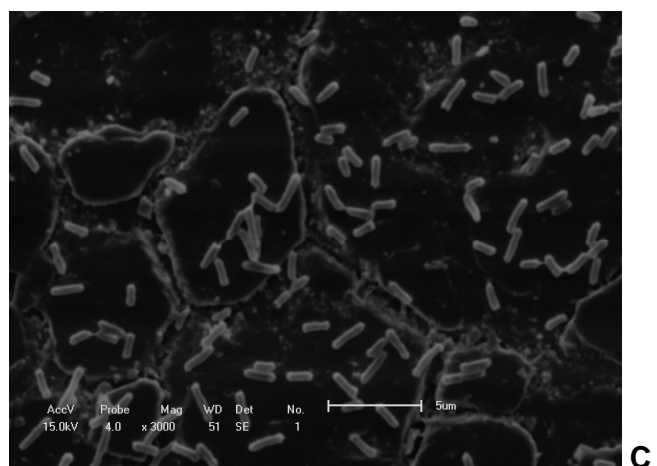
‡ Existe diferença entre as médias *P* valor <0,05



A



B



C

Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura do biofilme formado em 48 h sem tratamento com carvacrol. (A) aumento de 600 (B) aumento de 1500 (C) aumento de 3000x.

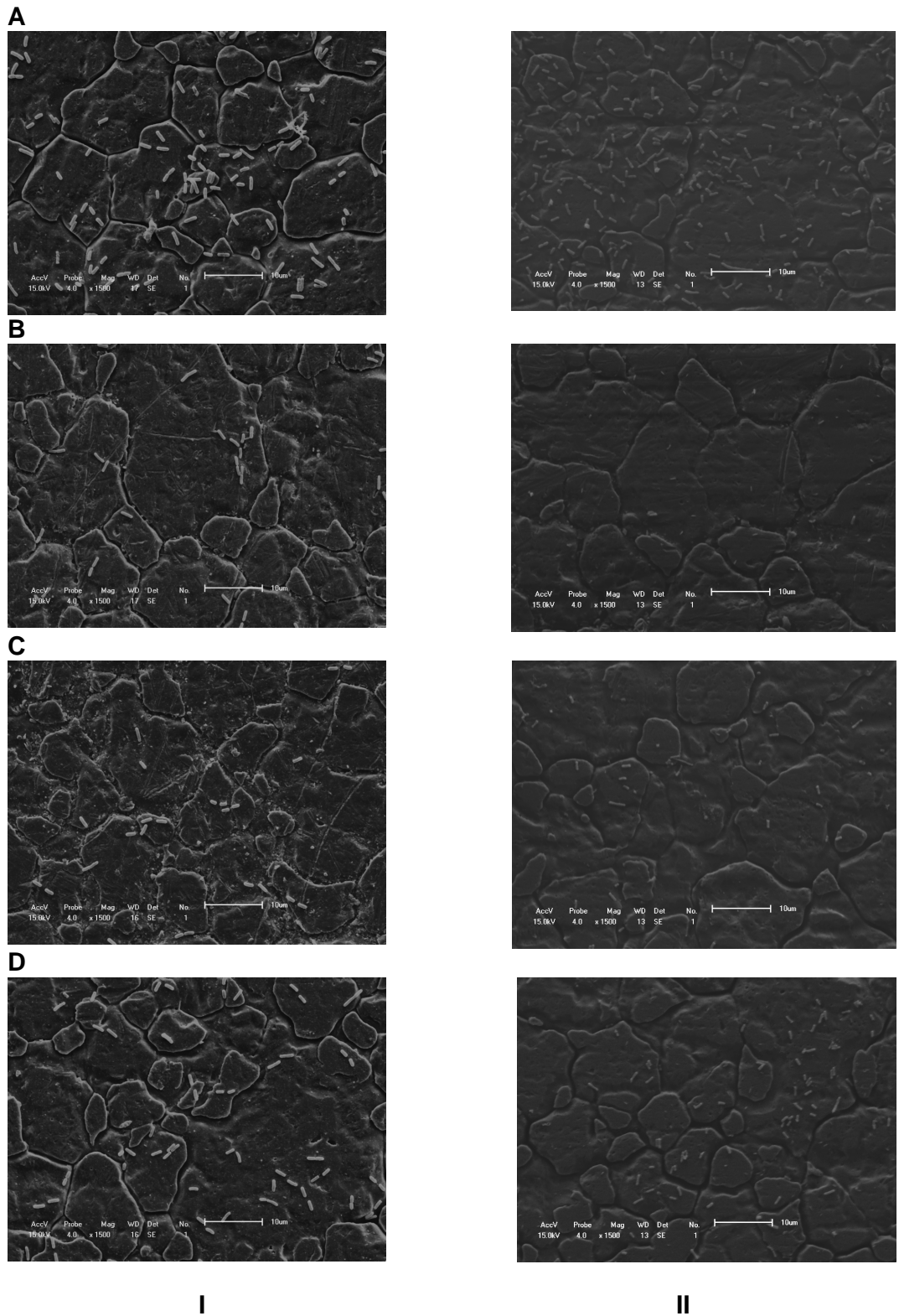


Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura do biofilme formado (I) e do biofilme em formação (II) por *S. Saintpaul* em superfície de aço inoxidável sem tratamento (A) e tratados com carvacrol $117 \mu\text{g ml}^{-1}$ (B); $78 \mu\text{g ml}^{-1}$ (C) e $39 \mu\text{g ml}^{-1}$ (D). Aumento de 1500x.

ANEXO