

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LUMA GONÇALVES JULIO

**ATUAÇÃO DE NANOCOMPOSTO A BASE DE SÁLVIA NO CONTROLE DA
MOTILIDADE PLASMIDIAL EM BIOFILMES DE *Escherichia coli* e *Salmonella*
Heidelberg**

Uberlândia
2023

LUMA GONÇALVES JULIO

**ATUAÇÃO DE NANOCOMPOSTO A BASE DE SÁLVIA NO CONTROLE DA
MOTILIDADE PLASMIDIAL EM BIOFILMES DE *Escherichia coli* e *Salmonella*
Heidelberg**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel.

Área de concentração: Medicina Veterinária

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daise Aparecida Rossi

Coorientadora: MV. Rosanne Aparecida Capanema
Ribeiro

Uberlândia

2023

LUMA GONÇALVES JULIO

**ATUAÇÃO DE NANOCOMPOSTO A BASE DE SÁLVIA NO CONTROLE DA
MOTILIDADE PLASMIDIAL EM BIOFILMES DE *Escherichia coli* e *Salmonella*
Heidelberg**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel.

Uberlândia, 04 de dezembro de 2023

Banca Examinadora:

Daise Aparecida Rossi – Doutorado (UFU)

Micaela Guidotti Takeuchi – Mestrado (UFU)

Eliane Pereira Mendonça – Doutorado (UFU)

Dedico este trabalho ao meu noivo, minha
mãe, tias, irmãs e avós, que foram minhas
inspirações.

AGRADECIMENTOS

Manifesto minha imensa gratidão a Deus e à espiritualidade que zela para que tudo seja exatamente como deveria ser.

Às queridas professoras Daise e Roberta, assim como minha amiga e co-orientadora Rosanne, cujas orientações e acolhimento foram como faróis em meu caminho.

Ao meu noivo, Richard, a luz que ilumina meus olhos, minha gratidão ultrapassa os limites dessa vida. Sua presença é um bálsamo em minha jornada, seu amor me dignifica. Minha família, sempre incentivadora deste grande sonho, merece todo reconhecimento.

Às minhas avós, Sônia e Denise, que foram casa e aconchego; aos meus avôs, que me guiam e me protegem de onde estão; à minha mãe, Lyana, e ao tio Felipe, que me amaram incondicionalmente, me deram asas e, pacientemente, aguardaram meu retorno; às minhas irmãs, Luiza e Maria, e aos meus primos, Luana, Lara, Julia, Luiz Mario, Lia, Sara e Alice, por serem alicerces que me impulsionam a buscar por um futuro que estimo para eles.

Às minhas tias, Ana Luiza e Luciana, que me inspiraram e nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos Ana Clara, Marcelly, Mard, Julia Silva, Amanda e todos os integrantes do GOB, minha profunda gratidão por permanecerem e serem sempre o que precisei.

À CONAVET, por ter sido um espaço para meu desenvolvimento pessoal e profissional, e pelas amizades conquistadas ao longo deste percurso.

É imprescindível mencionar a equipe do Labio e ao Lepmol cuja colaboração fora essencial.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida, permitindo-me dedicar integralmente ao desenvolvimento acadêmico.

“Nada na vida deve ser temido,
somente compreendido. Agora é hora
de compreender mais para temer
menos.”

(Marie Curie)

RESUMO

Biofilmes bacterianos representam um grave problema para a indústria alimentícia, incluindo a facilitação de processos de trocas gênicas entre as bactérias, determinantes para a aquisição de fatores de virulência e adaptação, com destaque para a resistência antimicrobiana. As condições do ambiente industrial intensifica o processo de formação de estruturas bacterianas sésseis e a nanotecnologia surge como proposta inovadora para o seu controle. Objetivou-se avaliar a frequência de conjugação de biofilmes mistos de *Escherichia coli* e *Salmonella* Heidelberg sob condições que mimetizam o ambiente industrial (presença de soro de leite) e o potencial efeito de nanocompostos a base de sálvia de controle da formação dessa estrutura. Foram utilizadas *S. Heidelberg* como doadora do gene *bla_{TEM}* e a cepa de *E. coli* J53 como receptora, que foram submetidas ao processo de conjugação *overnight*. A frequência de conjugação do gene *bla_{TEM}* foi realizada por método fenotípico (contagem em meio seletivo) na presença e ausência de soro de leite e nanocomposto a base de sálvia. A comparação entre os grupos controle e os tratados com nanocomposto de sálvia, na presença e ausência de soro de leite, revelaram que a frequência de conjugação foi, respectivamente, de 2,85 e 3,18 vezes menor na presença do nanocomposto. As contagens médias bacterianas (log UFC/mL) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as transconjugantes tratadas com o nanocomposto de sálvia sem adição de soro de leite ($5,84 \pm 0,61$) em comparação com o grupo controle sem o soro ($6,30 \pm 0,37$). Contudo, as contagens nos tratamentos com sálvia na presença de soro de leite ($6,57 \pm 0,53$), em comparação ao controle também suplementado ($6,59 \pm 0,47$) não apresentaram diferença. O uso de nanopartículas de sálvia demonstrou ser promissor no controle da transferência do gene *bla_{TEM}* em biofilmes sem soro de leite mistos de *S. Heidelberg* e *E. coli*. A presença de soro de leite potencializou a frequência de trocas gênicas, e na presença deste coproduto, o nanocomposto de sálvia não foi um agente mitigador destes eventos.

Palavras-chave: *Salmonella* Heidelberg; *Escherichia coli*; Resistência antimicrobiana; Soro de leite; Sálvia.

ABSTRACT

Bacterial biofilms represent a serious problem for the food industry, including the facilitation of gene exchange processes between bacteria, determining the acquisition of virulence and adaptation factors, with emphasis on antimicrobial resistance. The conditions of the industrial environment intensify the process of formation of sessile bacterial structures and nanotechnology appears as an innovative proposal for its control. The objective was to evaluate the frequency of conjugation of mixed biofilms of *Escherichia coli* and *Salmonella* Heidelberg under conditions that mimic the industrial environment (presence of whey) and the effect of sage-based nanocompounds on this process. *S. Heidelberg* was used as a donor for the *bla*_{TEM} gene and the *E. coli* J53 strain as a recipient, which were subjected to the overnight conjugation process. The frequency of conjugation of the *bla*_{TEM} gene was performed using a phenotypic (selective medium count) in the presence and absence of whey and sage-based nanocomposite. Comparison between the control groups and those treated with sage nanocompound, in the presence and absence of whey, revealed that the conjugation frequency was 2.85 and 3.18 times lower in the presence of the nanocompound. The average counts (log CFU/mL) showed statistically significant differences between the transconjugants treated with the sage nanocomposite without the addition of whey (5.84 ± 0.61) compared to the traditional control group (6.30 ± 0.37). However, the counts in treatments with sage in the presence of whey (6.57 ± 0.53), compared to the control also supplemented (6.59 ± 0.47) showed no difference. The use of sage nanoparticles has shown promise in controlling gene exchange and mitigating *bla*_{TEM} gene transfer in traditional mixed *S. Heidelberg* and *E. coli* biofilms. The presence of whey increased the frequency of gene exchanges, and in the presence of this co-product, the sage nanocomposite was not a mitigating agent for these events.

Keywords: *Salmonella* Heidelberg; *Escherichia coli*; Antimicrobial resistance; Whey; Sage.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	<i>Salmonella</i> spp.....	13
2.2	<i>Escherichia coli</i>.....	14
2.3	Resistência microbiana e biofilmes	16
2.4	Soro de Leite.....	18
2.5	Nanocomposto de óleo essencial de sálvia	19
3	METODOLOGIA.....	21
3.1	Cepas.....	21
3.2	Concentração Inibitória Mínima.....	21
3.3	Coproducto Soro de Leite	21
3.4	Nanocomposto de óleo essencial de sálvia	21
3.5	Conjugação bacteriana em biofilme misto e inibição da transferência horizontal de genes.....	22
3.6	Frequência de Conjugação.....	23
3.7	Avaliação dos Resultados	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos consistem em uma comunidade de micro-organismos que está permanentemente aderida a uma superfície e envolta por uma matriz de substância polimérica. A formação de biofilmes consiste em um desafio significativo para a indústria alimentar (Carrascosa *et al.*, 2021). Além disso, as bactérias em forma sésil presentes no biofilme têm suas trocas gênicas potencialmente facilitadas em relação àquelas sob forma planctônica, o que, consequentemente pode facilitar na aquisição de fatores de virulência e resistência antimicrobiana (Srey *et al.*, 2013). O ambiente das indústrias alimentícias fornece condições propícias para a formação da forma sésil devido ao acúmulo de matéria orgânica, o que provoca avarias nos equipamentos e aumenta os custos de energia. Estas alterações podem ainda desencadear a contaminação dos alimentos por patógenos e favorecer a aceleração da sua deterioração (Brooks; Flint, 2008).

Nesse contexto, a nanotecnologia, a qual envolve, essencialmente, o processamento de materiais por meio da separação, união e alteração de sua estrutura por um único átomo ou molécula (Taniguchi, 1974), surge como uma proposta inovadora e promissora para lidar com o problema dos biofilmes e das trocas gênicas indesejadas.

A escolha das cepas de *Salmonella* Heidelberg, isoladas de carcaças de frango, como doadora, e *Escherichia coli* J53 como receptora, bem como a análise da conjugação por métodos fenotípicos e genotípicos, permitem uma avaliação abrangente de como as condições industriais influenciam as trocas gênicas entre essas bactérias patogênicas.

Este estudo é justificado pela relevância do tema, uma vez que as consequências das trocas gênicas entre bactérias e a formação de biofilmes são bem documentadas e preocupantes na indústria alimentícia. A pesquisa oferece uma abordagem inovadora para mitigar esse problema e, assim, promover a segurança dos alimentos.

As doenças de transmissão hídrica e alimentar abrangem uma diversidade de condições de saúde que afetam o sistema gastrointestinal e são um desafio relevante para a saúde pública global, exercendo impacto significativo sobre os índices de morbidade e mortalidade.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, em 2018, aproximadamente 600 milhões de indivíduos, equivalente a quase 1 em cada 10 pessoas, globalmente, contraem Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) anualmente, resultando em 420.000 óbitos. Crianças menores de 5 anos carregam 40% da carga relacionada as DTA, com um registro de 125.000 mortes a cada ano (OMS, 2018).

Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência de conjugação em biofilmes mistos de *E. coli* e *Salmonella* Heidelberg, simulando condições típicas do ambiente da indústria de laticínios, pela utilização de soro de leite, e também investigar o potencial efeito inibidor de nanocompostos a base de sálvia nesse processo, minimizando a formação de biofilmes e a transferência do gene *bla_{TEM}*, o qual confere resistência à ampicilina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* spp

Salmonella spp pertence à família Enterobacteriaceae. O gênero é um dos principais agentes causadores de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) em todo o mundo (Maijala *et al.*, 2005; Khan; Shamim, 2022), por possuir reconhecida habilidade de colonizar o trato gastrointestinal humano. São micro-organismos extremamente versáteis, com mais de 2.500 sorovares classificados com base em suas propriedades antigênicas (WHO, 2018).

Nos Estados Unidos, estima-se que anualmente ocorram cerca de 1,35 milhão de infecções e 420 óbitos decorrentes da infecção por *Salmonella* não tifoide, com uma incidência de 15,2 casos a cada 100.000 indivíduos (CDC, 2023).

A capacidade invasiva das salmonelas, aliada à produção de toxinas e enzimas, desempenha um papel crucial na indução de sintomas característicos de DTHA, como gastroenterite, náuseas e diarreia. Ainda, a prevalência de bactérias do gênero *Salmonella* como agente causador de DTHA impõe um ônus significativo à saúde pública, resultando em elevados índices de morbidade e, em casos extremos, mortalidade (CDC, 2023).

Esses micro-organismos são amplamente distribuídos em animais domésticos e selvagens, incluindo animais de produção, como aves, suínos e bovinos, podendo passar por toda a cadeia alimentar (Teklemariam *et al.*, 2023), desde a alimentação animal, a produção primária e até aos agregados familiares ou estabelecimentos e instituições de serviços alimentares. Além disso, a transmissão de pessoa para pessoa também pode ocorrer por via fecal-oral (Shinohara *et al.*, 2008).

A frequência e a persistência de *Salmonella* no trato intestinal de animais de produção (Wang *et al.*, 2023) estão aumentando devido a uma série de fatores, incluindo o uso de antibióticos na produção animal (Cortez *et al.*, 2022; Collignon e McEwen, 2019), a complexidade da cadeia de produção de alimentos e as condições de vida desses animais, incluindo o contato com animais silvestres (Wang *et al.*, 2023).

Ademais, os indivíduos infectados podem continuar a excretar a bactéria nas fezes por semanas ou meses, mesmo após os sintomas terem desaparecido. Esses animais são chamados de portadores crônicos ou assintomáticos e são um importante reservatório (Shinohara *et al.*, 2008).

As infecções não tifoïdes são causadas por outras espécies que geralmente são adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados, como carne crua ou mal cozida, ovos,

leite não pasteurizado e vegetais crus. Os sintomas são semelhantes aos da febre tifoide, mas são geralmente menos graves (Bush; Vazquez-Pertejo, 2022; WHO, 2018).

O sorovares de *Salmonella* não tifoide (NTS) mais importantes epidemiologicamente, como Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Newport, estão associados a uma alta incidência de surtos de origem alimentar em humanos em todo o mundo (Jajere, 2019). Em especial, a *Salmonella* Heidelberg é um agente patogênico que pode causar doenças graves em humanos, com risco evidente para crianças (Rice; Craven, Wells, 1976). A combinação de fatores, incluindo diferenças na susceptibilidade do hospedeiro, fatores de virulência da bactéria, aptidão do sorovar e alterações fenotípicas ou genotípicas ao longo do tempo, pode ter contribuído para sua evolução como um patógeno significativo (Núncio *et al.*, 2022).

Os antibióticos recomendados para tratar infecções mais graves por *Salmonella* não tifoide são a ciprofloxacina, ceftriaxona e ampicilina (Gut *et al.*, 2018). Contudo, os níveis de resistência observados em *Salmonella* isoladas de surtos alimentares em relação aos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos tem aumentado consideravelmente (Nair; Venkitanarayanan, Kollanoor, 2018).

De acordo com um estudo de Nair, Venkitanarayanan e Kollanoor (2018), uma estratégia comumente adotada por bactérias para resistir aos β -lactâmicos envolve a desativação desses antimicrobianos por meio de hidrólise enzimática pelas enzimas β -lactamases de amplo espectro. Essa resistência apresenta uma ameaça substancial, especialmente quando se considera a eficácia dos tratamentos com antimicrobianos.

Dai *et al.* (2021) constataram a existência de diversos genes de resistência em *Salmonella* Enteritidis, incluindo a presença do gene *bla_{TEM}* em 76% das amostras. Esse gene é associado a resistência aos β -lactâmicos em bactérias do gênero *Salmonella* (Walsh *et al.*, 2008).

2.2 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria bacilar gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente a família Enterobacteriaceae (Bettelheim, 1994; Edwards; Ewing, 1962) que estão presentes na microbiota intestinal de humanos e animais em condições simbióticas (Drasar; Hill, 1974). No entanto, algumas cepas podem causar doenças em humanos, sendo responsáveis por uma ampla gama de infecções, incluindo gastroenterite e infecções sistêmicas (Nataro; Kaper, 1998), infecções do trato urinário (Figueiró-Filho *et al.*, 2009) e infecções do trato respiratório (Sader *et al.*, 2001).

Os patótipos de *E. coli* se diferenciam com base nos antígenos somáticos, flagelares e capsulares e são classificados com base nos sintomas das doenças, fatores de virulência e características sorológicas. *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é associada a patologias intestinais, enquanto a enterotoxigênica (ETEC) induz a quadros de intoxicação alimentar. Já a enteroinvasiva (EIEC) invade as células intestinais, causando sintomas semelhantes aos de disenteria e a produtora de toxina shiga ou verotoxigênica (STEC ou VTEC) está relacionada à síndrome hemolítica-urêmica (SHU). Um subtipo específico da enterohemorrágica (EHEC), a enteragregativa (EAEC) forma agregados nas células intestinais, enquanto a difusamente aderente (DAEC) está implicada em casos de diarreia (Russo; Johnson, 2000; Asae, 2022).

As cepas patogênicas de *E. coli* são responsáveis por um impacto significativo na saúde pública e na economia global. Em 2019, estimou-se que dos 13,7 milhões de mortes relacionadas a infecções, mortes por *E. coli* representaram 13,6% do total de óbitos globais, destacando-se como causa relevante de mortalidade. Notavelmente, os cinco principais patógenos, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, emergiram como os principais contribuintes, sendo responsáveis por 54,9% das mortes entre as infecções bacterianas (Murray, 2022; Ikuta, 2022).

Em um estudo realizado por Russo e Johnson (2003) constatou-se que existem subavaliações e equívocos entre os profissionais de saúde e o público em geral em relação à *E. coli* como um patógeno extraintestinal. As características subestimadas abrangem a extensa gama de infecções extraintestinais que esta espécie pode desencadear, a elevada incidência e os impactos em termos de morbidade, mortalidade e custos associados a essas diversas síndromes clínicas, o potencial patogênico de diferentes grupos de *E. coli* em causar doenças intestinais em comparação com as extraintestinais e o aumento da resistência antimicrobiana.

A presença de linhagens de *E. coli* resistentes a múltiplos fármacos tem como ponto chave a produção de β -lactamases de espectro estendido (Fuga *et al.*, 2022). O gene *bla*_{TEM} está associado à resistência aos β -lactâmicos, e, assim como em *Salmonella*, é responsável pela resistência à ampicilina. Delmani *et al.* (2017) identificaram uma taxa de resistência de 67% à ampicilina em *E. coli* proveniente de amostras clínicas.

A partir da cepa original de *E. coli* K-12 isolada em 1922 foram desenvolvidos diversos derivados mutantes para uso laboratorial. A cepa mutante auxotrófica J5-3, originária da cepa de K-12, foi posteriormente modificada para J53 por meio de mutações espontâneas. Essa cepa, resistente à azida sódica devido à substituição de um nucleotídeo no gene *secA*, tem sido utilizada como receptora em experimentos de conjugação (Yi *et al.*, 2012).

2.3 Resistência microbiana e biofilmes

A resistência antimicrobiana é definida pelo desenvolvimento por parte dos micro-organismos da capacidade de crescimento ou permanência do estado viável mesmo quando expostas a concentrações de antibióticos que, em condições normais, seriam eficazes para exercer atividades bacteriostática ou bactericida (Gut *et al.*, 2018).

Estudo realizado por Hernando-Amado e colaboradores (2019) destaca a importância que as bactérias resistentes aos antimicrobianos possuem pela capacidade de disseminarem facilmente para diferentes regiões geográficas do globo, constituindo um sério problema de saúde pública. Esse problema se dá pelo aumento da interconectividade global e do alto fluxo de indivíduos e mercadorias, que corrobora para o aumento da propagação dessas cepas resistentes.

Estima-se que em 2019 a resistência antimicrobiana bacteriana tenha sido a causa direta de 1,27 milhão de mortes em todo o mundo, contribuindo significativamente para um total de 4,95 milhões de óbitos. É importante ressaltar que a *E. coli* se destaca entre os seis principais patógenos associados a óbitos decorrentes de resistência antimicrobiana, responsáveis pela ocorrência de 3,57 milhões de mortes no ano de 2019, dentre as quais 929 mil mortes atribuídas a resistência antimicrobiana (Murray, 2022; Ikuta, 2022).

A resistência antimicrobiana é uma característica natural que se desenvolve ao longo do tempo devido a transferência horizontal de genes em patógenos (Takeuchi *et al.*, 2023). No entanto, o uso inadequado e excessivo de antimicrobianos para tratar, prevenir ou controlar infecções em humanos, animais e plantas, acelera o surgimento e a propagação desse processo (OMS, 2017).

A resistência antimicrobiana é particularmente agravada pela pobreza e desigualdade, impactando de maneira mais severa os países de baixa e média renda. A falta de uma fonte eficaz de antibióticos e a falta de equidade no acesso a vacinas, diagnósticos e medicamentos, demonstram a necessidade urgente de medidas adicionais para o controle na disseminação da resistência (OMS, 2017).

Além dos impactos em termos de mortalidade e invalidez, a resistência antimicrobiana resulta em custos econômicos significativos, já que as estimativas do Banco Mundial apontam para possíveis despesas na área da saúde, com gastos adicionais em infecções resistentes de 1 trilhão de dólares até 2050, além de perdas no Produto Interno Bruto (PIB) que podem variar de 1 trilhão a 3,4 trilhões de dólares anuais até 2030 (The World Bank, 2016).

Entre os eventos que corroboram para o crescente número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, destaca-se, principalmente, a associação em biofilmes, que consistem em comunidades compostas por uma ou mais espécies bacterianas que se organizam em uma matriz polimérica extracelular heterogênea composta por substâncias produzidas pelas próprias bactérias (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Donlan; Costerton, 2002; Donlan, 2002). Ainda, esses micro-organismos têm a capacidade de se adaptar e sobreviver em condições ambientais adversas, incluindo exposição a radiação UV, salinidade elevada, baixa disponibilidade de nutrientes, altas temperaturas, níveis elevados de pH e presença de agentes antibióticos (Yin *et al.*, 2019).

O desenvolvimento da estrutura sésil é um processo complexo que envolve a adesão inicial à superfície, mediada por adesinas insolúveis. Em seguida, formam-se microcolônias, onde pequenos grupos de bactérias se fixam de maneira mais permanente ao plano. À medida que as microestruturas crescem, elas se fundem para formar um biofilme maduro, uma estrutura tridimensional complexa que pode conter milhões de bactérias, e por fim, as bactérias se dispersam-se do biofilme e colonizam novas superfícies. O ciclo de desenvolvimento do biofilme é um processo contínuo, e as bactérias podem alternar entre os estágios planctônico, que consiste em bactérias isoladas que não estão organizadas em matrizes extracelulares, e a formação de biofilme em resposta às condições ambientais (Tolker-Nielsen, 2015; Armbruster; Parsek, 2018; Yin *et al.*, 2019).

Os biofilmes bacterianos são um desafio significativo devido à sua notável resistência aos antimicrobianos em comparação com as bactérias planctônicas. A matriz extracelular do biofilme atua como uma barreira física que pode impedir a entrada dos antimicrobianos ou reduzir as concentrações que chegam até essas células. Além disso, as bactérias nos biofilmes empregam mecanismos de translocação gênica específicos que conferem resistência uma maior variedade de micro-organismos indivíduos (Davenport; Call; Beyenal, 2014; Mirghani *et al.*, 2022; Berendonk *et al.*, 2015).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 2021, realizou uma avaliação dos indicadores nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde e resistência microbiana e constatou que a resistência de *E. coli* a diversas classes de betalactâmicos são preocupantes (BRASIL, 2022).

Em 2020, na União Europeia/Espaço Econômico Europeu, mais da metade (54%) dos isolados de *E. coli* demonstrou resistência a pelo menos um dos grupos antimicrobianos monitorados, como aminopenicilinas, a classe de antimicrobianos mais afetada. A taxa de

resistência foi de 54,6% para fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (ECDC, 2022).

Apesar de ser uma droga amplamente utilizada em tratamentos de Gram-positivas e Gram-negativas, como *Salmonella* spp. e *E. coli*, a ampicilina, um antibiótico β -lactâmico, tem sido objeto de estudos que evidenciam o aumento crescente na resistência antimicrobiana entre patógenos significativos (Peechakara; Basit; Gupta, 2018), em parte devido à presença de genes de resistência aos β -lactâmicos, como o *bla_{TEM}* (Srichumporn *et al.*, 2022).

A propagação horizontal de genes, envolvendo transformação, transdução e conjugação, associada à resistência antimicrobiana, ocorre por alterações em genes existentes ou pela aquisição horizontal de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis que carregam genes específicos (Soucy; Huang; Gogarten, 2015).

A conjugação bacteriana, mais frequente forma de recombinação genética, ocorre por meio do contato direto entre bactérias, mediada por plasmídeos, que são moléculas circulares de DNA independentes do cromossomo. Esses plasmídeos replicam-se de maneira autônoma, facilitando a transferência de genes de uma célula doadora para uma receptora. Essa influência desempenha um papel crucial na disseminação da resistência antimicrobiana entre cepas, espécies e gêneros bacterianos (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

A eficiência do processo de conjugação é influenciada por fatores como temperatura, presença de outros plasmídeos, relação taxonômica e meio de crescimento (Alderliesten *et al.*, 2020).

O estabelecimento de biofilmes bacterianos mistos ocorre em diversos ecossistemas e esses eventos não se limitam aos ambientes naturais, estendendo-se também a comunidades bacterianas presentes no ambiente de produção e beneficiamento de alimentos de origem animal. As associações nessas comunidades favorecem consideravelmente a possibilidade de transferência de genes de resistência (Davison, 1999; Da Silva *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2019; Selover e Waite-Cusic, 2021).

2.4 Soro de Leite

A presença de matéria orgânica em superfícies e ambientes pode representar uma fonte específica de contaminação bacteriana, sendo particularmente preocupante em contextos industriais, no qual serve como substrato para o crescimento e sobrevivência dos micro-organismos (Da Silva, 2014; Carvalho *et al.*, 2019).

Como exemplo da influência direta da matéria orgânica como substrato nutricional, estudos destacaram que certos subprodutos intrínsecos à indústria, como o exsudato de

frango, fomentam de maneira robusta a formação de biofilmes por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* Minnesota (De Melo *et al.*, 2021). Não se conhece exatamente a influência da presença dos nutrientes do soro de leite como estimulador da formação de biofilmes até mesmo após a pasteurização, o que instiga novos estudos (Emiliano *et al.*, 2022).

O soro de leite, comumente presente como coproduto em indústrias processadoras de leite e derivados, é gerado durante a produção de queijos, sendo composto principalmente por água, lactose, proteínas, gorduras, sais minerais e vitaminas solúveis do leite, além de ácido láctico e cítrico, compostos nitrogenados não-proteicos e caseinomacropeptídeo (Vidal; Netto, 2018).

Takeuchi *et al.* (2023) demonstraram que a adição de soro de leite como coproduto e mimetizador do ambiente industrial, promoveu um aumento de mais de 3,5 ordens de grandeza no processo de conjugação entre *S. Heidelberg* e *E. coli*.

A construção de um modelo que incorpora as condições ambientais foi delineada pela simulação da cadeia produtiva de lácteos pela utilização de soro de leite como possível substrato para colonização e estabelecimento de matrizes. As experimentações refletiram os fatores extrínsecos que podem influenciar a conjugação bacteriana em biofilme, incluindo mobilidade microbiana, como foi experimentalmente confirmado por Flint e colaboradores (2001). Os autores determinaram que contaminantes bacterianos presentes em baixos níveis no soro de leite, como membros da família *Enterobacteriaceae* e gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Bacillus*, podem aumentar grandemente seus números em um sistema de fluxo contínuo de transporte de soro de leite, semelhante a um transportador de drenagem e esteiras, e se fixarem e formar biofilme em superfícies de materiais representativos dentro de um período de 18 horas.

2.5 Nanocomposto de óleo essencial de sálvia

Os óleos essenciais se destacam como uma rica fonte de compostos bioativos, apresentando a capacidade de reduzir a resistência bacteriana, indo além da inibição do crescimento de bactérias gram-negativas. Estudo de Oyedemi *et al.* (2016) ressalta que essa ação está relacionada à replicação do DNA, contribuindo assim para a alteração da resistência microbiana.

A sálvia (*Salvia officinalis*), originária do Mediterrâneo, destaca-se como uma planta medicinal reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antibacterianas (Ugalde *et al.*, 2016), além de ser rica em compostos fenólicos, principalmente ácido rosmarínico e ácido yunanéico (Afonso *et al.*, 2019).

Na dinâmica da transferência conjugativa, que desempenha um papel crucial na transmissão de genes de resistência, fatores como interação adesiva e efeitos físico-químicos exercem influência significativa. Independentemente da resposta fisiológica microbiana, a modulação desse processo é observada, conforme evidenciado por Tang *et al.* (2022).

Ao considerar a combinação dos óleos essenciais com nanopartículas para suprimir a conjugação, foi observado que como efeito físico, houve a formação de uma camada marcante na membrana bacteriana (Carranza *et al.*, 2021). Essa abordagem promete sinalizar uma estratégia potencial para interromper a transferência de genes de resistência e, assim, mitigar a propagação dessas características entre as bactérias.

O nanocomposto associado ao óleo essencial de salvia foi recentemente submetido a uma avaliação abrangente quanto à sua capacidade de modular a virulência e resistência bacteriana, revelando um avanço nas pesquisas que envolvem compostos naturais que mitigam a conjugação bacteriana (Křížková *et al.*, 2023; Takeuchi *et al.*, 2023).

3 METODOLOGIA

3.1 Cepas

O estudo empregou como bactéria doadora uma cepa de *S. Heidelberg* que apresenta resistência fenotípica a cinco antimicrobianos (ampicilina, cefoxitina, sulfametoxazol, tetraciclina e ácido clavulânico) e na análise molecular (PCR), a presença do gene *bla*_{TEM}. A cepa de *E. coli* J53Az^R, resistente a azida sódica e sensível à ampicilina foi utilizada como receptora.

3.2 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima do nanocomposto de óleo essencial de salvia foi determinada frente a *S. Heidelberg* e *E. coli* J53Az^R utilizando o método de microdiluição em caldo, em conformidade com as diretrizes do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2022), previamente determinada por Takeuchi *et al.* (2023).

3.3 Coproduto Soro de Leite

O coproduto utilizado para mimetizar o ambiente industrial, o soro de leite, foi obtido por meio dos métodos descritos por Brown *et al.* (2014), com modificações. Resumidamente, o soro de leite foi coletado a partir da produção de queijo minas artesanal fabricado com leite de vacas da raça Jersey, foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadantes esterilizado por filtração em filtro com poro de 0,22 µm (Kasvi®).

3.4 Nanocomposto de óleo essencial de sálvia

O nanocomposto utilizado foi formulado pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e preparado por Ribeiro *et al.* (2021) e validado por Takeuchi *et al.* (2023). A formulação do nanocomposto constou do aquecimento do óleo essencial de sálvia (a 50mg/mL) em banho maria 10°C, acima do ponto de fusão do lipídeos sólidos e foi adicionado, sob uma agitação de 10.000 rpm por 2 minutos em um misturador Ultra-Turrax (IKA Werke Staufen®), uma solução aquosa do biossurfactante Plantaren 1200® pré aquecido sob mesma temperatura. Posteriormente, as amostras foram ultrassonificadas por 12 minutos em um sonicador Vibracell (Sonic & Mat. Inc. ®), a 500 W e 20 kHz, com ciclos alternados de 30 segundos, ligando e desligando. A estabilidade físico-química das nanopartículas foi previamente validada (Ribeiro *et al.*, 2021) e reavaliada em três momentos diferentes (Takeuchi *et al.*, 2023) para verificar a estabilidade a longo prazo em datas congruentes a este estudo.

A análise da atividade antimicrobiana das formulações contendo a nanopartícula de sálvia foi confirmada pelo estudo *in vitro* de pTakeuchi *et al.* (2023) e a concentração bactericida mínima (CBM) foi previamente determinada em 25 mg/mL e a concentração inibitória mínima (CIM) em 1,8125 mg/mL (Takeuchi *et al.*, 2023; Ribeiro *et al.*, 2021). A CIM e CBM foram estabelecidas frente às mesmas cepas de *S. Heidelberg* e *E. coli* utilizadas em nossos testes.

Com base nisso, a concentração ótima de 0,390625 mg/mL (390,62 mg/L) da nanopartícula de sálvia foi selecionada para os testes, sendo considerada ideal para a inibição da conjugação bacteriana, porém insuficiente para promover a erradicação das bactérias, assim como utilizado anteriormente por Takeuchi *et al.* (2023) em conjugação de *S. Heidelberg* e *E. coli* na forma planctônica, já que a administração do nanocomposto aos inóculos ocorreu anteriormente a formação dos biofilmes mistos.

3.5 Conjugação bacteriana em biofilme misto e inibição da transferência horizontal de genes

A avaliação da conjugação bacteriana e a inibição da transferência horizontal de genes foram realizadas conforme protocolos propostos por De Melo(2017), Rodriguez-Grande e Fernandez-Lopez (2020) e Takeuchi *et al.* (2023), com adaptações.

As cepas de *S. Heidelberg* e de *E. coli* foram reativadas separadamente em 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI- Sigma-Aldrich®) e incubadas a 37°C, *overnight*. Sequencialmente, foram repicadas em Agar Tryptic Soy (TSA- Biokar®) e incubadas a 37°C, *overnight*. Foram selecionadas 10 colônias de cada cepa crescidas em agar TSA e individualmente repicadas em falcons estéreis contendo 3mL de caldo Luria Bertani (LB- Neogen®) com incubação a 37°C em agitador orbital a 60 rpm por 3 horas. A absorvância foi determinada (DO600nm) em leitor de microplacas (Perlong DNM-9602) até concentração de DO600nm = 0,4 e 0,5, e submetidas a diluição decimal seriada (10^{-1} a 10^{-8}). Alíquota de 100 µL de cada diluição da cepa doadora foi repicada em placas com ágar MacConkey (Biokar®) suplementado com ampicilina 90 µg/mL (Vetnil®), e da cepa receptora, 100 µL de cada diluição foi repicado em ágar, suplementado com azida sódica 160 µg/mL (Sigma-Aldrich®) para que expressassem fenotipicamente as respectivas resistências. Por fim, as placas foram incubadas a 37° C por 48 horas e os resultados registrados como UFC (unidades formadoras de colônia).

Para os ensaios com o nanocomposto de sálvia (NS) e soro de leite (SL), 200 µL de cada cultivo bacteriano previamente reativado em LB a 37°C, *overnight* foi adicionado a 6 poços de uma microplaca de 96 poços, e paralelamente realizados os seguintes tratamentos:

Conjugação tradicional (sem SL): 180 µL de caldo Luria Bertani (LB) com cepa doadora, 720 µL de LB com cepa receptora, preservando a proporção 1:4, e 100µL de NS.

Conjugação com a presença de SL (5%): 170 µL de LB com cepa doadora, 680 µL de LB com cepa receptora, preservando a proporção 1:4, 50uL de SL e 100µL de NS.

Paralelamente, a conjugação em biofilme bacteriano foi realizado, também com a ausência dos nanocompostos mantendo a mesma proporção de doadora e receptora (1:4).

(I). Conjugação tradicional (sem SL, sem NS): 200 µL de LB com cepa doadora, 800 µL de LB com cepa receptora, preservando a proporção 1:4.

(II). Conjugação com a presença de SL (5%): 190 µL de LB com cepa doadora, 760 µL de LB com cepa receptora, preservando a proporção 1:4, e 50uL de SL.

As microplacas foram incubadas a 37°C, *overnight*, sem agitação. Após, o sobrenadante foi retirado de cada micropoço, a fim de que as células planctônicas fossem removidas. Os poços foram lavados com solução salina 0,85% (Êxodo Científica®) e, sequencialmente, adicionado 200 µL de PBS (Laborclin®) e 200µL de tripsina (Biokar®) com manutenção por 15 minutos em repouso para que o biofilme fosse suspenso. Em seguida, após realizar a raspagem do fundo dos micropoços com auxílio de ponteiras, o conteúdo foi submetido a diluição decimal seriada (10^{-1} a 10^{-8}) e 100 µL de cada diluição foi repicado em ágar MacConkey suplementado com azida sódica 160 µg/mL e ampicilina 90 µg/mL, seguida da incubação a 37° C por 48 horas.

3.6 Frequência de Conjugação

A frequência de conjugação foi determinada através do cálculo da proporção entre o número de transconjugantes, caracterizados como as células receptoras, ou seja, *E. coli* J53AZ^R que adquiriram o plasmídeo contendo o gene de resistência à ampicilina de uma célula doadora (*S. Heidelberg*), e o número de receptores no início do processo de conjugação (Frequência de conjugação: média de transconjugantes / média de receptores). Para a uniformização, a contagem dos transconjugantes foi realizada em placas contendo entre 25 e 250 colônias (Suhartono; Savin, 2016; Da Silva, 2017; Takeuchi *et al.*, 2023).

3.7 Avaliação dos Resultados

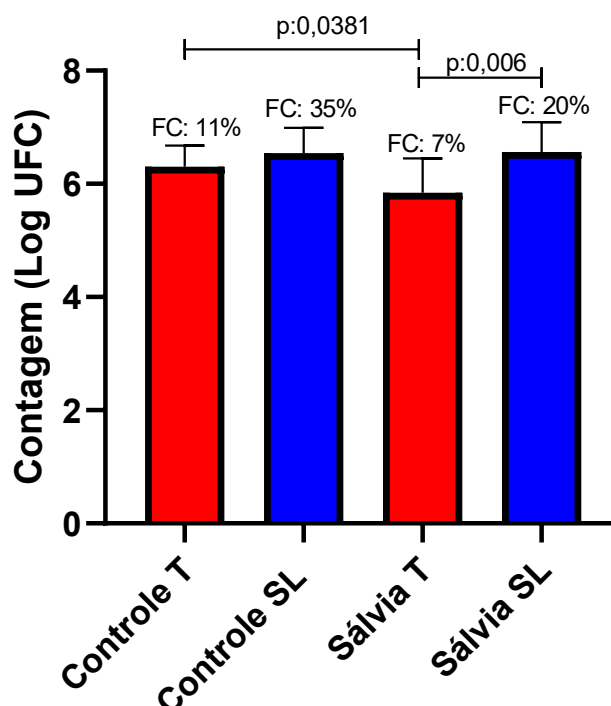
A avaliação dos resultados envolveu uma análise percentual descritiva para a determinação da frequência de conjugação. Para a análise estatística, as contagens de transconjugantes passaram por transformação logarítmica, onde avaliou-se a normalidade dos resíduos. A análise de variância (ANOVA) de um fator (one-way) foi conduzida para a comparação entre os ensaios das repetições e eventuais disparidades nos resultados obtidos. Para a análise comparativa das duas variáveis, empregou-se o teste T. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de bactérias doadoras, receptoras e transconjugantes em todas as repetições não exibiram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,05$ – Teste T), garantindo, desse modo, a manutenção quantitativa em cada ensaio.

Ao comparar os resultados da frequência de conjugação e das contagens médias (log UFC/mL) (Gráfico 1), observou-se que a frequência de conjugação no grupo controle e no grupo tratado com nanocomposto de sálvia enriquecidos com soro de leite foi 3,18 e 2,86 vezes maior, respectivamente, em comparação aos grupos tradicionais, nos quais não houve a adição do coproduto.

Gráfico 1 - Contagem média (Log UFC/mL) e Frequência de Conjugação (FC) do gene *bla_{TEM}* entre *S. Heidelberg* e *E. coli* em biofilmes mistos.



Controle T= método tradicional (sem adição de soro de leite e sem nanocomposto de sálvia). Controle SL=adição de soro de leite sem nanocomposto de sálvia. Sálvia T = nanocomposto de sálvia, sem adição de soro de leite. Sálvia SL = Nanocomposto de Sálvia, com adição de soro de leite . Teste T.

Em estudos prévios (Takeuchi *et al*, 2023) observaram que durante processo de transferência horizontal do gene *bla_{TEM}* de *S. Heidelberg* para *E. coli* planctônicas, também ocorreu maximização quando estava em presença de soro de leite em 3,5 ordens de

magnitude quando comparado com o método sem suplementação do coproduto. De Divitiis e colaboradores (2023) também observaram maior expressão das proteínas recombinantes, como a proteína verde fluorescente e a variante patológica da ataxina-3 Q55, por *E. coli* na presença do soro de leite.

Diante desse cenário, foi evidenciado que o soro de leite contribuiu para o aumento das taxas de recombinação gênica em biofilme bacteriano misto em meios líquidos, como o Luria Bertani (LB). Porém, apesar de já ter sido evidenciado a formação de biofilmes em LB, inclusive de cepas mutagênicas, de inúmeras espécies de bactérias (Lasa-Uzcudun, 2006), são poucos os estudos que trazem a associação do soro de leite ao meio como um possível potencializador da transferência do gene *bla_{TEM}* por meio da conjugação como realizado nos estudos de Takeuchi *et al.* (2023) e Ribeiro (2023).

Ribeiro (2023), constatou que o meio líquido possibilita a maior exposição e contato entre as bactérias planctônicas, o que colaborou para uma potencialização significativa do processo de conjugação bacteriana, e ainda, na presença do soro de leite, ocorreu aumento médio de 0,4 e 0,5 log UFC/mL na conjugação de *S. Heidelberg* e *E. coli* J53AzR. Como em nosso estudo, os inóculos foram preparados com células planctônicas em caldo LB, com a adição do nanocomposto de sálvia e do soro de leite antes dos testes e formação do biofilme, entende-se que, ainda, intensifica a formação da matriz extracelular por aumentar a adesão das bactérias a superfície e, conseqüentemente, para o aumento da resistência antibacteriana.

Em 2020, um grupo de pesquisadores evidenciaram que a adição de coproduto provenientes da indústria avícola, o *chicken juice*, propiciou a preservação de micro-organismos em estado viável e, ainda, potencializou os resultados relacionados à formação de biofilmes robustos. Destacaram que este subproduto desempenha um papel crucial na sustentação da manutenção das células bacterianas ao longo da cadeia produtiva, implicando em desafios adicionais para a segurança alimentar (De Melo *et al.*, 2017).

A metodologia utilizada nesse estudo envolveu a utilização de um nanocomposto a base de óleo essencial de sálvia como um potencial inibidor da conjugação bacteriana já que é fonte de compostos bioativos capazes de alterar a resistência bacteriana (Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2021). O nanocomposto não apenas inibiu o crescimento dos micro-organismos testados, mas também interferiu de maneira específica na transferência gênica por meio da modulação da replicação do DNA em células livres.

Assim como ocorreu com as bactérias planctônicas (Takeuchi *et al.*, 2023), observamos aumento significativo na transferência gênica do gene *bla_{TEM}* em estrutura sésil na presença do soro de leite. Na presença desse coproduto, a frequência de conjugação do

grupo controle aumentou de 11 para 35%, enquanto nos experimentos utilizando sálvia essa frequência passou de 7 para 20%.

O trabalho desenvolvido por Oyedemi e colaboradores (2016) utilizaram compostos fenólicos de *Mallotus philippensis*, com propriedades antibacterianas diretas e capacidade de inibir a transferência de conjugação dos plasmídeos pKM101, TP114, pUB307 e R6K e obtiveram boas respostas em Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, mas não observaram atividades diretas significativas contra bactérias Gram-negativas, como *E. coli*.

Estudos desenvolvidos por Afonso e colaboradores (2019) com extrato aquoso de *Salvia officinalis* exibiu notável potencial antibacteriano com efeitos inibitórios e letais sobre bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (CIM e CBM variando de 0,94 a 3,75 mg/mL), e Gram-negativas como *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM e CBM na faixa de 3,75 a 7,5 mg/mL),

A pesquisa sobre o impacto dos óleos essenciais na biogênese de biofilmes bacterianos continua a ser uma área pouco explorada. O domínio dos potenciais do uso de óleos essenciais na inibição de biofilmes não apenas expandiria as possibilidades de interação entre composições naturais e micro-organismos, mas também poderia ter implicações significativas em diversas áreas, desde a segurança de alimentos até a prevenção de infecções hospitalares (Swain *et al.*, 2022, Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022, Bashiri *et al.* 2020).

Os resultados das contagens médias (logUFC/mL) de *S. Heidelberg* e *E. coli* J53azR e *E. coli* transconjugante com e sem a presença de nanocomposto de sálvia e soro de leite estão na Tabela 1. Observou-se que as contagens de transconjugantes tratadas com o nanocomposto na presença de soro de leite ($6,57 \pm 0,53$) não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle que recebeu a adição de soro de leite ($6,59 \pm 0,47$). Considerando somente os experimentos sem adição de coproduto, a contagem média do controle ($6,30 \pm 0,37$) foi estatisticamente maior ($p=0,0381$) que a do biofilme tradicional na presença de sálvia ($5,84 \pm 0,61$).

Em estudo anterior com a transferência horizontal de genes utilizando *S. Heidelberg* e *E. coli* planctônicas, observou-se que o uso de nanocompostos de sálvia reduziu a eficiência de conjugação do gene *bla_{TEM}* em 90,6 vezes quando foi adicionados soro de leite e 74,9 vezes sem nenhum coproduto (Takeuchi *et al.*, 2023).

Takeuchi *et al.* (2023) constataram uma expressiva redução nas contagem de *E. coli* transconjugantes (aquisição do gene *bla_{TEM}*) em bactérias planctônicas na presença do nanocomposto de sálvia. Em concordância, constatamos que a frequência de conjugação deste

mesmo gene com as mesmas bactérias em biofilmes mistos, também demonstraram redução significativa no número de transconjugantes na ausência de soro de leite.

Tabela 1 – Contagem média (log UFC) de bactéria doadora, receptora e *E. coli* transconjugante pela aquisição do gene *bla_{TEM}* em biofilme misto tradicional e na presença de nanocomposto de sálvia.

Cepa	Controle (log UFC)	Nanocomposto de Sálvia (log UFC)
Doadora (<i>S. Heidelberg</i>)		7,79±0,27
Receptora (<i>E. coli</i> J53azR)		7,16±0,34
Transconjugantes (T)	6,30±0,37 ^{Aa}	5,84±0,61 ^{Ba}
Transconjugantes (SL)	6,59±0,47 ^{Aa}	6,57±0,53 ^{Ab}

A, B: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de T ($p < 0,05$); a, b: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de T ($p < 0,05$).

Transconjugante (T) = *E. coli* que adquiriu o gene *bla_{TEM}* em biofilme tradicional. Transconjugantes (SL) = *E. coli* que adquiriu o gene *bla_{TEM}* em biofilme acrescido com soro de leite.

Ainda, quando foi comparada a contagem média (log UFC) somente dos grupos tratados com sálvia foi observada diferença estatística ($p = 0,006$), sendo menor naquela que não recebeu o coproduto (5,84±0,61) que aquela que recebeu (6,57±0,53). Inferimos que o desafio do soro de leite (que pode possivelmente potencializar a formação da matriz do biofilme) supera a capacidade de inibição do nanocomposto de sálvia quando não há presença do coproduto.

Contudo, quando analisamos a frequência de conjugação (FC) tradicional na presença de nanocomposto de sálvia (7%) com a FC na presença de sálvia e soro de leite (20%) constatamos grande diferença a partir da adição do soro. Assim, supomos que a ação do nanocomposto de sálvia na presença de soro de leite estimula o aumento da conjugação em biofilme misto. Até então, não foram identificados estudos que enfatizem a maximização que a sálvia provoca na frequência de conjugação com a presença de soro de leite.

Assim, sugerimos que pesquisas que visam estabelecer estratégias de prevenção à formação de biofilmes bacterianos e transferência gênica na indústria alimentar devam utilizar coprodutos industriais, como o soro de leite ou *chicken juice*, para obtenção de resultados mais reais e que possam ser utilizados na mitigação da formação de biofilmes e resistência aos antimicrobianos.

5 CONCLUSÃO

Diante da complexidade dos processos envolvidos na formação de biofilmes bacterianos mistos, esta pesquisa buscou explorar a influência do nanocomposto de óleo essencial de sálvia em conjunto com a presença de soro de leite na dinâmica da transferência do gene *bla_{TEM}*.

O uso de nanopartículas de sálvia demonstrou ser promissor no controle de trocas gênicas e mitigação da transferência do gene *bla_{TEM}* em biofilmes tradicionais mistos de *S. Heidelberg* e *E. coli*. A presença de soro de leite potencializou a frequência de trocas gênicas, e na presença deste coproduto, o nanocomposto de sálvia não foi um agente mitigador destes eventos.

A busca por estratégias para inibir a conjugação bacteriana, especialmente na presença de coprodutos industriais, oferece perspectivas valiosas para a segurança alimentar e o enfrentamento dos desafios relacionados à resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

AFONSO, A. F. *et al.* Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* ‘Icterina’ and *Salvia mexicana* aqueous extracts. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4327, 2019.

ALDERLIESTEN, J. B. *et al.* Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. **BMC Microbiology**, v. 20, p. 1-10, 2020.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n. 28. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos-1/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos>. Acesso em: 05 out. 2023.

ARMBRUSTER, C. R.; PARSEK, M. R. New insight into the early stages of biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 17, p. 4317-4319, 2018.

ASAE - **Autoridade de Segurança Alimentar e Econômica**. *Escherichia coli*. Lisboa, Portugal, 2022. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>. Acesso em: 11 sep. 2022.

BASHIRI, S. *et al.* Essential oil-loaded nanostructured lipid carriers: The effects of liquid lipid type on the physicochemical properties in beverage models. **Food Bioscience**, v. 35, p. 100526, 2020.

BERENDONK, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2015.

BETTELHEIM, K. A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. 1994.

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 12, p. 2163-2176, 2008.

BROWN, H. L. *et al.* Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, p. 7053-7060, 2014.

CARRANZA, G. *et al.* Monitoring bacterial conjugation by optical microscopy. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 750200, 2021.

CARRASCOSA, C. *et al.* Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 04, p. 2014, 2021.

CARVALHO, A. C. *et al.* Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, 2019.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella*. Atlanta, Estados Unidos: CDC, 2023. Disponível em: [Salmonella Homepage | CDC](#). Acesso em 15 nov. 2023. Base de dados.

COLLIGNON, P. J.; McEWEN, S. A. One health—its importance in helping to better control antimicrobial resistance. **Tropical medicine and infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 22, 2019.

CORTEZ, A. L. L. *et al.* Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella spp.* isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 157-163, 2022.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DAI, W. *et al.* Analysis of antibiotic-induced drug resistance of *Salmonella enteritidis* and its biofilm formation mechanism. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 10254-10263, 2021.

DA SILVA, C. F. *et al.* *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

DA SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. Editora Blucher, 2017.

DAVENPORT, E. K.; CALL, D. R.; BEYENAL, H. Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4755-4761, 2014.

DAVISON, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, v. 42, n. 2, p. 73-91, 1999.

DE DIVITIIS, M. *et al.* Cheese-whey permeate improves the fitness of *Escherichia coli* cells during recombinant protein production. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2023.

DELMANI, F. *et al.* Characterization of ampicillin resistant gene (blaTEM-1) isolated from *E. coli* in Northern Jordan. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 11-5, 2017.

DE MELO, R. T. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Minnesota biofilms, susceptibility to biocides, and molecular characterization. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 581, 2021.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. Academic Press (London) Ltd., 24/28 Oval Road, London, NW1, 1974.

EDWARDS, P. R.; EWING, W. H. Identification of *Enterobacteriaceae*. **Identification of Enterobacteriaceae**, n. 2nd Edition, 1962.

EMILIANO, J. V. dos S. *et al.* Assessment of the development of *Staphylococcus aureus* during the production of soro on a laboratory scale. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e254111022450-e254111022450, 2022.

ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022. Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-net). ECDC, 2022. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/9387811c-e79f-11ec-a534-01aa75ed71a1/language-en>. Acesso em: 03 oct. 2023.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. *et al.* Infecção do trato urinário na gravidez: aspectos atuais. **Femina**, p. 165-171, 2009.

FLINT, S. *et al.* The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 2, p. 151-157, 2001.

FUGA, B. *et al.* WHO critical priority *Escherichia coli* as one health challenge for a post-pandemic scenario: genomic surveillance and analysis of current trends in Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01256-21, 2022.

GUIDOTTI-TAKEUCHI, M. *et al.* Essential oil-based nanoparticles as antimicrobial agents in the food industry. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1504, 2022.

GUT, A. M. *et al.* *Salmonella* infection—prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. **Microbiology**, v. 164, n. 11, p. 1327-1344, 2018.

HERNANDO-AMADO, S. *et al.* Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1432-1442, 2019.

IKUTA, K. S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221-2248, 2022.

JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary world**, v. 12, n. 4, p. 504, 2019.

KHAN, M.; SHAMIM, S. Understanding the mechanism of antimicrobial resistance and pathogenesis of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2006, 2022.

KŘÍŽKOVSKÁ, B. *et al.* Modulation of the bacterial virulence and resistance by well-known European medicinal herbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 312, p. 116484, 2023.

LASA-UZCUDUN, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, v. 9 (1). p. 21-28, 2006.

MAIJALA, R. *et al.* The efficiency of the Finnish *Salmonella* control programme. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 669-675, 2005.

MANUAL MSD. **MSD**. L. M. Bush; M. T. Vazquez-Pertejo. Infecções por *Salmonella* não tifoide, 2022. Disponível em: [Infecções por *Salmonella* não tifoide - Doenças infecciosas - Manuais MSD edição para profissionais \(msdmanuals.com\)](https://www.msdmanuals.com/pt-br/infeccoes/infecoes-por-salmonella-nao-tifoide). Acesso em: 26 oct. 2023

MIRGHANI, R. *et al.* Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. **AIMS Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 239, 2022.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NAIR, D. V. T.; VENKITANARAYANAN, K.; JOHNY, A. K. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 167, 2018.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NÚNCIO, A. S. P. *et al.* Genomic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg E2 strain isolated from chicken carcass in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, p. 109863, 2022.

OYEDEMI, B. O. M. *et al.* Novel R-plasmid conjugal transfer inhibitory and antibacterial activities of phenolic compounds from *Mallotus philippensis* (Lam.) Mull. Arg. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 5, p. 15-21, 2016.

PEECHAKARA, B. V.; BASIT, H.; GUPTA, M. Ampicillin. **StatPearls Publishing**, 2018.

RIBEIRO, L. N. de M. *et al.* Nanocarriers from natural lipids with in vitro activity against *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 571040, 2021.

RICE, P. A.; CRAVEN, P. C.; WELLS, J. G. *Salmonella heidelberg* enteritis and bacteremia: an epidemic on two pediatric wards. **The American Journal of Medicine**, v. 60, n. 4, p. 509-516, 1976.

RODRIGUEZ-GRANDE, J.; FERNANDEZ-LOPEZ, R. Measuring plasmid conjugation using antibiotic selection. **Horizontal Gene Transfer: Methods and Protocols**, p. 93-98, 2020.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and infection**, v. 5, n. 5, p. 449-456, 2003.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.

SADER, H. S. *et al.* Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, p. 59-67, 2001.

SELOVER, B.; WAITE-CUSIC, J. G. Growth potential and biofilm development of nonstarter bacteria on surfaces exposed to a continuous whey stream. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6508-6515, 2021.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SOUKY, S. M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 8, p. 472-482, 2015.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

SRICHUMPORN, W. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pork in Muang district, Chiang Mai Province, Thailand. **Veterinary World**, v. 15, n. 12, p. 2903, 2022.

SUHARTONO, S.; SAVIN, M. Conjugative transmission of antibiotic-resistance from stream water *Escherichia coli* as related to number of sulfamethoxazole but not class 1 and 2 integrase genes. **Mobile Genetic Elements**, v. 6, n. 6, p. e1256851, 2016.

SWAIN, S. S. *et al.* Nano-technology platforms to increase the antibacterial drug suitability of essential oils: A drug prospective assessment. **OpenNano**, p. 100115, 2022.

TANG, H. *et al.* Effects of iron mineral adhesion on bacterial conjugation: Interfering the transmission of antibiotic resistance genes through an interfacial process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 435, p. 128889, 2022.

TANIGUCHI, N. Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II. **J. Jpn Soc. Precis. Eng.**, 1974.

TEKLEMARIAM, A. D. *et al.* Human Salmonellosis: A Continuous Global Threat in the Farm-to-Fork Food Safety Continuum. **Foods**, v. 12, n. 9, p. 1756, 2023.

TESSARI, E. N. C. *et al.* Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**, p. 52-55, 2003.

THE WORLD BANK. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future (March 2027). Washington, DC. Disponível em: <https://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistente-infections-a-threat-to-our-economic-future>. Acesso em: 29 sep. 2023.

TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm development. **Microbial Biofilms**, p. 51-66, 2015.

UGALDE, M. L. *et al.* Actividad Antibacteriana y Antioxidante de los Aceites Esenciales Comerciales de Romero, Clavo de Olor, Orégano y Salvia. **Revista de Ciencia y Tecnología**, n. 25, p. 54-61, 2016.

VIDAL, A. M. C.; NETTO, A. S. Obtenção e processamento do leite e derivados. Pirassununga-SP. **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP)**, 220p, 2018.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 173, 2016.

WALSH, C. *et al.* Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 210-215, 2008.

WANG, J. *et al.* A systematic review and meta-analysis of the sources of *Salmonella* in poultry production (pre-harvest) and their relative contributions to the microbial risk of poultry meat. **Poultry Science**, p. 102566, 2023.

WHO - **World Health Organization**. Diarrhoeal disease. Genebra, Suíça: WHO, 2017. Disponível em: . Acesso em: 15 oct. 2023.

WHO - **World Health Organization**. *Salmonella* (non-typhoidal). Genebra, Suíça: WHO, 2018. Disponível em: [Salmonella \(non-typhoidal\) \(who.int\)](https://www.who.int/teams/infectious-diseases/diseases/salmonella). Acesso em: 15 oct. 2023.

YI, H.; CHO, Y. J.; CHUN, J. Genome sequence of *Escherichia coli* J53, a reference strain for genetic studies. **American Society for Microbiology**, 2012.

YIN, W. *et al.* Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.