

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA – CCN
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS LAGOA DO SINO

MARCELO FELIPE DA SILVA ESTÁCIO DE SANTANA

**BIOFILMES DE PATÓGENOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: UMA
REVISÃO SOBRE A SUA FORMAÇÃO E CONTROLE**

BURI – SP

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA – CCN
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS LAGOA DO SINO

MARCELO FELIPE DA SILVA ESTÁCIO DE SANTANA

**BIOFILMES DE PATÓGENOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: UMA
REVISÃO SOBRE A SUA FORMAÇÃO E CONTROLE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos
na Universidade Federal de São Carlos.

Orientação: Prof. Dr. Natan de Jesus
Pimentel Filho

BURI – SP

2023

Santana, Marcelo Felipe da Silva Estácio de

Biofilmes de patógenos na indústria de alimentos: uma revisão sobre a sua formação e controle / Marcelo Felipe da Silva Estácio de Santana -- 2023.
50f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): Natan de Jesus Pimentel Filho

Banca Examinadora: Natan de Jesus Pimentel Filho,
Edison Tutomu Kato Junior, Felipe Alves de Almeida

Bibliografia

1. Biofilmes bacterianos. 2. Indústria de alimentos. 3.
Mecanismos de controle de microrganismos. I. Santana,
Marcelo Felipe da Silva Estácio de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELO FELIPE DA SILVA ESTÁCIO DE SANTANA

BIOFILMES DE PATÓGENOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: UMA REVISÃO SOBRE A SUA FORMAÇÃO E CONTROLE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de São Carlos.

Orientação: Prof. Natan de Jesus Pimentel Filho

Aprovado em: 04/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Prof. Dr. Edison Tutomu Kato Junior
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Prof. Dr. Felipe Alves de Almeida
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG
Instituto de Laticínios Cândido Tostes – ILCT

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante este período da graduação e que contribuíram positivamente para a minha evolução pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A primeira pessoa que compõe este grupo é Jeová Deus, pois este é quem é “digno ... de receber a glória, a honra” (Apocalipse 4:11). E é Aquele que dá a capacidade para que tenhamos conhecimento sobre Ele e sobre tudo o que Ele fez.

A segunda pessoa é minha mãe Denise da Silva Estácio, uma pessoa divertida e guerreira que, com muita luta e amor, proporcionou um ambiente acolhedor e favorável ao meu desenvolvimento, estando ao meu lado nos bons momentos e nos de maior necessidade.

A terceira pessoa é o professor Natan de Jesus Pimentel Filho, uma pessoa excepcional e muito dedicada, que deseja sempre o melhor de seus alunos e que não desiste fácil deles. Para ele e sua família desejo sucesso, saúde e felicidade.

E os demais são alguns dos profissionais do *campus* Lagoa do Sino, incluindo todos os professores do curso de Engenharia de Alimentos, e também alguns de meus colegas e amigos que estiveram ao meu lado enfrentando os desafios durante a faculdade e os que vieram com a pandemia, das quais cito a minha amiga e colega Maria Paula Copetti de Almeida, meu querido amigo Erick dos Santos Ferreira e outros.

RESUMO

SANTANA, Marcelo da Silva Estácio de. **Biofilmes de patógenos na indústria de alimentos: uma revisão sobre a sua formação e controle.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Lagoa do Sino, Buri, 2023.

Biofilmes bacterianos são comunidades sésseis de bactérias, onde uma única ou múltiplas espécies se estabelece sobre superfícies bióticas ou abióticas se embebendo em um material polimérico autoproduzido, trazendo-lhes maior resistência a fatores adversos do ambiente. Os biofilmes representam um grande desafio nas indústrias de alimentos, uma vez que se tornam fontes de contaminação, gerando riscos à saúde dos consumidores e grandes prejuízos econômicos. Dentre os microrganismos formadores de biofilme, encontram-se importantes patógenos veiculados por alimentos, incluindo *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, dentre outros. Com os avanços nos estudos sobre biofilmes bacterianos, os quais têm abordado até mesmo a expressão de genes envolvidos nesse processo, novos mecanismos de controle de formação de biofilmes têm surgido, incluindo o uso de tratamentos químicos, óleos essenciais, ruptura enzimática, dentre outros. Este trabalho objetivou compilar as características e os mecanismos utilizados na formação de biofilmes dos principais patógenos de alimentos, além de apresentar o entendimento geral de algumas tecnologias utilizadas nas indústrias de alimentos e suas ações sobre a formação de biofilme.

Palavras-chave: Comunidades sésseis; *Quorum sensing*; Tratamentos.

ABSTRACT

SANTANA, Marcelo da Silva Estácio de. **Biofilms of pathogens in the food industry: a review on their formation and control.** 2023. Undergraduate Final Project – Federal University of São Carlos, *campus* Lagoa do Sino, Buri, 2023.

Bacterial biofilms are sessile communities of bacteria, where a single or multiple species establish themselves on biotic or abiotic surfaces and become embedded in a self-produced polymeric material, bringing them greater resistance to adverse environmental factors. Biofilms represent a major challenge in the food industry, as they become sources of contamination causing health risks to consumers and great economic losses. Among the biofilm-forming microorganisms, there are important food-borne pathogens that cause diseases, which include *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, and others. With advances in studies on bacterial biofilms, including the expression of genes involved in this process, new mechanisms to control the formation of biofilms have emerged, including the use of chemical treatments, essential oils, enzymatic breakdown, and others. This work aimed to compile the characteristics and mechanisms used in the formation of biofilms of the main foodborne pathogens, in addition to presenting the general understanding of some strategies used in the food industries and their actions on the formation of biofilms.

Key-words: Sessile communities; *Quorum sensing*; Treatments.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 COMPOSIÇÃO GERAL E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS	10
3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME PRESENTES NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS	14
3.1 <i>BACILLUS CEREUS</i>	14
3.2 <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i>	16
3.3 <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	18
3.4 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	20
3.5 <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	21
3.6 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	23
3.7 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	24
4 OS IMPACTOS DO BIOFILMES E AS MEDIDAS DE CONTROLE ADOTADAS NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS	25
4.1 TRATAMENTO QUÍMICO	26
4.1.1 HIPOCLORITO DE SÓDIO	27
4.1.2 QUATERNÁRIOS DE AMÔNIO	29
4.1.3 ÁCIDO PERACÉTICO	29
4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	31
4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO	32
4.4 BACTERIOCINAS	34
4.5 BACTERIÓFAGOS	35
5 CONCLUSÃO	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

Biofilme compreende uma comunidade séssil composta por células de uma ou mais espécies de microrganismos, envolvidas por uma matriz polimérica autoproduzida e associadas de forma irreversível à superfícies (CLOETE *et al.*, 2009; ALLKJA *et al.*, 2020). Essas comunidades podem incluir bactérias e fungos, e quanto maior é essa diversidade, maior é o impacto na dinâmica e estrutura do biofilme formado (CARRASCOSA *et al.*, 2021; GALIÉ *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2017).

O biofilme é a forma de vida bacteriana mais predominante na Terra, pois é um importante fator de virulência, conferindo a esses microrganismos maior resistência a diversos agentes antimicrobianos e a condições ambientais severas, tais como desidratação, exposição a luz ultravioleta (UV), salinidade, entre outras (RATHER *et al.*, 2021; MUKHERJEE; BASSLER, 2019).

Devido a esses fatores, a presença de biofilmes nas indústrias de alimentos se torna um problema, podendo acarretar em significativos prejuízos anuais com danificação de equipamentos, aumento nos custos com energia e uso de desinfetantes, perdas por deterioração dos produtos processados e surtos de doenças veiculadas por alimentos (CARRASCOSA *et al.*, 2021; YUAN *et al.*, 2021).

Sendo assim, há uma enorme responsabilidade sobre as indústrias de alimentos na busca de técnicas para detecção e controle de formação de biofilmes, garantindo a inocuidade de seus produtos. E isso se torna um grande desafio, visto que seus espaços são propícios para o desenvolvimento de biofilmes bacterianos, uma vez que contém instalações de processamento complexos, longos ciclos de produção, grandes áreas para o crescimento microbiano e disponibilidade de nutrientes para esses microrganismos (YUAN *et al.*, 2021).

Atualmente, existe maior compreensão sobre a composição da matriz de biofilmes bacterianos, do comportamento fenotípico e metabólico das comunidades bacterianas, além dos genes que estão envolvidos no processo de síntese e regulação (ROSSI *et al.*, 2022). É por meio desses estudos que diversas estratégias têm sido adotadas pelas indústrias de alimentos para o controle desse problema.

Frente a isso, este trabalho apresenta aspectos gerais da composição e formação de biofilmes bacterianos, explorando as especificidades daqueles produzidos pelos principais microrganismos patogênicos de alimentos. Além disso, será abordado os impactos desses biofilmes nas indústrias de alimentos, bem como os mecanismos mais utilizados por elas no que tange o controle desse problema.

2 COMPOSIÇÃO GERAL E A FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS

Biofilmes bacterianos são constituídos majoritariamente de água, superior a 97%, que por sua vez, contém a inteira diversidade dos componentes funcionais e estruturais do biofilme. Esses juntos formam a principal estrutura do biofilme: a matriz (FLEMMING *et al.*, 2016). A matriz é produzida pelos próprios integrantes da comunidade microbiana, que passam a secretar enzimas que serão utilizadas para a síntese de diversos grupos de biopolímeros (SEVIOUR *et al.*, 2019). A matriz é composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e somente elas compreendem cerca de 50 a 90% da massa total de matéria orgânica do biofilme (BORGES *et al.*, 2020).

Estão incluídos na EPS alguns polissacarídeos extracelulares, como os exopolissacarídeos semelhantes a alginato, celulose, polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos, dentre outros. Também algumas proteínas, como exoenzimas, proteínas de adesão (como Bap – Proteína associadas ao biofilme, do inglês *Biofilm associated protein*), glicoproteínas, lipoproteínas, além de ácidos nucleicos (DNA extracelular – eDNA) e outros compostos (SEVIOUR *et al.*, 2019; BORGES *et al.*, 2020). A finalidade de todos esses biopolímeros é dar estabilidade mecânica para o biofilme, prover um meio propício para a ocorrência das diversas interações entre as células, melhorar a capacidade de retenção de água e da sorção de nutrientes, e proteger as células da ação de vírus, antimicrobianos e desinfetantes (SEVIOUR *et al.*, 2019; RATHER *et al.*, 2021).

Estruturas da própria célula bacteriana influenciam na adesão dessas à superfície, o que também favorece a formação de biofilme, tais como pilus, fímbria e flagelo (ALONSO; MORAIS; KABUKI, 2021). Especialmente os flagelos apresentam grande importância para a formação do biofilme, uma vez que bactérias com motilidade: podem encontrar lugares favoráveis à formação de biofilme; ao se locomoverem no biofilme, criam canais na matriz, que levam a um aumento na troca de nutrientes; conseguem se adentrarem no biofilme, quando estão em estado planctônico; conseguem se locomover ao longo da superfície, resultando em propagação da colônia, quando as mesmas estão localizadas na borda do biofilme em crescimento (MAJED *et al.*, 2016).

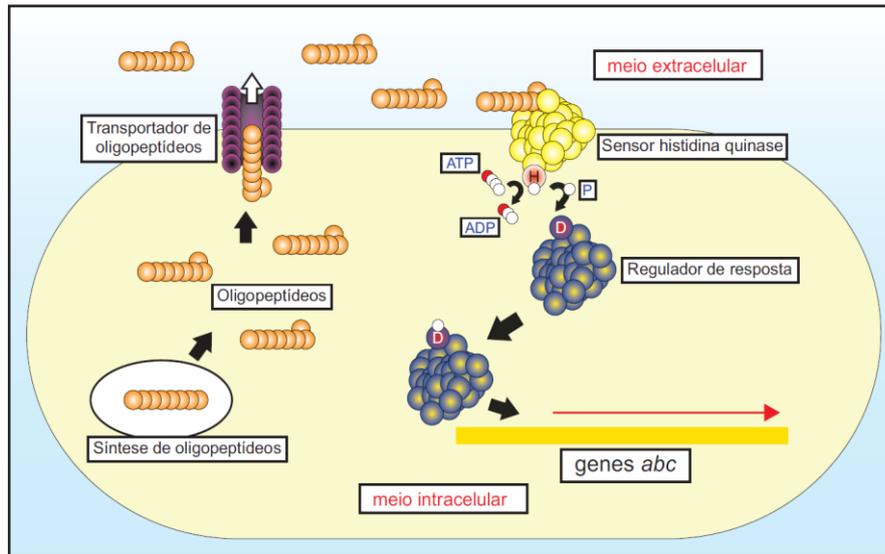
O mecanismo *quorum sensing* (QS) também é um fator de virulência muito importante para a formação dos biofilmes bacterianos. Este é uma forma de comunicação entre as células bacterianas e de outras espécies, onde o há envio de uma variedade de moléculas sinalizadoras para o meio extracelular, que são chamadas de autoindutoras (AI) (PALUCH *et al.*, 2020; THEODORA; DOMINIKA; WATURANGI, 2019). A percepção dessas moléculas pelas células desencadeia a regulação de processos vitais para a comunidade (PALUCH *et al.*, 2020).

Esse mecanismo do sistema QS contribui para o aumento da transferência de nutrientes, o que ajuda as células a se adaptar ao ambiente (BRINDHADEVI *et al.*, 2020).

O mecanismo QS pode ser dividido quanto ao tipo de AI utilizado: o que utiliza oligopeptídeos como AI e controlado pelo sistema de dois componentes, utilizado por bactérias Gram-positivas; o mecanismo QS do tipo LuxI/LuxR, que utiliza *N*-acil-homoserina lactonas (AHL) e também chamadas de AI-1, encontrado em bactérias Gram-negativas; o mecanismo de QS que utiliza AI-2; e o mecanismo de QS que utiliza AI-3 (ALMEIDA *et al.*, 2017; FEDERLE; BASSLER, 2003). Este último ainda não está bem elucidado, a qual não será nesse trabalho abordado.

As bactérias Gram-positivas geralmente usam oligopeptídeos como AI, sendo nomeados de peptídeos autoindutores (AIP), além de utilizar como receptores sensores histidina quinase transmembrana de dois componentes (MUKHERJEE; BASSLER, 2019). Os AIPs consistem, geralmente, de uma cadeia de 5 a 17 aminoácidos, podendo ser lineares ou sofrerem modificações, apresentando anéis em sua estrutura. Por serem moléculas grandes, necessitam de um transportador para serem excretadas para o meio extracelular (FEDERLE; BASSLER, 2003). Com a secreção contínua, aliada ao aumento da população microbiana, ocorre aumento da concentração externa desses AIPs, o que, por sua vez, é detectada pelos sensores histidina quinase que se encontram na membrana plasmática microbiana (MACHADO *et al.*, 2020). Com a detecção, os sítios de histidina (H) desses sensores são fosforilados pela ação de ATP. O fosfato (P) ligado ao sítio de H segue para o regulador de resposta encontrado no mesmo sistema sensor de dois componentes, resultando na fosforilação dos sítios de ácido aspártico (D). O regulador de resposta é uma proteína ligada a regiões específicas do DNA e com a fosforilação, a expressão de genes alvos é alterada (MACHADO *et al.*, 2020; FEDERLE; BASSLER, 2003). O esquema básico do mecanismo de QS por AIP é encontrado na Figura 1.

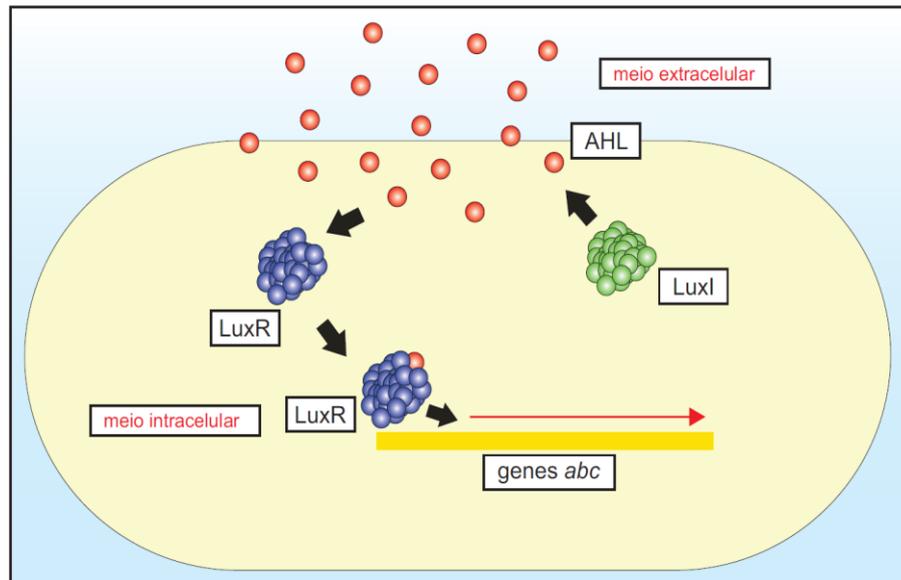
Figura 1 - Esquema básico do mecanismo de QS por AIP em bactérias Gram-positivas



Fonte: Próprio autor.

Enquanto isso, as bactérias Gram-negativas utilizam moléculas pequenas como AI, como as AHLs e também chamadas de AI-1 que apresentam um importante papel na formação do biofilme, por ativar a transcrição de genes que estão associados à diversos processos, como a expressão de EPS, dentre outros (CARRASCOSA *et al.*, 2021). Como previamente mencionado, as bactérias Gram-negativas apresentam o mecanismo de QS do tipo LuxI/LuxR. As proteínas LuxI ou homólogas são responsáveis por sintetizar um tipo de AHL específico da espécie microbiana. Assim, as AHLs produzidas passam a difundir livremente de dentro para fora da célula, devido ao seu tamanho molecular. Ao atingir concentrações limites, estas passam a se ligar a proteínas LuxR ou homólogas dentro das células, onde juntas se ligam aos promotores específicos de DNA, regulando a expressão de genes (FEDERLE; BASSLER, 2003). O esquema básico do mecanismo é encontrado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema básico do mecanismo de QS por AHL ou AI-1 em bactérias Gram-negativas



Fonte: Próprio autor.

O AI-2 são moléculas produzidas pela proteína LuxS e podem ser encontradas tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas, o que a torna uma linguagem universal para a comunicação entre diferentes espécies. (SUN *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2017). O AI-2 não é um único composto, mas sim um grupo de compostos derivados da 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD), a qual é sintetizada pela proteína LuxS no Ciclo do Metil Ativado (AMC), que vem a ser um processo metabólico importante para a síntese de *S*-adenosilmetionina (SAM), que é um composto precursor de AHL (MA *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2019).

A função do mecanismo de QS do tipo LuxS/AI-2 varia em diferentes espécies e estirpes. O gene *luxS* pode estar muito associado à adesão e formação do biofilme em bactérias, mas em outras, como no caso de *Haemophilus influenzae*, este pode inibir a formação deste fator de virulência (ZHANG *et al.*, 2019).

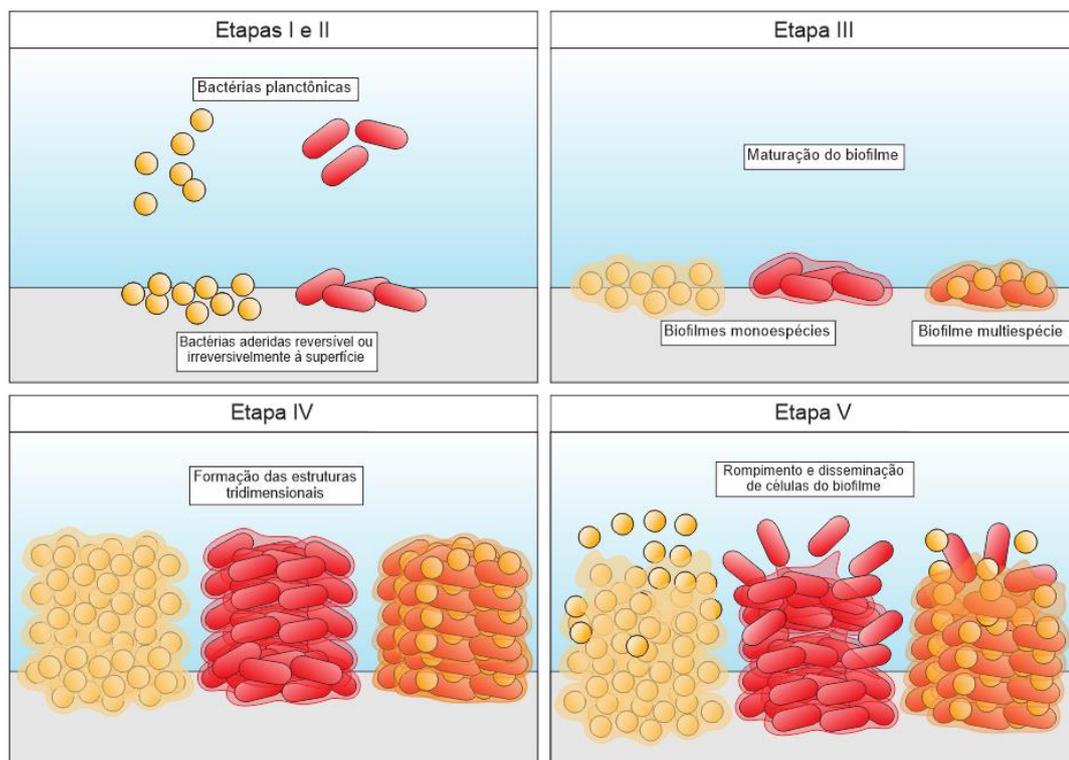
O mecanismo de QS também regula a organização estrutural do biofilme. No caso de bactérias Gram-positivas, como exemplo *Staphylococcus aureus*, AIPs ativam o gene acessório regulador (*agr*), associado ao mecanismo de QS, que por sua vez induz a expressão de modulinas fenol-solúvel que atuam na formação de poros e canais entre as microcolônias do biofilme, o que facilita o transporte de nutrientes e líquidos (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018; FLEMMING *et al.*, 2016).

De maneira resumida, Singh *et al* (2020) apresentam as etapas do processo de formação do biofilme e a Figura 3 apresenta um esquema básico do processo, que compreendem: (I)

adesão reversível do microrganismo à superfície, anteriormente, em estado planctônico; (II) adesão irreversível das células, frente as propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas das superfícies com as quais estão interagindo; (III) desenvolvimento de microcolônias e início da produção de matriz constituída de EPS e de maturação do biofilme; (IV) desenvolvimento da estrutura tridimensional, ao passo que novas células se adentram no material ou as bactérias já presentes passam a se multiplicar e, com isso, mais EPS é produzido e excretado, formando novas camadas de biofilme; (V) rompimento e disseminação de células do biofilme que poderá dar início a um novo processo de adesão, embora isto possa ocorrer a qualquer momento do processo de formação.

Embora o conhecimento a respeito da formação dos biofilmes esteja bem avançado, existem muitas condições e variações genômicas e ambientais que podem alterar as características e os mecanismos de formação desses biofilmes, tornando o entendimento sobre estas estruturas bastante complexo e mutável, dificultando a erradicação desse problema na indústria de alimentos (GALIÉ *et al.*, 2018).

Figura 3 - As etapas gerais do processo de formação de biofilme



Fonte: Próprio autor.

Em relação a presença de biofilmes nas indústrias de alimentos, esses se apresentam como um dos principais problemas para as atividades que ali são realizadas, além de gerar perdas por contaminações cruzadas e riscos à saúde do consumidor, já que os microrganismos formadores de biofilme são deterioradores e patógenos veiculados por alimentos (RAHMAN *et al.*, 2022). A seguir, serão abordados aspectos gerais sobre o biofilme de algumas das principais bactérias patogênicas associadas a surtos de doenças veiculadas por alimentos, como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, dentre outros.

3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS FORMADORES DE BIOFILME PRESENTES NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

3.1 *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria Gram-positiva ubiqüitária, podendo ser isolada de uma variedade de alimentos, tais como arroz, condimentos, produtos minimamente processados, principalmente vegetais frescos, produtos cárneos e derivados lácteos (SILVA *et al.*, 2022; HWANG *et al.*, 2022). É anaeróbico facultativo e capaz de esporular. E como é notado pela denominação de seu gênero, apresenta formato de bacilo e também possui um flagelo peritríquio, que é utilizado para locomoção e/ou secreção de toxinas (ENOSI TUIPULOTU *et al.*, 2021).

Segundo estudo de Park *et al.* (2020), *B. cereus* foi o patógeno alimentar mais encontrado em vegetais frescos, apresentando um percentual de contaminação de 35%. E fato também foi observado em restaurantes em países da União Europeia, sendo apontados como a principal fonte de contaminação por *B. cereus*, causando 27,6% dos surtos, seguido de produtos de origem cereal (10,9%) e de carne bovina (8%) (HUSSAIN *et al.*, 2018).

B. cereus está classificado dentro do grupo de bactérias chamado de *B. cereus sensu lato*, que também estão incluídas as espécies *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis* (ENOSI TUIPULOTU *et al.*, 2021).

Algumas estirpes de *B. cereus* produzem enterotoxinas e hemolisinas, como a hemolisina BL (Hbl), regulada pelos genes *hblA*, *hblC* e *hblD*; enterotoxina não-hemolítica (Nhe), regulada pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*; enterotoxina FM (EntFM) e citotoxina K (CytK); e todos os genes envolvidos na expressão dessas toxinas são controlados pelo regulador transcricional PlcR (YAN *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2020).

Além disso, *B. cereus* pode formar biofilmes em materiais de superfícies encontradas na indústria de alimentos, sendo eles aço inoxidável, vidro e plástico (HUSSAIN *et al.*, 2018). O patógeno persiste especialmente na indústria de laticínios, formando biofilmes em tubulações e em superfície de equipamentos (MACHADO *et al.*, 2020).

Yan *et al.* (2017) relataram que estudos sugerem que algumas estirpes de *B. cereus* são capazes de formar estruturas semelhantes a biofilmes, como películas flutuantes e biofilme submerso. Esses são expressos frente à indução por fatores externos, como no caso do biofilme submerso, que é sintetizado quando o pH do meio está baixo (GAO *et al.*, 2015).

Além disso, Gao *et al.* (2015) mostraram que os genes associados à expressão dos componentes do biofilme não são conservados entre as estirpes dessa espécie. Os mesmos autores trazem como exemplo a estirpe 905, que apresenta um *cluster* de 21 genes associados à biossíntese de EPS, que inclui glicosiltransferases e tirosina quinase (EpsAB). Ao comparar com *B. cereus* ATCC 14579, vê-se que o mesmo *cluster* não é conservado, compartilhando apenas genes que expressam a tirosina quinase e o regulador semelhante a LytR. Enquanto os demais genes, por não serem semelhantes ao da outra estirpe, leva-se a sugerir que há diferentes mecanismos de biossíntese de EPS entre essas.

Outros genes que são importantes para a formação de biofilme de *B. cereus* são *spo0A*, *sinI*, *sinR*, *sipW*, *calY1* e *calY2* (GAO *et al.*, 2015). A proteína Spo0A (codificada pelo gene *spo0A*) é o regulador mestre da esporulação em muitas bactérias (OBANA; NAKAMURA; NOMURA, 2014). As proteínas SinR e SinI apresentam-se como importantes reguladores da formação de biofilme: SinR é antagonista de SinI, ao passo que a deleção de SinR promove a superprodução de biofilme. Enquanto a deleção de SinI gera resultado negativo para a formação de biofilme. Isso indica que SinI/SinR são um par anti-repressor/repressor na formação de biofilme (MAJED *et al.*, 2016).

As proteínas CalY1 e CalY2 apresentam uma função muito semelhante à proteína TasA que é um componente essencial para o biofilme de *Bacillus subtilis*. TasA é exportada da célula e processada para uma forma maturada pela enzima SipW, antes de ser ancorada à membrana por meio de sua fixação à TapS (GAO *et al.*, 2015).

Machado *et al.* (2020) demonstraram que o mecanismo QS é importante para a formação de biofilme por *B. cereus*. A presença de lactose induz o aumento na produção do AI-2, que é muito importante para a expressão de genes associados à formação de biofilme.

3.2 *Campylobacter jejuni*

C. jejuni é uma bactéria Gram-negativa que possui formato de "S" (espiral), com espessura variando de 0,2 a 0,5 µm e comprimento de 1 a 5 µm. Também conta com flagelo polar, podendo ser monotríquio ou anfitriúquio (YI; ANDERSON, 2018). É considerado um microrganismo fastidioso e sensível ao estresse ambiental, uma vez que requer ambiente microaerofílico (em torno de 5% de O₂), capnofílico (em torno de 10% de CO₂) e temperaturas medianas a elevadas (entre 30 a 45 °C) para se desenvolver (MOUFTAH *et al.*, 2021).

Esta bactéria está associada a doenças como diarreia, bacteremia, meningite, síndrome de Guillain-Barré, artrite reativa, causando doenças em países desenvolvidos e em desenvolvimento (YI; ANDERSON, 2018; GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2019) *C. jejuni* é considerado o principal causador de gastroenterites em países desenvolvidos. Apenas nos Estados Unidos, estima-se que *Campylobacter* tenha causado cerca de 845 mil doenças, com 8,5 mil hospitalizações e mais de 70 mortes anualmente (YI; ANDERSON, 2018). Já no Brasil, segundo Cisco *et al.* (2017), há uma carência nas notificações de campilobacteriose, sendo estimado uma taxa de infecção 7,6 a 100 vezes maior que a relatada. Estes autores também relatam a inexistência de programas de vigilância que investiguem a doença a campo, tão pouco existem padrões microbiológicos para alimentos que incluam *Campylobacter* spp., o que dá margem a ocorrência de surtos veiculados por alimentos.

C. jejuni consegue, assim como outras espécies do gênero *Campylobacter*, se desenvolver muito bem no trato intestinal de aves de corte, atingindo concentrações da ordem de 10⁴ a 10⁶ UFC/g (TEH; FLINT; FRENCH, 2010). Devido a esse fato, o trato intestinal de aves de corte se torna um ótimo reservatório para a *C. jejuni*, o que resulta na predominância dessa espécie em linhas de abatedouros de frangos de corte, bem como em produtos avícolas frescos e congelados (MAGAJNA; SCHRAFT, 2015; TEH; FLINT; FRENCH, 2010). Embora a maioria dos casos estejam associados com o consumo ou manipulação de produtos avícolas contaminados, esses não são os únicos vetores desse patógeno, sendo também leite não pasteurizado, água não tratada, animais domésticos e outros (MAGAJNA; SCHRAFT, 2015; MOUFTAH *et al.*, 2021).

Se tratando da prevalência desta espécie nas linhas de abatedouros de aves, Araújo *et al.* (2022) apontam que esse fato é resultado de contaminação cruzada da carcaça de frangos durante etapas específicas do processamento, as quais incluem a escaldadura das aves em tanques, a remoção das penas e outras etapas de evisceração. Além disso, *C. jejuni* é um microrganismo capaz de formar biofilme e de se estabelecer em biofilmes mais resistentes de outras culturas, tais como *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., entre outros, o que contribui

em maior resistência desse patógeno frente às adversidades ambientais, onde podem sobreviver melhor em estresse aeróbio e baixa temperatura (MAGAJNA; SCHRAFT, 2015). Além disso, é capaz de formar biofilmes em superfícies encontradas na indústria de alimentos, tais como as de aço inoxidável, vidro e plástico (OH; KIM; JEON, 2016; TRACHOO; FRANK; STERN, 2002).

Em biofilmes formados pelo gênero *Campylobacter*, os carboidratos se apresentam como uma porção significativa da matriz, principalmente, galactose e *N*-acetilgalactosamina. Também foram identificados alguns glicoconjugados contendo manose e fucose. O eDNA também tem uma função importante no biofilme deste gênero, facilitando a adesão inicial e a maturação (MA *et al.*, 2022).

Como já visto, *C. jejuni* é uma bactéria microaerofílica e essa característica influencia na estrutura e na formação de biofilme. Esta espécie produz um biofilme mais compacto e viscoso, dificultando a entrada de oxigênio e com isso, protegendo as células aderidas do estresse aeróbio. O nível dessa compactação e viscosidade são dependentes da diversidade microbiana do biofilme, isso se nota em biofilmes de uma única espécie de *Campylobacter*, onde os mesmos são menos compactos e viscosos que os de múltiplas espécies do mesmo gênero (MA *et al.*, 2022). Além disso, *C. jejuni* apresenta maior taxa e maior potencial de formação de biofilme em condições aeróbias, quando comparado ao ambiente microaeróbio (OHADI *et al.*, 2021).

Os genes envolvidos na formação de biofilme são os mesmos envolvidos na motilidade e outros de processos importantes para a célula. Os genes responsáveis pela motilidade de *C. jejuni* e que estão associados a formação de biofilme são *flaA*, *flaB*, *flaG*, *fliS* e *flhA*. Outros genes importantes são aqueles envolvidos na modificação da superfície celular, como *peb4*, *gpg1* e *waaF*, e os de resposta ao estresse, como *ppk1*, *spoT*, *cj1556*, *csrA*, *cosR*, *cprS* e *nuoK*. O gene *luxS* mecanismo de QS também está associado (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

3.3 *Clostridium perfringens*

C. perfringens é uma bactéria Gram-positiva com formato de bacilo, anaeróbico obrigatório e capaz de esporular (HASHIMOTO; SUZUKI; OONAKA, 2023; LABBE; JUNEJA, 2017). Esta bactéria é pertencente a ordem Clostridiales e a família Clostridiaceae e, dada a sua capacidade de produção de toxinas, é também classificada em sete toxinotipos, classificados de A a G (PANTALÉON *et al.*, 2014; MILTON *et al.*, 2022). As toxinas produzidas por esse patógeno são denominadas CPA, CPB, CPB2, ITX, ETX, CPE e NetB (MILTON *et al.*, 2022). São os toxinotipos A, C e F que estão associados às infecções em

frangos e intoxicações alimentares em seres humanos, sendo as estirpes do toxintipo A as maiores causadoras de doenças veiculadas por alimentos em todo mundo, frente a sua habilidade de produzir várias toxinas e enzimas citotóxicas, como enterotoxina de *C. perfringens* (CPE), perfringolisina e sialidases (YADAV *et al.*, 2022; MILTON *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2022).

Devido a produção dessas toxinas, *C. perfringens* é a maior causa de doenças entéricas, sendo classificado como agente de bioterrorismo (PANTALÉON *et al.*, 2014; CHARLEBOIS; JACQUES; ARCHAMBAULT, 2014). De fato, a intoxicação alimentar causada por *C. perfringens* é uma das mais comuns em todo o mundo, estando em terceiro lugar entre os agentes causadores de surtos de doenças veiculadas por alimentos no Reino Unido e França e o segundo mais comum nos Estados Unidos (HU; KIM; KOO, 2018). Esses surtos estão muito associados a serviços de alimentação de escolas, cantinas de hospitais e restaurantes. Também causam grandes prejuízos na indústria de aves, atingindo perdas calculadas em mais de 2 bilhões de dólares anualmente. E isso se explica ao fato carnes fornecerem os mais de 12 aminoácidos e vitaminas necessários para *C. perfringens* se desenvolver (SMITH; OLSZEWSKA; DIEZ-GONZALEZ, 2021; HU; KIM; KOO, 2018).

Ainda, segundo Smith, Olszewska e Diez-gonzalez (2021), a prevalência de *C. perfringens* se dá por sua habilidade de formar esporos, e uma vez que formados, exibem grande resistência a vários tratamentos, como calor, estresse osmótico, agentes químicos, armazenamento congelado prolongado e processamento a alta pressão (ALZUBEIDI *et al.*, 2018). Em alguns casos, a aplicação de calor pode favorecer o desenvolvimento de *C. perfringens*, pois se os esporos sobrevivem ao processo de cocção, há inativação de competidores e redução da concentração de oxigênio do meio; características ideais para seu desenvolvimento (LABBE; JUNEJA, 2017).

Os esporos de *C. perfringens* são altamente hidrofóbicos e apresentam habilidade de aderir a superfícies encontradas na indústria de alimentos, tal como aço inoxidável (ALZUBEIDI *et al.*, 2018). Além disso, *C. perfringens* demonstrou ser capaz de formar biofilmes e estruturas semelhantes à biofilme em diversas superfícies, a qual podem ser construídos antes da esporulação, garantindo resistência ainda maior ao microrganismo, principalmente ao estresse oxidativo (SMITH; OLSZEWSKA; DIEZ-GONZALEZ, 2021; HU; KIM; KOO, 2018; CHARLEBOIS; JACQUES; ARCHAMBAULT, 2014).

A matriz do biofilme dessa bactéria é constituída de polissacarídeos de ligação β -1,4, como a celulose, estruturas de constituição proteica como o pilus tipo IV e DNA (CHARLEBOIS; JACQUES; ARCHAMBAULT, 2014; PANTALÉON *et al.*, 2014). Em

relação ao pilus tipo IV, este é também utilizado no processo de motilidade deslizante da célula, onde possui função de extensão e retração, passando a mover a célula (MENDEZ *et al.*, 2008). E para o biofilme, este componente é muito importante para a máxima adesão celular e formação deste (VARGA; THERIT; MELVILLE, 2008).

Alguns genes importantes para a esporulação e expressão de toxinas estão associados a formação de biofilme em *C. perfringens*, sendo eles os que expressam Spo0A, AbrB e CtrAB, estes contribuem para as diferentes morfologias do biofilme em resposta à temperatura (CHARLEBOIS; JACQUES; ARCHAMBAULT, 2016; OBANA; NAKAMURA; NOMURA, 2014). Como visto em *B. cereus*, Spo0A é um regulador mestre da esporulação e AbrB é um repressor global, já CtrAB é um complexo de proteínas CtrA e CtrB que atua como regulador da expressão de toxinas e é conservado no gênero *Clostridium*, regulando vários outros genes, tornando-o importante para o metabolismo desse gênero (OBANA; NAKAMURA; NOMURA, 2014).

3.4 *Listeria monocytogenes*

A bactéria Gram-positiva *L. monocytogenes* é um patógeno veiculado por alimentos ubiqüitário, sendo encontrada principalmente no solo, água e em fezes (JORDAN; MCAULIFFE, 2018; REES; DOYLE; TAYLOR, 2017). É uma bactéria anaeróbia facultativa, possuindo forma característica de bacilo e incapaz de esporular (YASSORALIPOUR *et al.*, 2023). Produz ácidos, como o lactato, a partir da fermentação da glicose e também é oxidase-negativo e catalase-positivo. A temperatura ideal para crescimento é 37 °C, mas é capaz de crescer em faixas que variam de 0 a 45 °C; portanto, considerado um microrganismo psicrotrófico (REES; DOYLE; TAYLOR, 2017; CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2018).

L. monocytogenes é um microrganismo móvel em temperaturas que variam entre 22 e 30 °C, porém não formam flagelos na temperatura ideal de crescimento (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2018). Além disso, é halotolerante, sendo capaz de crescer em meios com concentração de 10% de cloreto de sódio (NaCl), e resistindo a concentrações que variam entre 20 e 30%. Também, consegue manter o crescimento em uma grande faixa de pH, variando entre 4,6 e 9,2 (REES; DOYLE; TAYLOR, 2017).

Em alimentos, *L. monocytogenes* pode ser encontrado, principalmente, em frutos do mar, produtos lácteos, carne, frutas, entre outros (GALIÉ *et al.*, 2018). Ao consumir esses alimentos contaminados, este microrganismo pode desenvolver no indivíduo a listeriose, uma doença gastrointestinal rara, porém potencialmente fatal. Essa doença pode acarretar septicemia, meningite, aborto espontâneo, entre outras (COLAGIORGI *et al.*, 2017).

Segundo Jordan e McAuliffe (2018), cerca de 2536 casos dessa doença foram registrados na União Europeia, apenas em 2016, apontando um aumento de 9,3% em relação à 2015. Os autores ainda relatam que o número de casos apresenta contínuo aumento desde 2008. Já na Austrália, a *Food Standards* relata aproximadamente 150 casos de pacientes hospitalizados com listeriose todos os anos, incluindo registro de óbitos por decorrência da infecção, correspondente à cerca de 10% desse total (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2018).

Assim como outras espécies bacterianas, o mecanismo de formação de biofilme de *L. monocytogenes* se inicia com a adesão das células à uma superfície. Alguns autores identificaram que *L. monocytogenes* é capaz de se aderir em diversas das superfícies encontradas nas indústrias de alimentos, a qual entram contato com os alimentos, sendo estas a de aço inox, poliestireno, PVC, vidro e borracha (COLAGIORGI *et al.*, 2017; GU *et al.*, 2021; ZERAIK; NITSCHKE, 2012; TRACHOO, 2007; SADEKUZZAMAN *et al.*, 2017).

Tanto para a adesão quanto, subsequentemente, para a formação do biofilme, os genes envolvidos no movimento de seu flagelo são considerados essenciais. Dentre eles estão os genes *fliQ*, *flaA*, *fliI* e *motA*. Além desses, são importantes também o gene regulatório *phoR* e os genes envolvidos na D-alanilação do ácido lipoteicoico (GALIÉ *et al.*, 2018; ALONSO *et al.*, 2014). Desses últimos citados, tem-se o operon *dltABCD*, formado pelos genes *dltA*, *dltB*, *dltC* e *dltD*. A D-alanilação do ácido lipoteicoico promovida por esses genes é muito importante, pois altera a carga da superfície da célula bacteriana, permitindo a interação com a superfície abiótica (ALONSO *et al.*, 2014).

Gandra *et al.* (2019) relataram que o locus *agr* do mecanismo de QS também é muito importante para a formação do biofilme por *L. monocytogenes*. Esse locus é composto por quatro genes, que juntos formam o operon *agrBDCA*. Através do gene *agrB* é expressa uma proteína de membrana, que exporta o AIP precursor expresso através do gene *agrD*. Esse peptídeo é transformado em um AIP maduro. Quanto às proteínas AgrC (uma histidina quinase) e AgrA (um auto-regulador), essas formam um sinal de transdução no sistema. Assim, quando a concentração extracelular de AIP atinge determinado limite, o mecanismo de QS é ativado, por meio da detecção de AgrC-AgrA, exercendo efeitos regulatórios sobre os substratos-alvo e induzindo sua própria produção.

A temperatura apresenta um papel muito importante nesse processo. Segundo Colagiorgi *et al.* (2017), embora melhor produza biofilme à 37 °C, *L. monocytogenes* é capaz de produzir biofilme em temperaturas de 4 a 12°C, apresentando maior formação em vidro, em comparação aos outros materiais citados mais acima. Ainda, é provável que os genes envolvidos

na formação do biofilme dessa espécie sejam diferentes dos envolvidos quando este se encontra em sua temperatura ideal de desenvolvimento (37 °C).

3.5 *Salmonella enterica*

Outro patógeno encontrado nas indústrias de alimentos é a bactéria *Salmonella enterica*, um bacilo móvel que possui flagelo peritríquio, Gram-negativo, anaeróbio facultativo, oxidase negativo, catalase positivo, pertencente à família Enterobacteriaceae e, juntamente com a espécie *Salmonella bongori*, formam todo o grande gênero *Salmonella* (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2018; GAMAZO; SOLANO; LASA, 2009; RELLER, 2012; PERCIVAL; WILLIAMS, 2014).

As condições de temperatura para o metabolismo estão na faixa de 5 a 47 °C, apresentando crescimento ótimo entre 35 a 37 °C. Apresentam sensibilidade à temperatura igual ou superior à 70 °C, sendo inativadas nessas condições (GRAZIANI *et al.*, 2017). Já a faixa de pH é relativamente alta, variando de 4,0 a 9,5, com crescimento ótimo entre 6,5 a 7,5 (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2018). E ainda, requerem elevada atividade de água (A_w), variando entre 0,94 a 0,99, podendo sobreviver em A_w menor que 0,2 (GRAZIANI *et al.*, 2017).

Dentre os mais de 2500 sorotipos da espécie *S. enterica*, os principais patógenos humanos causadores de salmonelose são Typhimurium e Enteritidis, além do sorotipo Typhi, que é um adaptado patógeno humano, causador da febre tifóide (GAMAZO; SOLANO; LASA, 2009). Em relação à salmonelose, esta é considerada uma zoonose muito relevante, sendo uma das doenças veiculadas por alimentos mais graves que afetam os seres humanos (GAMAZO; SOLANO; LASA, 2009). Esta é definida como uma síndrome autolimitada e caracterizada por sintomas gastrintestinais, tais como diarreia, febre e dor abdominal, apresentando período de incubação entre 4 a 72 h e baixa taxa de mortalidade (ANTUNES *et al.*, 2016).

Apenas dos Estados Unidos, mais de 70% dos casos de salmonelose humana foram associados ao consumo de frango, peru e ovos contaminados. Salmonelose causada pelo consumo de frango tem sido uma questão crítica para a segurança dos alimentos em todo o mundo, considerando que as carnes de aves e produtos avícolas apresentaram significativo aumento de consumo nos últimos 50 anos (BYUN *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2021). Estudos revelaram que no Vietnã, China e Índia, cerca de 71,8, 15,8 e 9,4% das amostras de carne de frango testadas foram positivas para *Salmonella* spp, respectivamente (ROY *et al.*, 2021).

Em 2017, o Brasil produziu cerca de 13 milhões de toneladas de carne de frango, sendo reconhecido como segundo maior produtor de carne de frango do mundo e o maior exportador de produtos à base dessa carne (BRASÃO *et al.*, 2021). Tamanha demanda pela carne de frango

produzida no Brasil leva à severa supervisão da qualidade destes produtos por parte dos órgãos de fiscalização visando controlar a comercialização de produtos contaminados.

Byun *et al.* (2021) relataram que *Salmonella enterica* sorovar. Enteritidis é capaz de formar biofilme em diversas superfícies, principalmente superfícies hidrofóbicas, como plásticos, aço inoxidável, acrílico, entre outras. A adesão e formação de biofilme de *S. enterica* está relacionada à presença dos genes *csgD* e *adrA* e, também, ao mecanismo *QS*. Este último utiliza tanto do gene *luxS* como de outros genes para comunicação entre todos os microrganismos envolvidos no biofilme. O gene *luxS*, além do gene *sdiA*, atuam na produção de moléculas envolvidas no mecanismo *QS* e de seus receptores (BRASÃO *et al.*, 2021).

Além desses genes, a produção de alguns polissacarídeos, tal como a celulose, e o uso de algumas proteínas, como aquelas presentes nas fímbrias, são importantes para a adesão das células à superfície. A celulose é um polímero de β -1,4-D-glicose para a interação célula-célula e é crucial para a formação de biofilme por *Salmonella* em condições *in vitro* e *ex vivo* (BHARDWAJ *et al.*, 2022).

O operon *bcsABZC* está presente na síntese de celulose. O gene *bcsA* codifica a subunidade catalítica da celulose sintase, a qual polimeriza a uridina 5'-difosfato de glicose em celulose, enquanto o gene *bcsB* codifica a subunidade reguladora da celulose sintase, que se liga ao ativador cíclico-di-GMP. Quanto à proteína BcsC, esta é necessária para maximizar a síntese da celulose, enquanto o gene *bcsZ* codifica a endoglucanase que hidrolisa ligações β -1,4-D-glucosídicas (GAMAZO; SOLANO; LASA, 2009).

3.6 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, encontrado principalmente em águas e solo. Também é comumente encontrado na microbiota intestinal de mamíferos, incluindo humanos. Embora a maioria não apresente riscos à saúde humana, alguns sorotipos de *E. coli* promovem doenças gastrointestinais, sendo o principal *E. coli* O157:H7 (WERNER, 2016).

Segundo Weerarathne *et al.* (2021), *E. coli* O157:H7 promove doenças que variam desde uma diarreia à síndrome hemolítica urêmica. A contaminação ocorrida por *E. coli* O157:H7 se dá, principalmente, por técnicas inadequadas de lavagem das mãos e por manipulação incorreta de alimentos. Os principais veículos de contaminação humana por esse microrganismo são a carne mal passada (especialmente hambúrguer), suco de maçã, água, frutas, vegetais, produtos lácteos, como iogurte e leite não pasteurizado, entre outros (WERNER, 2016)

Além disso, as superfícies de equipamentos de plantas de processamento de alimento não corretamente higienizadas apresentam-se como fontes de contaminação por *E. coli* O157:H7 (WEERARATHNE *et al.*, 2021). Um fator que contribui para a sua sobrevivência, é a capacidade que esta bactéria tem em formar biofilmes em superfícies abióticas, incluindo aço inoxidável, polipropileno, vidro borossilicato, aço inoxidável, dentre outros (CARTER *et al.*, 2016; WEERARATHNE *et al.*, 2021). O processo de adesão e formação de biofilme por *E. coli* O157:H7 se dá por meio de muitos fatores, incluindo a produção do EPS, fundamental na adesão inicial (RYU; BEUCHAT, 2005).

Outros fatores de virulência são necessários, como as adesinas (principalmente a Cah e OmpA), flagelo, fímbria do tipo I, proteína *Curli* e o lócus de genes envolvidos na adesão e lesão (alteração) de enterócitos. Esses fazem parte de etapas complexas durante o processo de infecção e formação de biofilme. Os flagelos, além de permitir o movimento da bactéria, são capazes de auxiliar a adesão, frente a forças de repulsão eletrostáticas que possam existir entre a superfície microbiana e o material (OLOKETUYI; KHAN, 2017).

Já a proteína extracelular *Curli* é o componente principal de biofilme de *E. coli*. Esta é uma fibra fina, enrolada e apresenta comprimento variado de 6 a 12 nm. Ao se juntarem fora da célula, formam uma matriz, muito importante para o processo de colonização e desenvolvimento do biofilme, sendo resistentes à degradação por proteases e desnaturação por detergentes (CHARLES VEGDAHL; SCHAFFNER, 2023; OLOKETUYI; KHAN, 2017).

3.7 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não-esporulada, não-móvel e apresenta formato de coco com diâmetro médio de 1 µm (FOSTER; GEOGHEGAN, 2015). É um patógeno oportunista, encontrado em mais de 30% dos humanos, especificamente na parte externa das narinas e pele (LEROY; VERMASSEN; TALON, 2016).

Apresenta temperatura e pH ótimo de crescimento de 37 °C e 7,2, respectivamente, mas é capaz de crescer em faixas de temperatura entre 6,5 e 45 °C (classificado como mesófilo) e de pH entre 4,2 a 9,3 (KOSECKA-STROJEK; BUDA; MIĘDZOBRODZKI, 2018; ADAMS, 2009; SAMANTA; BANDYOPADHYAY, 2020).

Entre os anos de 2012 e 2021, esta bactéria foi responsável por 12,9% dos 1559 casos de doenças veiculadas por alimentos no Brasil (BRASIL, 2022). É encontrada em uma variedade de alimentos, como carne, peixe, leite, comidas prontas, entre outras, e estão também presentes em superfícies de equipamentos de processamento de alimentos (CASTRO; SILVA; TEIXEIRA, 2018).

A intoxicação alimentar promovida por *S. aureus* se manifesta em um indivíduo, através do consumo de alimentos contaminados por suas enterotoxinas (FOSTER; GEOGHEGAN, 2015). A ingestão de apenas 100 ng de enterotoxinas é capaz de promover os sintomas da intoxicação alimentar (THOMPSON, 2018).

Biofilmes produzidos por *S. aureus* sobre a superfície de alimentos não são firmemente aderidos, porém boa aderência é observada sobre superfícies de equipamentos de produção de alimentos e embalagem de diferentes materiais, tais como poliestireno, polipropileno, aço inoxidável, vidro, borracha e madeira (DI CICCIO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2022).

Na primeira etapa, já compreendida como a etapa de adesão, *S. aureus* requer a ação de autolisinas e de ácido teicóico, tornando possível as interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre a superfície e as células (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018). Na segunda etapa, caracterizada pela multiplicação celular e formação de várias camadas de células, as bactérias passam a se ligar e a serem envolvidas por camadas de EPS. O EPS de *S. aureus* é formado por três principais frações: polissacarídeos, eDNA e proteínas (CAMUSSONE; CALVINHO, 2013; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018; ZHU *et al.*, 2020).

Dentre os polissacarídeos estão a adesina intercelular polissacarídica (PIA) e o polissacarídeo capsular/adesão (CP/A) (CAMUSSONE; CALVINHO, 2013; BAZARI; HONARMAND JAHROMY; ZARE KARIZI, 2017). A PIA é o principal polissacarídeo dessa fração, a qual apresenta um importante papel na acumulação e coesão do biofilme. Este polissacarídeo é produto do operon *icaADBC*, onde *icaA* e *icaD* formam a *N*-acetilglicosamiltransferase, uma proteína transmembrana que sintetiza oligômeros de *N*-acetilglicosamina. Estes últimos são transferidos, por meio da proteína de membrana IcaC, para a superfície da membrana, sendo diacetilados pela proteína IcaB, gerando cargas positivas que favorecem a adesão de PIA na superfície das bactérias (BAZARI; HONARMAND JAHROMY; ZARE KARIZI, 2017; DAS *et al.*, 2022).

O eDNA é um importante componente estrutural do biofilme por possuir carga elétrica negativa, o que permite sua atuação como agente de ligação entre as células, e também como uma proteção contra agentes antimicrobianos catiônicos (RATHER *et al.*, 2021).

Dentre as proteínas estão a Bap e as adesinas MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive molecules matrix*), principalmente a proteína A (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018). Bap é a principal proteína dessa fração, e constitui em um membro de uma grande família de proteínas associadas à formação de biofilme em

várias espécies bacterianas. Seu papel está tanto na etapa inicial de adesão da célula à superfície, como também nas interações célula-célula (LANGSRUD, 2009).

4 OS IMPACTOS DO BIOFILMES E AS MEDIDAS DE CONTROLE ADOTADAS PELAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

Como exposto, os biofilmes se tornam grandes ameaças à saúde pública, uma vez que muitos patógenos humanos são capazes de formar estas estruturas. Estima-se que entre 65 e 80% das doenças infecciosas de grau agudo e crônico que acometem humanos, são causadas por microrganismos capazes de formar biofilme (RATHER *et al.*, 2021).

Os impactos da presença de biofilmes estão altamente relacionados com as atividades promovidas pelas indústrias de alimentos, uma vez que estes espaços são muito susceptíveis à adesão celular e consequente formação de biofilme. Os biofilmes não só ameaçam a inocuidade dos alimentos, como acarretam em grandes prejuízos econômicos para as indústrias (VISHWAKARMA, 2020).

A susceptibilidade das indústrias se dá a diversos fatores, que incluem a fácil disponibilidade de nutrientes, longos ciclos de produção e grandes áreas para o crescimento microbiano (YAN *et al.*, 2017). Além disso, inclui a capacidade dessas bactérias formarem biofilmes em superfícies encontradas nas linhas de produção de alimentos. Dependendo da indústria, biofilmes podem ser encontrados em tubulações, luvas, mesas, carcaças, superfícies de contato, dentre outros (RAHMAN *et al.*, 2022). E ainda relacionado a esse fator, as instalações industriais apresentam diversos pontos vulneráveis para formação de biofilmes, como joelhos, válvulas, placas de pasteurizadores; pontos de difícil acesso do sistema de limpeza (ARAÚJO *et al.*, 2022).

Como já abordado, os biofilmes garantem maior resistência das células microbianas integrantes da comunidade, resultando no uso de doses muito superiores (de 500 a 5000 vezes maiores) de biocidas para a inativação de microrganismos, em comparação à de microrganismos em condição planctônica (SUBRAMANIAN *et al.* 2020).

Assim, estratégias adotadas consistem, principalmente, na prevenção da formação de biofilmes. Para isso, tecnologias eficientes estão sendo exploradas para este fim, além de garantir redução nos custos com o sistema de sanitização e nos impactos ambientais que muitos dos produtos atuais têm causado. A seguir, serão apresentadas algumas das estratégias já utilizadas pelas indústrias de alimentos e outras ainda em fase de estudos, além dos mecanismos de controle da formação de biofilmes.

4.1 TRATAMENTO QUÍMICO

Os tratamentos químicos apresentam grande aplicação nas indústrias de alimentos, sendo muito empregados no *Cleaning In Place* (CIP), considerada uma das estratégias padrão de sanitização industrial. No geral, o CIP envolve a aplicação de uma solução alcalina, geralmente hidróxido de sódio (NaOH), seguida de uma solução ácida, normalmente de ácido nítrico (HNO₃), com o fim de controlar a contaminação bacteriana e remover resíduos orgânicos e inorgânicos (ALZUBEIDI *et al.*, 2018).

De acordo com Oliveira, Brugnera e Piccoli (2010), os sanitizantes químicos que também são utilizados na redução da carga microbiana das superfícies de equipamentos das indústrias de alimentos no Brasil são os que apresentam como grupos ativos compostos inorgânicos e orgânicos liberadores de cloro ativo, quaternários de amônio, ácido peracético, dentre outros.

4.1.1 Hipoclorito de sódio

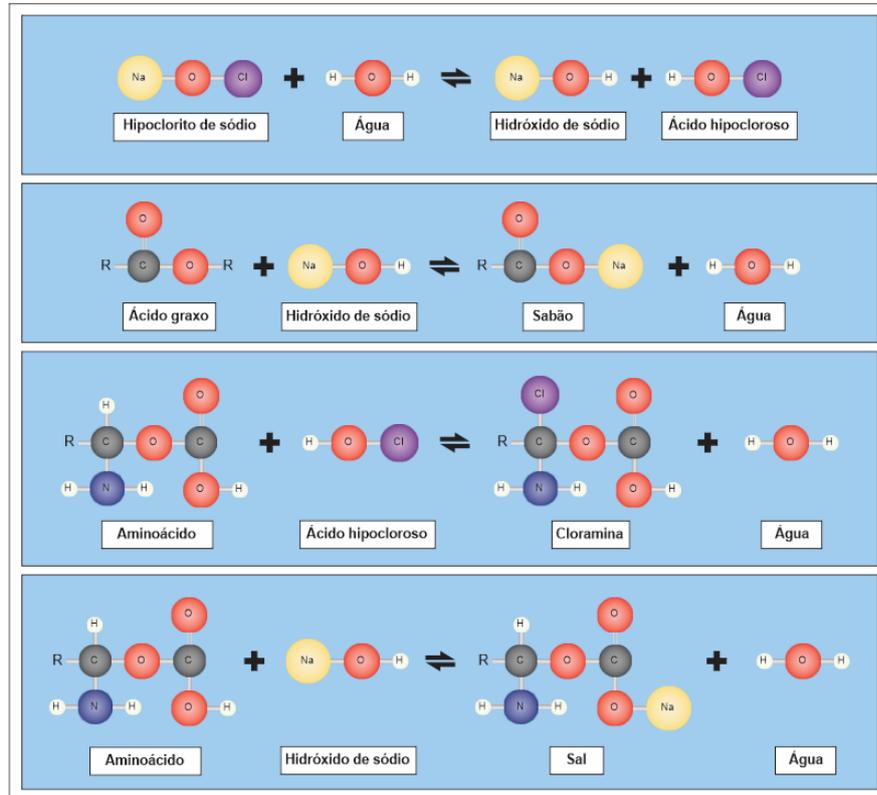
Dentre os compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, o hipoclorito de sódio (NaOCl) apresenta-se como um dos sanitizantes de nível intermediário mais utilizados nas indústrias de alimentos, hospitais e laboratórios clínicos, uma vez que apresenta baixo custo, é de fácil aplicação e tem amplo espectro em sua atividade bactericida (TIWARI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2023). Ao liberar cloro ativo no meio, promove a desestabilização da membrana plasmática e oxidação de todo o protoplasma celular. Além disso, forma cloraminas tóxicas que, por sua vez, alteram a permeabilidade celular e impedem a regeneração enzimática (MENEGARO *et al.*, 2016).

Quanto a sua atividade sobre biofilmes bacterianos, este apresenta muitas funcionalidades. A primeira está relacionada à alteração do pH do meio. Uma vez que NaOCl torna o meio alcalino (pH > 11), ocorre significativo impacto no metabolismo do microrganismo e, conseqüentemente, na formação de biofilme, já que a maioria dos biofilmes naturalmente inicia em um valor de pH próximo do neutro. Além disso, este agente altera diretamente as propriedades da superfície microbiana e da superfície material, impossibilitando a adesão da bactéria e a formação do biofilme (HUANG *et al.*, 2022).

O NaOCl também realiza a desnaturação de proteínas do biofilme e inibe a atividade enzimática dos microrganismos (HUANG *et al.*, 2022; LINEBACK *et al.*, 2018). Além disso, pode promover a saponificação de lipídeos contidos na matriz do biofilme e também, reagir com aminoácidos formando sais e cloraminas, já que NaOCl forma, em meio aquoso, o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido hipocloroso (HOCl) (ESTRELA *et al.*, 2002; TIWARI *et*

al., 2018). Estes são agentes importantes para as reações descritas e como apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Mecanismos de reação de NaOCl.



Fonte: Próprio autor.

Byun *et al.* (2021) demonstraram que NaOCl é efetivo contra biofilme de *Salmonella* Enteritidis em superfícies de contato de alimentos, onde a redução mínima foi de 3,21 log UFC/cm² em superfície de borracha de silicone tratada com solução de NaOCl na concentração de 100 µg/mL. Harada e Nascimento (2021) também avaliaram o potencial de NaOCl sobre biofilme por *B. cereus* formados em superfícies de aço inoxidável e de polipropileno, utilizando soluções de 200 mg/L, com e sem correção de pH (soluções com pH final de 7 e 11, respectivamente). Os resultados apresentaram-se melhores para a solução de pH corrigido, apresentando redução de 1,4 a 1,7 log UFC/cm² superiores à solução de pH 11. Por outro lado, Almatroudi *et al.* (2016) demonstraram que mesmo utilizando altas concentrações (20.000 mg/L), NaOCl não conseguiu eliminar por completo biofilmes de *S. aureus* em cupons de policarbonato, possibilitando o desenvolvimento de um novo biofilme.

Apesar das vantagens, o uso de NaOCl pode oferecer riscos, como corrosão de equipamentos e reações com matéria orgânica formando produtos tóxicos aos humanos e ao

meio ambiente. Também, altas concentrações de cloro em rios afeta a vida de peixes e outros seres vivos (LI *et al.*, 2012; VETAS *et al.*, 2017).

4.1.2 Quaternários de amônio

Os quaternários de amônio (QAs) também apresentam grande eficácia na redução da carga microbiana. Estes são biocidas surfactantes catiônicos e são muito utilizados para desinfecção de superfícies no geral, devido a sua boa compatibilidade com as superfícies, além de apresentar baixo custo e grande espectro de atividade contra microrganismos, incluindo bactérias (especialmente as Gram-positivas), fungos e vírus (PASCOE *et al.*, 2022; DAN *et al.*, 2022).

Há cerca de 391 moléculas contendo frações de amônio quaternário registradas atualmente, das quais 95 estão aprovadas para comercialização, como ambenônio, metilsulfato de hexociclo e brometo de propantelina (DAN *et al.*, 2022).

Quanto à estrutura molecular geral desses compostos, estes são classificados como sais que contêm pelo menos um átomo de nitrogênio carregado positivamente (N^+), podendo ser encontrado tanto em anéis aromáticos, como em estruturas lineares. Ainda, esse N^+ é ligado covalentemente a quatro átomos de carbono, contendo ao menos uma cadeia carbônica como substituinte, de tamanho que varia de 8 a 18 carbonos. Sua solubilidade em água se dá pela presença de uma região hidrofílica da sua estrutura, como de um ânion, que pode ser um cloreto (Cl^-) ou um brometo (Br^-) (ZHOU *et al.*, 2023).

A ação antimicrobiana dos QAs se baseia na interação de seus sítios carregados positivamente com as células bacterianas que são carregadas negativamente. Esse processo perturba a membrana celular, promovendo lise e, conseqüentemente, morte celular. Além disso, quanto maior é a cadeia alquil dessas moléculas, maior será sua hidrofobicidade, facilitando a sua penetração na célula microbiana (ZHOU *et al.*, 2014).

A atividade dos QAs ocorre principalmente em bactérias em estado planctônico, pois em biofilmes a sua ação é retardada, uma vez que esses passam a se interagir com os componentes da matriz carregados negativamente (LIU *et al.*, 2019). Por outro lado, Jennings *et al.* (2014) demonstraram que QAs, usados comercialmente durante anos, podem erradicar biofilmes pré-esbelecidos de *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Embora os QAs sejam considerados seguros, é importante enfatizar que relatórios recentes descobriram acúmulos de QAs no meio ambiente, o que pode ocasionar o desenvolvimento de microrganismos com genes multirresistentes (ZHOU *et al.*, 2023).

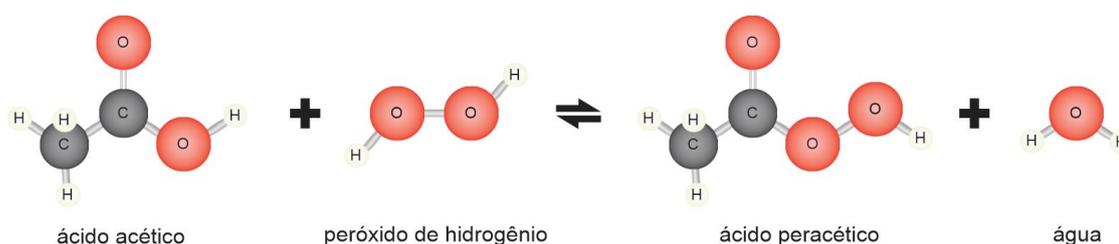
4.1.3 Ácido peracético

O ácido peracético (PAA; H_3CCOOOH) ou ácido peroxiacético, é o agente antimicrobiano mais ativo dos perácidos orgânicos, apresentando um amplo espectro desinfetante, sendo eficaz contra coliformes termotolerantes, *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *Salmonella* spp. (ZOELLNER *et al.*, 2018; ZHANG; BROWN; HU, 2018). Devido a sua eficiência biocida a baixas temperaturas (0 a 25°C), aliada à não-produção de resíduos tóxicos e nocivos ao meio ambiente e ao consumidor, o emprego deste na indústria de alimentos, nos processos de tratamento de água e em hospitais tem apresentado crescimento (LEE *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2022).

O PAA é um agente oxidante que libera radicais hidroxil que atacam componentes essenciais da célula, como o DNA (VAN DER VEEN; ABEE, 2011). Outros mecanismos de ação de PAA também já foram reportados, incluindo a decomposição deste em oxigênio reativo, promovendo rompimento de pontes dissulfeto de enzimas e proteínas presentes na membrana celular, reduzindo o transporte através da membrana e outras funções celulares (PIRONTI *et al.*, 2021).

PAA é o produto da reação de catálise ácida entre o ácido acético e o peróxido de hidrogênio, como mostra a Figura 5, sendo comercialmente disponível como uma solução de equilíbrio entre todos os componentes da reação (PIRONTI *et al.*, 2021; ZOELLNER *et al.*, 2018).

Figura 5 - Obtenção de ácido peracético (PAA).



Fonte: Próprio autor.

Segundo Ibusquiza, Herrera e Cabo (2011), PAA é mais eficiente contra biofilmes, do que alguns outros biocidas, tais como a bacteriocina nisina, devido a suas propriedades físico-químicas, como alta reatividade e ação oxidativa, alta taxa de decomposição e seu pequeno tamanho. Essas propriedades ampliam sua capacidade de penetração na matriz do biofilme.

Porém, há outros fatores que afetam a efetividade de PAA sobre o biofilme. O estudo de Iñiguez-Moreno *et al.* (2018), que testou a ação de PAA em biofilmes mono e duo-espécies

de *Salmonella* spp. e *S. aureus*, mostrou que a efetividade de PAA depende do tipo de superfície que o biofilme se adere. Biofilmes de *Salmonella* spp. desenvolvidos sobre aço inoxidável, demonstraram ser mais susceptíveis à ação de PAA do que os aderidos em polipropileno, fato justificado pela maior hidrofobicidade de polipropileno em comparação ao aço inoxidável.

Atualmente no mercado, existem alguns produtos que liberam íons de peracetato, como o PERAsafe®, que, segundo o estudo de Martín-Espada *et al.* (2014), eliminou 99,89% da população microbiana na concentração de 1,61% sobre biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.

Apesar dos vários benefícios do uso desse desinfetante, como desvantagem temos a sua decomposição gerando resíduos de ácido acético, o que aumenta a concentração de matéria orgânica presente no meio e, conseqüentemente, podendo promover crescimento de bactérias no estado planctônico que não foram inativadas (ZHANG *et al.*, 2019).

4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (EOs) são misturas de substâncias voláteis e aromáticas obtidas de algumas partes de plantas, incluindo flores, raízes, folhas e sementes (RÍOS, 2016). Essa mistura complexa compreende monoterpenoides (como borneol, cânfora, carvacrol, eucaliptol, limoneno), sesquiterpenoides (como o cariofileno) e flavonoides (como o cinamaldeído e outros ácidos fenólicos) (GALIÉ *et al.*, 2018). Estes apresentam muitas funcionalidades, podendo até mesmo ser utilizados como antimicrobianos, principalmente para aplicação em alimentos (BERALDO *et al.*, 2013). EOs que apresentam grandes proporções de fenólicos e aldeídos demonstram grande atividade antimicrobiana.

O mecanismo antimicrobiano comum aos EOs é a capacidade de interação com a parede celular e com a membrana plasmática das células microbianas por promoverem a liberação de lipopolissacarídeos, alterando o equilíbrio de ATP interno e externo, impactando no pH, na síntese de proteínas e promovendo coagulação do material citoplasmático, ruptura do DNA e inibição do mecanismo de QS (EL-TARABILY *et al.*, 2021; JAFRI; ANSARI; AHMAD, 2019).

EOs ricos em monoterpenos e fenilpropanóides demonstram alta eficácia na prevenção da formação de biofilme, principalmente nos estágios iniciais de adesão, uma vez que envolvem mais bactérias planctônicas. Porém, alguns EOs demonstraram eficiência na remoção de biofilmes estabelecidos em certos tipos de superfícies, tais como poliestireno e aço inoxidável, devido alterar a hidrofobicidade das superfícies, e, conseqüentemente, alterar a adesão do biofilme (ROSSI *et al.*, 2022).

O estudo realizado por Kim *et al.* (2016) utilizou EOs ricos em eugenol (EOs de louro, cravo e de pimenta da Jamaica) para o controle de *E. coli* O157:H7, e este mostrou-se promissor para óleos com concentração de eugenol a partir 0,005% (cerca de 50 µg/mL). Também, Kavanaugh e Ribbeck (2012) mostraram que OEs de bálsamo-de-Tolú (*Myroxylon balsamum*), tomilho vermelho (*Thymus vulgaris*), canela-bastarda (*Cinnamomum aromaticum*) mostraram-se efetivos na erradicação de biofilmes de *Pseudomonas* spp. e *S. aureus*.

Mesmo que estes apresentem alta eficiência no controle de crescimento de patógenos e deterioradores de alimentos em testes *in vitro*, em aplicação direta em alimentos, as concentrações requeridas para o mesmo efeito são maiores, impactando significativamente nas características sensoriais e ultrapassando os limites aceitáveis (BERALDO *et al.*, 2013; SZCZEPANSKI; LIPSKI, 2014).

4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

O tratamento enzimático consiste na utilização de enzimas específicas para a remoção de biofilme, uma vez que este é majoritariamente composto (aproximadamente 90%) de EPS, que, como visto anteriormente, é uma mistura de biopolímero, que incluem principalmente proteínas, polissacarídeos e eDNA (BORGES *et al.*, 2020). Assim, como catalisadores naturais, as enzimas podem ser empregadas para degradar esses componentes, promovendo a ruptura do biofilme e até mesmo promovendo morte das células bacterianas (NAHAR *et al.*, 2018).

As enzimas estão classificadas em 6 principais classes: hidrolases, oxirredutases, transferases, liases, isomerases e ligases (NAHAR *et al.*, 2018). Dentre essas, a desoxirribonuclease I (DNase I), hidrolases de glicosídeos, proteases, enzimas *Quorum Quenching* (QQ) são apontadas como as principais enzimas envolvidas na degradação do biofilme (BORGES *et al.*, 2020; UPADHYAY; PAL; KUMAR, 2023; VOGEL; QUAX, 2019).

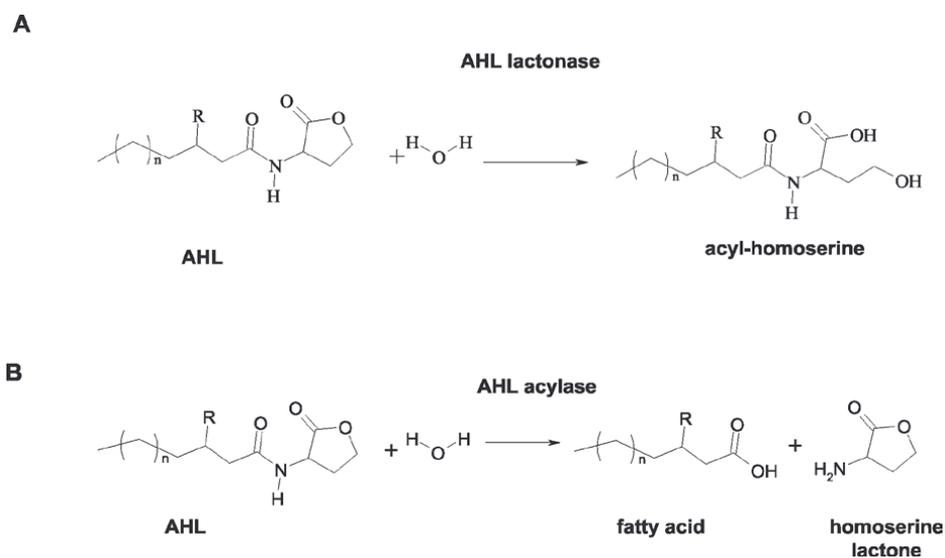
A DNase I atua na degradação do DNA tanto de fita simples, como dupla. Essa enzima quebra as ligações fosfodiéster adjacentes aos nucleotídeos de pirimidina. Assim, a ação dessa enzima é muito importante para a remoção do eDNA, levando ao enfraquecimento da matriz e também aumentando a suscetibilidade da comunidade microbiana aos antibióticos (OKSHEVSKY; REGINA; MEYER, 2015). Esse resultado se dá ao fato de o eDNA ser importante para a estabilidade do biofilme, sendo um conector intercelular das células do biofilme, além de proteger a comunidade de antibióticos catiônicos, promovendo sequestro destes, frente sua carga negativa (OKSHEVSKY; REGINA; MEYER, 2015; RATHER *et al.*, 2021).

A α -amilase e a celulase são enzimas do tipo hidrolases de glicosídeos, muito utilizadas em vários processos industriais. São bastante empregadas no tratamento enzimático de biofilmes, uma vez que essas clivam ligações glicosídicas, quer do tipo α -(1,4), no caso da α -amilase, quer do tipo β -(1,4), no caso da celulase. Assim, α -amilases são capazes de degradar amido, glicogênio e muitos outros oligossacarídeos. Já as celulases hidrolisam celulose e os exopolissacarídeos comumente encontrados em biofilmes, como os de *S. aureus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2022).

Quanto às proteases, tal como a lisostafina, degradam as ligações peptídicas de proteínas e substâncias proteicas do EPS e da parede celular microbiana (NAHAR *et al.*, 2018). Como visto, as proteínas compõem uma fração significativa da matriz do biofilme, onde possuem importante função estrutural, trazendo estabilidade à arquitetura e conectando as células ao EPS do biofilme (PINTO *et al.*, 2020).

Por fim, as enzimas de QQ são um grupo formado pelas AHL-acilases e AHL-lactonases. Essas têm a função de inibir a produção, o transporte e a detecção, ou até mesmo, degradar as AHLs, moléculas sinalizadoras do mecanismo de QS (DE CELIS *et al.*, 2021). As AHL-lactonases hidrolisam o anel lactona da porção homoserina (Figura 6A), enquanto as AHL-acilases realizam a hidrólise da ligação amida entre a cadeia acil e a lactona homoserina (Figura 6B) (CZAJKOWSKI; JAFRA, 2009). As AHL-acilases tem algumas vantagens comparada a outras enzimas de QQ uma vez que o produto da sua catálise é utilizado como fonte de nitrogênio e carbono pelo microrganismo, não podendo formar, espontaneamente, moléculas sinalizadoras do mecanismo de QS novamente (DE CELIS *et al.*, 2021).

Figura 6 - Ação das enzimas de QQ.



Fonte: CZAJKOWSKI; JAFRA (2009).

Segundo Upadhyay, Pal e Kumar (2023), muitos estudos mostram que o emprego de tratamento enzimático utilizando apenas uma enzima não se mostram suficientes para a ruptura de biofilme, uma vez que essa tem como alvo apenas um componente específico, promovendo baixa desestabilização do biofilme.

Yang *et al.* (2023) apresentaram a viabilidade do emprego de um tratamento enzimático com múltiplas enzimas sobre biofilme de *B. cereus*. Foram utilizadas conjuntamente carboidratases (amilase, amiloglicosidase e celulase), proteases (proteínase K e dispase II) e DNase. O estudo revelou que a ação destas enzimas sobre o biofilme é dependente da temperatura e do pH, demonstrando-se promissor na introdução destas ao CIP, em substituição ao NaOH.

Em outro promissor estudo, Daboor, Rohde e Cheng (2021) propuseram a aplicação da enzima alginato liase produzido pela bactéria marinha *Pseudoalteromonas* sobre o biofilme de *P. aeruginosa*. O alginato é um componente importante para *P. aeruginosa*, uma vez que protege essa espécie do estresse oxidativo e da ação de antibióticos.

O tratamento realizado por enzimas é considerado um método limpo de controle de formação de biofilme, dado que os agentes utilizados são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade, porém, apresentam-se como métodos caros e a obtenção e purificação dessas requer cuidados, por exemplo, as DNases apresentam baixa estabilidade operacional (GALIÉ *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019b). Além disso, a utilização destas no CIP deve apresentar muitos cuidados, exigindo etapas importantes para a inativação dessas enzimas após o tratamento.

Ao apresentarem um estudo sobre a aplicação de enzimas no CIP de uma indústria de queijos, Kumar, Tierney e Wilkinson (2021) abordam que a não inativação residual da enzima após o processo de remoção de biofilme em superfícies de equipamentos de processamento, pode impactar na qualidade do produto final. No caso do queijo, há a geração de sabor amargo, devido ao excesso de atividade proteolítica e lipolítica. Assim, propõem-se a aplicação de solução de HNO₃ de 0,5 a 1% à 60 °C para a inativação residual enzimática.

4.4 BACTERIOCINAS

O uso de bacteriocinas é uma alternativa para inibir a formação de biofilmes nas indústrias. Esses antimicrobianos são peptídeos de cadeia curta, produzidos ribossomicamente por bactérias (YUSUF, 2018). A nisina é uma bacteriocina muito empregada em indústrias de alimentos, sendo a única aprovada para aplicação, visto que é segura para o consumo de animais e humanos (GALIÉ *et al.*, 2018).

A nisina é um peptídeo policíclico formado por 34 aminoácidos e sintetizado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Apresentam alguns resíduos de aminoácidos incomuns como lantionina, metil-lantionina, dideidroalanina e ácido dideidroaminobutírico (BAHRAMI *et al.*, 2019; YUSUF, 2018). Assim como a maior parte dos peptídeos antimicrobianos, esta bacteriocina atua na membrana citoplasmática, onde interage com os fosfolipídeos produzindo poros não seletivos (DAVIDSON *et al.*, 2015).

A nisina apresenta diferentes variantes naturais, como a A, Z, Q, F e U. As variantes A e Z apresentam as melhores atividades antimicrobianas e se diferem no aminoácido de posição 27 da cadeia peptídica, estando localizada a histidina na variante A e a asparagina na variante Z (KO *et al.*, 2015). Embora não haja diferenças significativas em suas atividades antimicrobianas, em meios com pH próximo à neutralidade, a nisina Z apresenta maior taxa de difusão e solubilidade que a nisina A (LEWIES *et al.*, 2018).

A nisina A possui ótima atividade antimicrobiana, inclusive contra bactérias patogênicas como *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium difficile* (FLYNN *et al.*, 2019).

Além disso, algumas variantes sintéticas têm sido desenvolvidas. A exemplo, nisina V tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois apresenta uma alta eficiência sobre o crescimento de muitos microrganismos associados à intoxicação alimentar (FIELD *et al.*, 2015).

Segundo Galié *et al* (2018), algumas bacteriocinas e seus efeitos inibitórios frente ao crescimento e formação de biofilme de microrganismos patogênicos, têm sido avaliadas. Dentre elas estão pediocinas (produzida por *Enterococcus* spp.), lactocinas (produzida por *Lactococcus* spp.) e garvicina (produzida por *Lactococcus garvieae*).

4.5 BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos, ou apenas fagos, consistem em vírus de procariotos (especificamente bactérias) que podem ser utilizados como uma alternativa no controle do desenvolvimento de biofilmes bacterianos em superfícies das indústrias de alimentos, já que são considerados seguros para animais e humanos (ŁUSIAK-SZELACHOWSKA; WEBER-DĄBROWSKA; GÓRSKI, 2020).

A ação dos bacteriófagos está direcionada à inserção de seu genoma no genoma bacteriano ou na promoção da lise das células bacterianas alvo (HARPER *et al.*, 2014). A sua propagação é dependente da presença de seu hospedeiro, contribuindo para a difusão do bacteriófago no biofilme (BARROS *et al.*, 2020). Além disso, os bacteriófagos podem carregar

ou expressar enzimas, incluindo depolimerases que degradam o EPS, como também controlar o hospedeiro, a fim de este produza essas mesmas enzimas (HARPER *et al.*, 2014; SHIVARAM *et al.*, 2023).

Para a aplicação desses bacteriófagos, é importante entender que tipo será aplicado, visto que estes possuem hospedeiros específicos. Por exemplo, o fago P100 é utilizado no controle de biofilme de *L. monocytogenes*. Assim como para *S. enterica* e *E. coli*, são utilizados os bacteriófagos com nomes conhecidos comercialmente nos Estados Unidos como *Salmofresh*TM e *ScoShield*TM, respectivamente (GALIÉ *et al.*, 2018).

As limitações da ação dos bacteriófagos no biofilme abrangem dois aspectos. A primeira é a barreira física promovida pelo EPS, dificultando a entrada dos vírus, sendo necessário a aplicação de outros componentes ou que o bacteriófago apresente mecanismos que promovem a liberação do acesso, como a presença de depolimerases de exopolissacarídeos. A segunda é o *status* do metabolismo das células hospedeiras, visto que os bacteriófagos têm preferências por infectar bactérias em fase de crescimento exponencial (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016).

Duc *et al.* (2023) ao caracterizarem o fago STG2, observaram que o mesmo mostrou alta tolerância a temperatura, pH e à presença de NaCl, além de não conter nenhum gene capaz de gerar bactérias resistentes à antibióticos, entre outros fatores. Além disso, o vírus mostrou grande eficiência sobre o biofilme de *Salmonella* spp. em superfícies de contato com alimentos, mostrando ter potencial para aplicação na indústria de alimentos.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente trabalho trouxe aspectos gerais dos mecanismos de formação de biofilmes dos principais patógenos alimentares, além de apresentar alternativas disponíveis no mercado que podem ser utilizadas para a minimização dos problemas de desenvolvimento de biofilme. Entretanto, como visto, a formação de biofilme persiste nas linhas de produção de alimentos, apesar das inúmeras tecnologias que se apresentam hoje no mercado, o que a torna um dos maiores desafios à inocuidade dos produtos alimentícios.

Logo, baseado nas pesquisas realizadas, pôde-se observar que estudo sobre a formação e a expressão de genes associados ao biofilme de patógenos carece de maiores entendimentos e de pesquisas mais profundas. Apesar do entendimento se tornar mais claro sobre alguns mecanismos ao longo dos anos, ainda há diversas dúvidas e imprecisões sobre o envolvimento de genes, dos mecanismos adotados por muitos microrganismos durante a formação de biofilme e dos fatores que induzem o desenvolvimento desse fator de virulência.

Apesar dos avanços em tecnologias efetivas no controle de biofilmes, os custos elevados e a complexa aplicabilidade de muitas, torna difícil a implementação na indústria. Porém, os produtos de baixo custo aplicados atualmente na indústria têm trazido prejuízos ao meio-ambiente, contribuindo para o surgimento de estirpes multirresistentes e gerando riscos para a saúde dos consumidores.

Sendo assim, novas estratégias precisam ser adotadas para a minimização dos efeitos maléficos, uma delas pode ser o uso combinado de tecnologias sobre a formação e os biofilmes formados, uma vez que essas podem potencializar o processo de controle, reduzir custos com implementação e reduzir os impactos com acúmulo desses materiais na natureza.

É importante considerar a necessidade de implementação do Procedimento Operacional Padrão (POP) na indústria, que deve conter informações de concentração de sanitizantes, tempo de contato destes com as superfícies, temperatura de aplicação e fluxo da solução.

Além disso, é imprescindível que os colaboradores sejam treinados para fazer corretamente os procedimentos diariamente e que a indústria faça um monitoramento da contaminação microbiológica ambiental de maneira periódica, que avalie o design dos equipamentos, adequando-os ao padrão higiênico-sanitário.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. *Staphylococcus aureus* and other pathogenic Gram-positive cocci. Em: BLACKBURN, C. DE W.; MCCLURE, P. J. (Eds.). **Foodborne Pathogens (Second Edition)**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 802–819.

ALLKJA, J. *et al.* Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. **Biofilm**, v. 2, 1 dez. 2020.

ALMEIDA, F. A. *et al.* Acyl homoserine lactone-based quorum sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis in anaerobic conditions. **Arch Microbiol.** 2017 Apr;199(3):475-486. doi: 10.1007/s00203-016-1313-6. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27838734.

ALMATROUDI, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 3, p. 263–270, 1 jul. 2016.

ALONSO, A. N. *et al.* Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e113696, 2014.

ALONSO, V. P. P.; MORAIS, J. DE O.; KABUKI, D. Y. Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 354, p. 109318, 16 set. 2021.

ALZUBEIDI, Y. S. *et al.* Inactivation of *Clostridium perfringens* spores adhered onto stainless steel surface by agents used in a clean-in-place procedure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 277, p. 26–33, 20 jul. 2018.

ANTUNES, P. *et al.* Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, 1 fev. 2016.

ARAÚJO, P. M. *et al.* Assessment of biofilm formation by *Campylobacter* spp. isolates mimicking poultry slaughterhouse conditions. **Poultry Science**, v. 101, n. 2, p. 101586, fev. 2022.

BAHRAMI, A. *et al.* Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 94, p. 20–31, 1 dez. 2019.

BARROS, J. A. R. *et al.* Encapsulated bacteriophages in alginate-nanohydroxyapatite hydrogel as a novel delivery system to prevent orthopedic implant-associated infections. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 24, p. 102145, 1 fev. 2020.

BAZARI, P. A. M.; HONARMAND JAHROMY, S.; ZARE KARIZI, S. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens, an Atomic Force Microscopic (AFM) study. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 533–539, 1 set. 2017.

BERALDO, C. *et al.* Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 436–440, dez. 2013.

BHARDWAJ, D. K. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of multi-drug resistant, biofilm forming, human invasive strain of *Salmonella* Typhimurium SMC25 isolated from poultry meat in India. **Microbial Pathogenesis**, v. 173, p. 105830, 1 dez. 2022.

BORGES, A. *et al.* Biofilm control with enzymes. Em: SIMOES, M.; BORGES, A.; CHAVES SIMOES, L. (Eds.). **Recent Trends in Biofilm Science and Technology**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 249–271.

BRASÃO, S. C. *et al.* Characterization and control of biofilms of *Salmonella* Minnesota of poultry origin. **Food Bioscience**, v. 39, p. 100811, 1 fev. 2021.

BRASIL. **Doenças Transmitidas por Alimentos e Água (DTA)**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/148doencas_alim_agua.html>. Acesso em: 8 abr. 2020.

BRASIL. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2022**. [s.l.] Ministério da Saúde, jan. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022>> Acesso em: 28 mar. 2023.

BRINDHADEVI, K. *et al.* Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 96, p. 49–57, 1 set. 2020.

BYUN, K.-H. *et al.* Efficacy of chlorine-based disinfectants (sodium hypochlorite and chlorine dioxide) on *Salmonella* Enteritidis planktonic cells, biofilms on food contact surfaces and chicken skin. **Food Control**, v. 123, p. 107838, 1 maio 2021.

CAMUSSONE, C. M.; CALVINHO, L. F. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, p. 119–130, 1 jan. 2013.

CARRASCOSA, C. *et al.* Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 4, p. 2014, jan. 2021.

CARTER, M. Q. *et al.* Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. **Food Microbiology**, v. 57, p. 81–89, 1 ago. 2016.

CASTRO, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. *Staphylococcus aureus*, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. Em: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Foodborne Diseases**. Handbook of Food Bioengineering. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 213–238.

CHARLEBOIS, A.; JACQUES, M.; ARCHAMBAULT, M. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 183, 2014.

CHARLEBOIS, A.; JACQUES, M.; ARCHAMBAULT, M. Comparative transcriptomic analysis of *Clostridium perfringens* biofilms and planktonic cells. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.**, v. 45, n. 5, p. 593–601, out. 2016.

CHARLES VEGDAHL, A.; SCHAFFNER, D. W. Curli Production Influences Cross-contamination by *Escherichia coli* O157:H7 When Washing Fresh-cut Romaine Lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 86, n. 1, p. 100023, 1 jan. 2023.

CHLEBICZ, A.; ŚLIŻEWSKA, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. E863, 26 abr. 2018.

CISCO, I. C. *et al.* *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* EM CARÇAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS E CONGELADAS. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, 23 out. 2017.

CLOETE, E. *et al.* 1 - Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. Em: FRATAMICO, P. M.; ANNOUS, B. A.; GUNTHER, N. W. (Eds.). **Biofilms in the Food and Beverage Industries**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 3–41.

COLAGIORGI, A. *et al.* *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 3, p. E41, 4 set. 2017.

CZAJKOWSKI, R.; JAFRA, S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 1, p. 1–16, 2009.

DABOOR, S. M.; ROHDE, J. R.; CHENG, Z. Disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate lyase enhances pathogen eradication by antibiotics. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 20, n. 2, p. 264–270, mar. 2021.

DAN, W. *et al.* Antibacterial quaternary ammonium agents: Chemical diversity and biological mechanism. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 243, p. 114765, 5 dez. 2022.

DAS, M. C. *et al.* Vitexin alters *Staphylococcus aureus* surface hydrophobicity to obstruct biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 263, p. 127126, 1 out. 2022.

DAVIDSON, P. M. *et al.* 1 - The use of natural antimicrobials in food: An overview. Em: TAYLOR, T. M. (Ed.). **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**. Oxford: Woodhead Publishing, 2015. p. 1–27.

DE CELIS, M. *et al.* Acylase enzymes disrupting quorum sensing alter the transcriptome and phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*, and the composition of bacterial biofilms from wastewater treatment plants. **The Science of the Total Environment**, v. 799, p. 149401, 10 dez. 2021.

DI CICCIO, P. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930–936, 1 abr. 2015.

DUC, H. M. *et al.* Genomic characterization and application of a novel bacteriophage STG2 capable of reducing planktonic and biofilm cells of Salmonella. **International Journal of Food Microbiology**, v. 385, p. 109999, 16 jan. 2023.

EL-TARABILY, K. A. *et al.* Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 5145–5156, 1 set. 2021.

ENOSI TUIPULOTU, D. *et al.* *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host-Pathogen Interactions. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 458–471, maio 2021.

ESTRELA, C. *et al.* Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, p. 113–117, 2002.

FEDERLE, M. J.; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 9, p. 1291–1299, nov. 2003.

FIELD, D. *et al.* Efficacy of nisin A and nisin V semi-purified preparations alone and in combination with plant essential oils to control *Listeria monocytogenes*. 6 fev. 2015.

FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, set. 2016.

FLYNN, J. *et al.* Mesoporous matrices for the delivery of the broad spectrum bacteriocin, nisin A. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, p. 396–406, 1 mar. 2019.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A. *Staphylococcus aureus*. Em: TANG, Y.-W. *et al.* (Eds.). **Molecular Medical Microbiology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2015. p. 655–674.

GALIÉ, S. *et al.* Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 898, 2018.

GAMAZO, C.; SOLANO, C.; LASA, I. Biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments. Em: FRATAMICO, P. M.; ANNOUS, B. A.; GUNTHER, N. W. (Eds.). **Biofilms in the Food and Beverage Industries**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 226–249.

GANDRA, T. K. V. *et al.* Expression levels of the *agr* locus and *prfA* gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 300, p. 1–7, 2 jul. 2019.

GAO, T. *et al.* Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. **MicrobiologyOpen**, v. 4, n. 3, p. 452–464, jun. 2015.

GARCÍA-SÁNCHEZ, L. *et al.* Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. **Food Microbiology**, v. 83, p. 193–199, out. 2019.

GRAZIANI, C. *et al.* *Salmonella*. Em: DODD, C. E. R. *et al.* (Eds.). **Foodborne Diseases (Third Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 133–169.

GU, T. *et al.* *Listeria monocytogenes* biofilm formation as affected by stainless steel surface topography and coating composition. **Food Control**, v. 130, p. 108275, 1 dez. 2021.

GUTIÉRREZ, D. *et al.* Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

HARADA, A. M. M.; NASCIMENTO, M. S. Effect of dry sanitizing methods on *Bacillus cereus* biofilm. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 919–926, 23 fev. 2021.

HARPER, D. R. *et al.* Bacteriophages and Biofilms. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 270–284, 25 jun. 2014.

HASHIMOTO, A.; SUZUKI, H.; OONAKA, K. Prevalence of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* in surface-attached soil of commercially available potatoes and its significance as a potential source of food poisoning. **Anaerobe**, v. 79, p. 102687, fev. 2023.

HU, W.-S.; KIM, H.; KOO, O. K. Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea. **Anaerobe**, v. 52, p. 115–121, ago. 2018.

HUANG, C. *et al.* Effect of sodium hypochlorite on biofilm of *Klebsiella pneumoniae* with different drug resistance. **American Journal of Infection Control**, WHO Special issue: Personal protective equipment research and innovation in the context of the World Health Organization COVID-19 R&D Blueprint program. v. 50, n. 8, p. 922–928, 1 ago. 2022.

HUSSAIN, M. S. *et al.* Effect of Electrolyzed Water on the Disinfection of *Bacillus cereus* Biofilms: The Mechanism of Enhanced Resistance of Sessile Cells in the Biofilm Matrix. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 5, p. 860–869, maio 2018.

HWANG, D. *et al.* Enterotoxin genes, biofilm formation, and antimicrobial and disinfectant resistance of *Bacillus cereus* isolates from primary producing stages. **Food Control**, v. 141, p. 109196, 1 nov. 2022.

IBUSQUIZA, P. S.; HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 418–425, 1 maio 2011.

IÑIGUEZ-MORENO, M. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 49, n. 2, p. 310–319, 2018.

JAFRI, H.; ANSARI, F. A.; AHMAD, I. Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm. Em: AHMAD KHAN, M. S.; AHMAD, I.; CHATTOPADHYAY, D. (Eds.). **New Look to Phytomedicine**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 203–236.

JENNINGS, M. C. *et al.* Biofilm-eradicating properties of quaternary ammonium amphiphiles: simple mimics of antimicrobial peptides. **ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 15, n. 15, p. 2211–2215, 13 out. 2014.

JORDAN, K.; MCAULIFFE, O. *Listeria monocytogenes* in Foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 86, p. 181–213, 2018.

KANG, Y. *et al.* Unraveling the role of quorum sensing-dependent metabolic homeostasis of the activated methyl cycle in a cooperative population of *Burkholderia glumae*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11038, 30 jul. 2019.

KAVANAUGH, N. L.; RIBBECK, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4057–4061, jun. 2012.

KIM, Y.-G. *et al.* Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36377, 3 nov. 2016.

KO, K. Y. *et al.* Analysis method for determination of nisin A and nisin Z in cow milk by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1435–1442, 1 mar. 2015.

KOSECKA-STROJEK, M.; BUDA, A.; MIĘDZOBRODZKI, J. Staphylococcal Ecology and Epidemiology. Em: SAVINI, V. (Ed.). **Pet-To-Man Travelling Staphylococci**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 11–24.

KUMAR, M.; TIERNEY, J.; WILKINSON, M. Enzymatic Disruption of Biofilms During Cheese Manufacturing: A Mini Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

LABBE, R. G.; JUNEJA, V. K. *Clostridium perfringens*. Em: DODD, C. E. R. *et al.* (Eds.). **Foodborne Diseases (Third Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 235–242.

LANGSRUD, S. 9 - Biofilm formation by Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus* spp. in food processing environments. Em: FRATAMICO, P. M.; ANNOUS, B. A.; GUNTHER, N. W. (Eds.). **Biofilms in the Food and Beverage Industries**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 250–269.

- LEE, S. H. I. *et al.* Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2384–2390, 1 mar. 2016.
- LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. *Staphylococcus*: Occurrence and Properties. Em: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Eds.). **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 140–145.
- LEWIES, A. *et al.* The antimicrobial peptide nisin Z induces selective toxicity and apoptotic cell death in cultured melanoma cells. **Biochimie**, v. 144, p. 28–40, 1 jan. 2018.
- LI, H. *et al.* Inhibition mechanism of cyclo (L-Phe-L-Pro) on early stage *Staphylococcus aureus* biofilm and its application on food contact surface. **Food Bioscience**, v. 49, p. 101968, 1 out. 2022.
- LI, Z. F. *et al.* Experimental Study on Secondary Effluent Disinfection with Ultrasound and Chlorine. **Advanced Materials Research**, v. 383–390, p. 3786–3791, 2012.
- LIN, S. *et al.* Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 285–291, 1 out. 2017.
- LINEBACK, C. B. *et al.* Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 154, 17 dez. 2018.
- LIU, F. *et al.* Quaternary Ammonium Salt-Based Cross-Linked Micelles to Combat Biofilm. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 541–546, 20 mar. 2019a.
- LIU, Z. *et al.* A series of MOF/Ce-based nanozymes with dual enzyme-like activity disrupting biofilms and hindering recolonization of bacteria. **Biomaterials**, v. 208, p. 21–31, 1 jul. 2019b.
- ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M.; WEBER-DĄBROWSKA, B.; GÓRSKI, A. Bacteriophages and Lysozymes in Biofilm Control. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 125–133, abr. 2020.
- MA, L. *et al.* *Campylobacter* biofilms. **Microbiological Research**, v. 264, p. 127149, nov. 2022.
- MA, R. *et al.* AI-2 quorum sensing negatively regulates rbf expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 4, p. 257–267, 1 jun. 2017.
- MACHADO, I. *et al.* Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 127, p. 108754, jan. 2020.
- MACHADO, T. R. M. *et al.* Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475–481, 1 abr. 2010.
- MAGAJNA, B. A.; SCHRAFT, H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts. **Food Control**, v. 50, p. 45–50, 1 abr. 2015.

- MAJED, R. *et al.* *Bacillus cereus* Biofilms-Same, Only Different. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1054, 2016.
- MARTÍN-ESPADA, M. C. *et al.* Peracetic acid disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on polystyrene surfaces and comparison between methods to measure it. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 58–61, 1 abr. 2014.
- MENDEZ, M. *et al.* Carbon catabolite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 48–60, jan. 2008.
- MENEGARO, A. *et al.* Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**, p. 171–174, 5 jul. 2016.
- MILTON, A. A. P. *et al.* Prevalence, toxinotyping, antimicrobial susceptibility and biofilm-forming ability of *Clostridium perfringens* isolated from free-living rodents and shrews. **Anaerobe**, v. 77, p. 102618, out. 2022.
- MOUFTAH, S. F. *et al.* Stress resistance associated with multi-host transmission and enhanced biofilm formation at 42 °C among hyper-aerotolerant generalist *Campylobacter jejuni*. **Food Microbiology**, v. 95, p. 103706, maio 2021.
- MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 371–382, jun. 2019.
- NAHAR, S. *et al.* Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 6, p. 1484–1502, nov. 2018.
- OBANA, N.; NAKAMURA, K.; NOMURA, N. A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 8, p. 1540–1550, abr. 2014.
- OBANA, N.; NAKAMURA, K.; NOMURA, N. A sporulation factor is involved in the morphological change of *Clostridium perfringens* biofilms in response to temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 8, p. 1540–1550, abr. 2014.
- OH, E., KIM, J.C., JEON, B., 2016. Stimulation of biofilm formation by oxidative stress in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Virulence* 7 (7), 846–851.
- OHADI, E. *et al.* Transcriptome analysis of biofilm formation under aerobic and microaerobic conditions in clinical isolates of *Campylobacter* spp. **Research in Veterinary Science**, v. 142, p. 24–30, 19 nov. 2021.
- OKSHEVSKY, M.; REGINA, V. R.; MEYER, R. L. Extracellular DNA as a target for biofilm control. **Current Opinion in Biotechnology**, Environmental biotechnology • Energy biotechnology. v. 33, p. 73–80, 1 jun. 2015.
- OLIVEIRA, M. M. M. DE; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 1 mar. 2010.

OLOKETUYI, S. F.; KHAN, F. Strategies for Biofilm Inhibition and Virulence Attenuation of Foodborne Pathogen-*Escherichia coli* O157:H7. **Current Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 1477–1489, dez. 2017.

PALUCH, E. *et al.* Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1871–1881, mar. 2020.

PANTALÉON, V. *et al.* Biofilms of *Clostridium* species. **Anaerobe**, v. 30, p. 193–198, dez. 2014.

PARK, K. M. *et al.* Enterotoxin Genes, Antibiotic Susceptibility, and Biofilm Formation of Low-Temperature-Tolerant *Bacillus cereus* Isolated from Green Leaf Lettuce in the Cold Chain. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 249, 25 fev. 2020.

PASCOE, M. J. *et al.* Impact of material properties in determining quaternary ammonium compound adsorption and wipe product efficacy against biofilms. **Journal of Hospital Infection**, v. 126, p. 37–43, 1 ago. 2022.

PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W. *Salmonella*. Em: PERCIVAL, S. L. *et al.* (Eds.). **Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)**. London: Academic Press, 2014. p. 209–222.

PINTO, R. M. *et al.* Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

PIRONTI, C. *et al.* Comparative analysis of peracetic acid (PAA) and permaleic acid (PMA) in disinfection processes. **Science of The Total Environment**, v. 797, p. 149206, 25 nov. 2021.

RAHMAN, S. M. E. *et al.* Control of bacterial biofilms in red meat – A systematic review. **Meat Science**, v. 192, p. 108870, 1 out. 2022.

RAMAKRISHNAN, R. *et al.* Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 9, p. 102352, 6 ago. 2022.

RATHER, M. A. *et al.* Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 380–395, 2021.

RATHER, M. A. *et al.* Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 380–395, 2021.

REES, C. E. D.; DOYLE, L.; TAYLOR, C. M. *Listeria monocytogenes*. Em: DODD, C. E. R. *et al.* (Eds.). **Foodborne Diseases (Third Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 253–276.

RELLER, M. E. *Salmonella* Species. Em: LONG, S. S. (Ed.). **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition)**. London: Elsevier, 2012. p. 814-819.e2.

RÍOS, J.-L. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. Em: PREEDY, V. R. (Ed.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Academic Press, 2016. p. 3–10.

ROSSI, C. *et al.* Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 2172–2191, 2022.

ROSSI, C. *et al.* Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 2172–2191, 2022.

ROY, P. K. *et al.* Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101209, 1 jul. 2021.

RYU, J.-H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247–254, 1 jan. 2005.

SADEKUZZAMAN, M. *et al.* Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 78, p. 256–263, 1 ago. 2017.

SAMANTA, I.; BANDYOPADHYAY, S. *Staphylococcus*. Em: SAMANTA, I.; BANDYOPADHYAY, S. (Eds.). **Antimicrobial Resistance in Agriculture**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 195–215.

SEVIOUR, T. *et al.* Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. **Water Research**, v. 151, p. 1–7, 15 mar. 2019.

SHIVARAM, K. B. *et al.* Bacteriophage-based biocontrol technology to enhance the efficiency of wastewater treatment and reduce targeted bacterial biofilms. **Science of The Total Environment**, v. 862, p. 160723, 1 mar. 2023.

SILVA, M. P. DA *et al.* Modelling adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* isolated from dairy products as a function of pH, temperature and time. **International Dairy Journal**, v. 134, p. 105472, 1 nov. 2022.

SINGH, M. P. *et al.* Microbial biofilms: Development, structure, and their social assemblage for beneficial applications. Em: YADAV, M. K.; SINGH, B. P. (Eds.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 125–138.

SMITH, C. J.; OLSZEWSKA, M. A.; DIEZ-GONZALEZ, F. Selection and application of natural antimicrobials to control *Clostridium perfringens* in sous-vide chicken breasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 347, p. 109193, 2 jun. 2021.

SUBRAMANIAN, S. *et al.* Microsystems for biofilm characterization and sensing – A review. **Biofilm**, v. 2, p. 100015, 1 dez. 2020.

SUN, Z. *et al.* Quorum sensing regulation methods and their effects on biofilm in biological waste treatment systems: A review. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 16, n. 7, p. 87, 2 nov. 2021.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 224–229, 1 fev. 2014.

TEH, K. H.; FLINT, S.; FRENCH, N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 118–124, 15 out. 2010.

THEODORA, N. A.; DOMINIKA, V.; WATURANGI, D. E. Screening and quantification of anti-quorum sensing and antibiofilm activities of phyllosphere bacteria against biofilm forming bacteria. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 732, 7 nov. 2019.

THOMPSON, L. J. Enterotoxins. Em: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology (Third Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 759–761.

TIWARI, S. *et al.* Sodium hypochlorite is more effective than 70% ethanol against biofilms of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 6, p. e37–e42, 1 jun. 2018.

TRACHOO, N. Attachment of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* on food soiled plastic surfaces. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 10, n. 11, p. 1918–1921, 1 jun. 2007.

TRACHOO, N.; FRANK, J. F.; STERN, N. J. Survival of *Campylobacter jejuni* in Biofilms Isolated from Chicken Houses. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1110–1116, 1 jul. 2002.

UPADHYAY, A.; PAL, D.; KUMAR, A. Combinatorial enzyme therapy: A promising neoteric approach for bacterial biofilm disruption. **Process Biochemistry**, v. 129, p. 56–66, 1 jun. 2023.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 421–431, 5 jan. 2011.

VARGA, J. J.; THERIT, B.; MELVILLE, S. B. Type IV Pili and the CcpA Protein Are Needed for Maximal Biofilm Formation by the Gram-Positive Anaerobic Pathogen *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4944–4951, nov. 2008.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. Em: FETSCH, A. (Ed.). **Staphylococcus aureus**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 87–103.

VETAS, D. *et al.* Disinfection efficiencies of sage and spearmint essential oils against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus* cells in comparison with sodium hypochlorite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 19–25, 18 set. 2017.

VISHWAKARMA, V. Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 198–206, 2020.

VOGEL, J.; QUAX, W. J. Enzymatic Quorum Quenching in Biofilms. Em: TOMMONARO, G. (Ed.). **Quorum Sensing**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 173–193.

WANG, D. *et al.* Biofilm formation, sodium hypochlorite susceptibility and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 385, p. 110011, 16 jan. 2023.

- WEERARATHNE, P. *et al.* Evaluating the efficacy of sodium acid sulfate to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and its biofilms on food-contact surfaces. **LWT**, v. 139, p. 110501, 1 mar. 2021.
- WERNER, R. K. *Escherichia coli* O157:H7 (Enterohemorrhagic *E. coli*). Em: CIOTTONE, G. R. (Ed.). **Ciottone's Disaster Medicine (Second Edition)**. Philadelphia: Elsevier, 2016. p. 746–749.
- XU, Y. *et al.* Inhibitory effects of reuterin on biofilm formation, quorum sensing and virulence genes of *Clostridium perfringens*. **LWT**, v. 162, p. 113421, 1 jun. 2022.
- YADAV, J. P. *et al.* Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* from India: A scoping review. **Anaerobe**, v. 77, p. 102639, out. 2022.
- YAN, F. *et al.* Genome-Wide Investigation of Biofilm Formation in *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 13, p. e00561-17, 1 jul. 2017.
- YANG, S. *et al.* Applying enzyme treatments in *Bacillus cereus* biofilm removal. **LWT**, v. 180, p. 114667, 15 abr. 2023.
- YASSORALIPOUR, A. *et al.* Simulated transmission and decontamination of *Listeria monocytogenes* biofilms from plastic cutting boards. **Food Control**, v. 149, p. 109678, 1 jul. 2023.
- YI, J.; ANDERSON, E. J. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Em: LONG, S. S.; PROBER, C. G.; FISCHER, M. (Eds.). **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 899-902.e3.
- YUAN, L. *et al.* Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 22, p. 3876–3891, 2021.
- YUSUF, M. Natural Antimicrobial Agents for Food Biopreservation. Em: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (Eds.). **Food Packaging and Preservation**. Handbook of Food Bioengineering. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 409–438.
- ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 569–576, ago. 2012.
- ZHANG, B. *et al.* The AI-2/luxS Quorum Sensing System Affects the Growth Characteristics, Biofilm Formation, and Virulence of *Haemophilus parasuis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.
- ZHANG, C. *et al.* Inhibition of regrowth of planktonic and biofilm bacteria after peracetic acid disinfection. **Water Research**, v. 149, p. 640–649, 1 fev. 2019.
- ZHANG, C.; BROWN, P. J. B.; HU, Z. Thermodynamic properties of an emerging chemical disinfectant, peracetic acid. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 948–959, 15 abr. 2018.

ZHOU, H. *et al.* Evaluation of three-dimensional biofilms on antibacterial bonding agents containing novel quaternary ammonium methacrylates. **International Journal of Oral Science**, v. 6, n. 2, p. 77–86, jun. 2014.

ZHOU, Z. *et al.* Quaternary Ammonium Salts: Insights into Synthesis and New Directions in Antibacterial Applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 302–325, 15 fev. 2023.

ZHU, Y. *et al.* Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 142–151, 1 maio 2020.

ZHUANG, J. *et al.* Synergistic effects of peracetic acid and oxalic acid on structural transformation of eucalyptus and its conversion. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115530, 15 nov. 2022.

ZOELLNER, C. *et al.* Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables. Em: SIDDIQUI, M. W. (Ed.). **Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 53–66.