

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS– PPGCTA

DOUGLAS STANGUERLIN

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE CARCAÇA E DE ABATEDOURO DE FRANGO, ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE SANITIZANTES SINTÉTICOS E DO ISOLADO *Lactococcus lactis* LLH20 EM DIFERENTES SUPERFÍCIES

PINHALZINHO, SC

2021

DOUGLAS STANGUERLIN

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE CARCAÇA E DE ABATEDOURO DE FRANGO, ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE SANITIZANTES SINTÉTICOS E DO ISOLADO *Lactococcus lactis* LLH20 EM DIFERENTES SUPERFÍCIES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Propriedade e Segurança dos Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cleuzir da Luz;

Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Bär Schuster.

PINHALZINHO, SC

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Stanguerlin, Douglas

Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*
provenientes de carcaça e de abatedouro de frango, atividade
antibiofilme de sanitizantes sintéticos e do isolado
Lactococcus lactis LLH20 em diferentes superfícies / Douglas
Stanguerlin. -- 2021.
88 p.

Orientador: Cleuzir da Luz

Coorientador: Marcia Bär Schuster.

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação , Chapecó, 2021.

1. Sanitizantes. 2. Cocultura. 3. Micro-organismos. 4.
Bactérias ácido lácticas. I. da Luz, Cleuzir. II. Bär Schuster.,
Marcia. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro
de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação . IV. Título.

DOUGLAS STANGUERLIN

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES
DE CARÇA E DE ABATEDOURO DE FRANGO, ATIVIDADE
ANTIBIOFILME DE SANITIZANTES SINTÉTICOS E DO ISOLADO
Lactococcus lactis LLH20 EM DIFERENTES SUPERFÍCIES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Propriedade e Segurança dos Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cleuzir da Luz – Orientador

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC



Membros:

Prof. Dra. Liziane Schittler Moroni

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC



Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Universidade Federal de Pelotas – UFPL

Pinhalzinho, 11 de junho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por ter me possibilitado tantas escolhas corretas ao longo de minha vida. Agradeço também por me guiar e me dar forças para superar os obstáculos a cada dia.

Aos meus pais, Antonio e Eva, meus portos seguros, que me ensinaram a ser um homem correto e responsável, e que em alguns momentos da minha vida abdicaram de inúmeras coisas em prol de minha felicidade, fornecendo sempre apoio fundamental em minhas escolhas. Podem ter certeza, todas as minhas decisões foram tomadas a partir de vossos ensinamentos. Obrigado por entenderem os momentos nos quais me fiz ausente.

Aos meus irmãos, Rafael e Francielli, pela amizade, conselhos e ensinamentos. Às minhas sobrinhas e sobrinhos queridos pelas alegrias e pelo amor incondicional.

À professora Dra. Liziane Schittler pela dedicação, confiança, meu muito obrigado por compartilhar muitos conhecimentos durante todos os momentos.

Ao meu orientador professor Dr. Cleuzir da Luz e à coorientadora profa. Dra. Marcia Bär Schuster pela orientação dada neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC e a todos os professores pelos seus ensinamentos.

Aos laboratórios Microlab e Biolab da UDESC/CEO, ao laboratório multiusuário da UDESC/CCT e ao do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas – UFPel pela disponibilização para realização dos experimentos.

A todos meus amigos de longa data, aqui representados pelas pessoas de Ivan De Marco, André Gustavo Patel, Robson de Oliveira, Karla Ribeiro do Santos, Juliana Karvat e Naara Aparecida Almeida obrigado pelo apoio, palavras de conforto e por entenderem minhas ausências e meus momentos de estresse.

Às amigas que o mestrado me presenteou: Fernanda Copatti e Leticia Cordeiro, agradeço por todos os momentos de descontração, alegrias e conhecimento compartilhado.

Ao meu “grupinho”: Pâmela Lima, Fabiomar Tecchio, e Fabiane Mores por tornarem os meus dias mais leves e felizes com vocês. Gratidão!

Às colegas do Microlab, Natalia Valduga, Stéfani Mallmann e Tais Cechin pela amizade e apoio nos experimentos.

A todos que, direta ou indiretamente, perto ou longe, torceram, acreditaram e me ajudaram a fazer com que este sonho fosse possível.

MUITO OBRIGADO!

Se você sempre agiu em legítima defesa da sua felicidade, se perdoe. O mundo inteiro já é suficiente para condená-lo. Se ofereça absolvição. A sua alma terá paz. A sua vida terá cor. O seu sono será mais tranquilo. Você ofereceu sempre seu melhor, mesmo diante do seu pior. Isso é suficiente.

(ROCHA, 2019, p. 86)

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria que pode causar listeriose e manifestações mais graves em indivíduos do grupo de risco, sendo encontrada em alimentos processados e não processados. Este estudo objetivou avaliar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *L. monocytogenes* e a atividade antibiofilme de compostos sintéticos e do isolado *Lactococcus lactis* subespécie *hordniae* (LLH20). Dez isolados de *L. monocytogenes* provenientes da carcaça e de abatedouro de frangos foram avaliados quanto à capacidade de produzir biofilme. Além disso, realizou-se a identificação de genes relacionados à formação de biofilme: *prfA*, *agrA*, *agrb*, *agrC*, *agrD*, *flaA*, *cheA*, *CheY*, *sigB* e *actA*. Os isolados de *L. monocytogenes* com melhor produção de biofilme foram aplicados em superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro, a fim de testar a capacidade de adesão dos micro-organismos nessas superfícies, submetidas à diferentes tempos e temperaturas. Avaliou-se a ação de sanitizantes sintéticos: ácido peracético (APA 0,2%) e composto de quaternário de amônia (CQA 2%), além de uma cocultura de LLH20 sobre biofilme de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável, polietileno e vidro. Para a verificação das alterações morfológicas dos isolados de *L. monocytogenes* nas superfícies utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todos os isolados produziram biofilme, dos quais, três foram classificados como moderados e outros sete, como fortes produtores de biofilme. Todos isolados de *L. monocytogenes* portavam pelo menos um dos genes que participam na formação do biofilme. Os isolados L21 e L32 aderiram às superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro em todas as temperaturas e tempos avaliados. Dentre as superfícies, o polietileno se mostrou mais suscetível à formação de biofilme, provavelmente devido à sua hidrofobicidade. A ação dos sanitizantes sintéticos APA (0,2%) e CQA (2%) mostrou-se eficaz na redução das contagens de biofilme de *L. monocytogenes* para todas as superfícies, com resultados de $<2,0 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$. A cocultura de LLH20 promoveu reduções significativas dos isolados de *L. monocytogenes* que variaram de 0,75 a 4,5 $\log \text{ UFC.cm}^{-2}$. Embora não tenha sido observado em MEV estruturas mais complexas do isolado L32 sob às superfícies de polietileno e vidro, foi possível visualizar pequenos aglomerados de biofilmes. Uma suposição para não formação dessas estruturas está relacionada ao próprio processo de preparação da amostra. Já na superfície de aço inoxidável verificou-se

a formação de pequenas cadeias ao longo do limite granulado por conta da topografia dessa superfície. Conclui-se que os isolados avaliados são produtores de biofilmes e que a ação dos sanitizantes químicos APA (0,2%) e o CQA (2%) são eficazes contra a formação de biofilmes. Enquanto, a cocultura de LLH20 apresentou reduções significativas na formação de biofilmes de *L. monocytogenes*, podendo ser atribuída essa redução aos compostos antagonistas produzidos pelo isolado LLH20, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocina. Dessa forma, a utilização de LLH20 pode ser uma potencial alternativa para o controle de biofilmes por *L. monocytogenes* em alimentos e equipamentos.

Palavras-chave: Sanitizantes. Cocultura. Micro-organismos. Bactérias ácido lácticas.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a bacterium that can cause listeriosis and more severe manifestations in liking the risk group, being found in processed and unprocessed foods. This study aimed to evaluate the biofilm formation capacity of *L. monocytogenes* isolates and the antibiofilm activity of synthetic compounds and of the isolate *Lactococcus lactis subspecies hordniae* (LLH20). Ten isolates of *L. monocytogenes* from chicken carcass and slaughterhouse were evaluated for their ability to produce biofilm. In addition, genes related to biofilm formation were identified: *prfA*, *agrA*, *agrb*, *agrC*, *agrD*, *flaA*, *cheA*, *CheY*, *sigB* and *actA*. The *L. monocytogenes* isolates with better biofilm production were applied to polyethylene, stainless steel and glass surfaces, in order to test the adhesion capacity of microorganisms on these surfaces, submitted to different times and temperatures. The action of synthetic sanitizers is indexed: peracetic acid (APA 0.2%) and quaternary ammonia compound (CQA 2%), in addition to a coculture of LLH20 on *L. monocytogenes* biofilm on stainless steel, polyethylene and surfaces glass. To verify the morphological changes of *L. monocytogenes* isolates on the surfaces, scanning electron microscopy (SEM) was used. All isolates produced biofilm, of which three were classified as moderate and another seven as strong biofilm producers. All *L. monocytogenes* isolates carried at least one of the genes that participate in biofilm formation. Isolates L21 and L32 adhered to polyethylene, stainless steel and glass surfaces at all temperatures and times evaluated. Among the surfaces, polyethylene proved to be more susceptible to biofilm formation, probably due to its hydrophobicity. The action of synthetic sanitizers APA (0.2%) and CQA (2%) proved to be effective in reducing *L. monocytogenes* biofilm counts for all surfaces, with results of $<2.0 \log \text{CFU.cm}^{-2}$. The co-culture of LLH20 promoted significant reductions in *L. monocytogenes* isolates ranging from 0.75 to $4.5 \log \text{CFU.cm}^{-2}$. Although it was not observed in SEM more complex structures of the L32 isolate under the polyethylene and glass surfaces, it was possible to visualize small clusters of biofilms. An assumption for not forming these structures is related to the sample preparation process itself. On the stainless steel surface, there was the formation of small chains along the granular boundary due to the topography of this surface. It is concluded that the evaluated isolates are biofilm producers and that the action of chemical sanitizers APA (0.2%) and CQA (2%) are effective against biofilm formation.

Meanwhile, the LLH20 coculture showed significant reductions in the formation of *L. monocytogenes* biofilms, and this reduction can be attributed to antagonist compounds produced by the LLH20 isolate, such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocin. Thus, the use of LLH20 can be a potential alternative for the control of biofilms by *L. monocytogenes* in food and equipment.

Key-words: Sanitizers. Co-culture. Microorganism. Lactic acid bacteria

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases da formação do biofilme	22
Figura 4 - Inibição da formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em cocultura com o isolado de LLH20 em superfície de aço inoxidável.....	56
Figura 5 - Inibição da formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em cocultura com o isolado LLH20 em superfície de vidro	57
Figura 6 – Avaliação por MEV da formação do biofilme pelo isolado <i>L. monocytogenes</i> L32 em superfície de aço inoxidável submetidos aos tratamentos de APA 0,3%, CQA 2% e cocultura de LLH20 a 25 °C/24 h.	60
Figura 7 - Avaliação por MEV da formação do biofilme pelo isolado <i>L. monocytogenes</i> L32 em superfície de polietileno submetidos aos tratamentos de APA 0,3%, CQA 2% e cocultura de LLH20 a 42 °C/24 h.	61
Figura 8 - Avaliação por MEV da formação do biofilme pelo isolado <i>L. monocytogenes</i> L32 em superfície de vidro submetidos aos tratamentos de APA 0,3%, CQA 2% e cocultura de LLH20 a 25 °C/120 h	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	33
Tabela 2 - Classificação da produção de biofilme	35
Tabela 3 - Genes alvo, sequências dos oligonucleotídeos utilizados para caracterização molecular dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	36
Tabela 4 - Capacidade de formação de biofilme dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> oriundos de carcaça de frango e abatedouro de frango, no teste de adesão em microplacas de 96 poços	41
Tabela 5 - Identificação de genes envolvidos na formação de biofilme em dez isolados de <i>L. monocytogenes</i> provenientes de carcaça de frango e de abatedouro de frangos.....	43
Tabela 6 - Contagem do isolado <i>L. monocytogenes</i> L21 nas superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro, sob diferentes temperaturas e tempos de incubação	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AIP	Peptídeo autoindutor
ALOA	Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Água peptonada
APA	Ácido peracético
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	Infusão cérebro de carneiro
BHI+TYE	Infusão de cérebro e coração adicionado de extrato de levedura
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CQA	Composto quaternário de amônia
DO	Densidade ótica
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
EPS	Matriz exopolissacarídica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
LLH20	<i>Lactococcus lactis</i> subespécie <i>hordniae</i>
LOG	Logaritmo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MRS	Caldo Man Rogosa Sharpe
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PPHO	Procedimento padrão de higiene operacional
TSA	Ágar trintona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UE	União Europeia
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	20
3.2 BIOFILMES MICROBIANOS NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS	21
3.3 SUPERFÍCIES UTILIZADAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA	23
3.4 ARQUITETURA DO BIOFILMES DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	24
3.5 PROCESSOS DE HIGIENIZAÇÃO.....	26
3.6 COMPOSTOS SINTÉTICOS - SANITIZANTES QUÍMICOS COMERCIAIS	27
3.7 COMPOSTOS BIOATIVOS - BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS – BAL	28
3.8 ASPECTOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM <i>L. MONOCYTOGENES</i>	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	33
4.1.1 Isolados de <i>L. monocytogenes</i>	33
4.1.2 Isolado de <i>Lactococcus lactis</i>	34
4.2 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	34
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	35
4.4 PREPARAÇÃO DOS CUPONS	38
4.5 ADESÃO DOS BIOFILMES DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EM SUPERFÍCIES DE POLIETILENO AÇO INOXIDÁVEL E VIDRO	38
4.6 AÇÃO DOS SANITIZANTES SOBRE BIOFILME PRODUZIDO POR ISOLADOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	39
4.7 EFEITO DO ISOLADO LLH20 SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL, POLIETILENO E VIDRO.....	39
4.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	40
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	41
5.2 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	42
5.3 EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>L.</i> <i>MONOCYTOGENES</i> EM SUPERFÍCIES DE POLIETILENO, AÇO INOXIDÁVEL E VIDRO.....	45
5.4 EFEITO DA REMOÇÃO DE BIOFILME DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> SOB A AÇÃO DE SANITIZANTES	53
5.5 EFEITO ANTIBIOFILME DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> PELO ISOLADO LLH20 EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL, POLIETILENO E VIDRO	54
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	59
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO A – FICHA TÉCNICA ÁCIDO PERACÉTICO	87
ANEXO B – FICHA TÉCNICA QUATERNÁRIO DE AMÔNIO	88

1 INTRODUÇÃO

Com base em dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2020), a produção brasileira de carne de frango foi de 13,24 milhões de toneladas só no ano de 2019. A região sul produziu 64,85% desse montante, sendo que 68% do total da produção brasileira foram absorvidos pelo mercado interno e o restante (32%), destinado para exportação, tornando o Brasil o segundo maior exportador de carne de frango do mundo, com 13.245 mil toneladas, representando 13% do consumo mundial em 2019.

Devido ao risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA), produção de alimentos seguros é uma das maiores preocupações para o desenvolvimento industrial de alimentos e *L. monocytogenes* no mundo, e está entre os principais patógenos envolvidos em no mundo (BUCHANAN *et al.*, 2017; RIPOLLES-AVILA *et al.*, 2020) e no Brasil não tendo relatos pela subnotificação de casos . Esse micro-organismo patogênico pode provocar uma doença chamada listeriose, uma infecção que causa uma alta letalidade em pacientes imunocomprometidos e idosos.

Suas manifestações podem variar de gastroenterite autolimitante, em pacientes sem doenças subjacentes, e bacteremia ou neurolisteriose, naqueles com comorbidades. Já em mulheres grávidas, pode levar ao aborto, natimortos, nascimento de crianças com meningite (ALLERBERGER; WAGNER, 2010; CHARLIER *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2021).

Outra grande preocupação de abatedouros avícolas é a formação de biofilmes microbianos, ocasionados por micro-organismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, que uma vez constituídos, agem constantemente como focos de contaminação, liberando fragmentos ou células planctônicas dos micro-organismos, podendo comprometer a qualidade microbiológica e a segurança dos alimentos (DONLAN; COSTERTON, 2002; WEBBER, 2015).

Os biofilmes são uma populações de células microbianas que se multiplicam sobre uma superfície, com componentes estruturais que incluem substâncias poliméricas extracelulares compostas por DNA extracelular, proteínas e exopolissacarídeos (KHAN *et al.*, 2019). O biofilme formado pelas bactérias permite a sua aderência em superfícies, inclusive em aço inoxidável, equipamentos e utensílios, sobretudo em projetos inadequados, rachaduras, soldas, uma vez que

dificultam a limpeza e favorecem a adesão do micro-organismo (IANNETTI *et al.*, 2020).

Os sanitizantes industriais podem tornar *L. monocytogenes* ainda mais tolerante, permitindo sua permanência no ambiente de processamento em forma de biofilme por meses, causando, assim, contaminação cruzada (SCHÄFER *et al.*, 2017). O efeito da tolerância dos sanitizantes sobre o biofilme pode ser modificado devido às características de superfície, temperatura e tempo de contato, concentração do produto, resíduos superficiais, pH, propriedades físico-químicas da água e principalmente matéria orgânica (BELTRAME *et al.*, 2012).

Os genes que regulam a formação do biofilme e são responsáveis por essas características estão associados à adesão dos isolados, a temperaturas de incubação, a superfícies analisadas, à matéria orgânica, como, por exemplo, os genes de detecção de *quorum sensing* em *L. monocytogenes* (sistema agr) que irão ajudar na formação e manutenção dos biofilmes (BAI; RAI, 2011; JU *et al.*, 2018; TADIELO, 2020).

Desse modo, o controle de biofilme microbiano representa um dos desafios mais persistentes dentro de ambientes industriais onde a contaminação microbiana é um grande problema. Na indústria de alimentos eles podem ser eliminados pela adoção de diferentes estratégias como métodos físicos e químicos durante o processo de higienização e sanitização (KUMAR; ANAND, 1998).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaça de frango e superfícies de equipamentos e utensílios após a higienização pré-operacional em de frangos. Logo, é fundamental entender a dinâmica de formação dos biofilmes em condições industriais e seus mecanismos genéticos porque assim será possível desenvolver estratégias para sua prevenção e controle na indústria alimentícia.

2 OBJETIVOS

Esta pesquisa se constitui dos seguintes objetivos:

a) objetivo geral:

- avaliar a capacidade de formação de biofilmes pelos isolados de *Listeria monocytogenes* e a atividade antibiofilme de compostos sintéticos e do isolado *Lactococcus lactis* subespécie *hordniae* (LLH20).

b) objetivos específicos:

- pesquisar a produção de biofilme pelos isolados de *L. monocytogenes*
- identificar a presença dos genes *prfA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *AgrD*, *flaA*, *cheA*, *cheY*, *sigB*, *actA*, que participam na formação dos biofilmes de *L. monocytogenes*.
- avaliar a capacidade de formação de biofilme por isolados de *L. monocytogenes* em diferentes superfícies (polietileno, aço inoxidável e vidro), temperaturas (3 °C, 9 °C, 25 °C, 36 °C e 42 °C) e tempos (0, 4, 8, 12, 24, 120, 240 horas), utilizando microbiologia convencional;
- avaliar a atividade antibiofilme do ácido peracético e composto quaternário de amônia, no controle de *L. monocytogenes*, produtor de biofilme;
- avaliar a atividade antibiofilme de LLH20 contra biofilme de isolados por *L. monocytogenes*;
- avaliar a arquitetura do biofilme de *L. monocytogenes* provocada pela ação dos sanitizantes sintéticos e o LLH20 em superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Listeria monocytogenes*

O primeiro relatório de identificação da bactéria *L. monocytogenes* foi descrito por Murray Webb; Swann (1926). Os pesquisadores investigavam morte súbita em coelhos, causada por esse micro-organismo, que até então não eram identificados como patógenos em humanos e animais, a não ser em casos raros (IBUSQUIZA, 2011).

Em humanos o primeiro diagnóstico veio a ser notificado em 1929, no final da primeira guerra mundial, em um soldado (BARANCELLI, 2010; GANDRA, 2015). Somente no início da década de 80 o isolamento de *L. monocytogenes* começou a ganhar notoriedade devido ao aumento de casos. O primeiro surto de listeriose humana registrado foi em 1983, diretamente associado à contaminação de uma salada de repolho (GANDRA, 2015; SCHLECH *et al.*, 1983).

O gênero *Listeria*, pertencente à família Listeriaceae é composto por dezessete espécies, classificadas de acordo com suas características bioquímicas e avaliações moleculares. São elas: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae* e *L. newyorkensis* (DEN BAKKER *et al.*, 2014; HALTER; NEUHAUS; SCHERER, 2013; WELLER *et al.*, 2015).

Listeria monocytogenes é uma bactéria bacilar, Gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, móvel e pode se multiplicar em um intervalo de temperatura que varia entre -1,5 a 45 °C. A bactéria apresenta pode se multiplicar em pH que varia entre 4,3 e 9,6, e atividade de água mínima de 0,9 (BAKA *et al.*, 2015).

De acordo com Kljujev *et al.* (2018), sua dose infectante é de aproximadamente 100 células por grama de produto e os principais sintomas que pode causar são: febre, dor muscular e problemas gastrointestinais. Essa bactéria pode causar a listeriose, a qual é transmitida pelo consumo de alimentos contaminados. Apesar de ser uma infecção relativamente rara, quando acomete determinados grupos de risco, como crianças, mulheres grávidas, imunocomprometidos e idosos, apresenta elevadas taxas de letalidade (HUANG *et*

al., 2011).

Segundo dados publicados pela European Food Safety Authority e pelo European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC) (2019), na União Europeia (UE), em 2018, foram confirmados 2549 casos de listeriose humana de origem alimentar, com uma taxa de notificação de 0,47 casos por 100.000 habitantes, causando 229 óbitos. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que entre 1999 e 2018 foram registrados 97 surtos de listeriose, dos quais 1145 pessoas se infectaram, sendo que 861 foram hospitalizadas e 166 foram a óbito (CDC, 2019).

Embora existam muitos estudos e pesquisas no Brasil referentes ao isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos (BARANCELLI *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2013) e a infecções clínicas (ALMEIDA *et al.*, 2017), ainda não há nenhuma ligação confirmada entre ambos. Isso provavelmente acontece devido ao seu longo período de incubação e a subnotificação (TADIELO, 2020).

Uma variedade de matrizes alimentares está relacionada à contaminação por esse micro-organismo, dentre elas: vegetais, leite e derivados, carnes e produtos prontos para consumo, que podem ser contaminados nos momentos de produção, armazenamento, transporte ou pelo consumidor final (CARRASCOSA *et al.*, 2016). Além disso, *L. monocytogenes* tem mais capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas do que outros patógenos não esporulados transmitidos por alimentos, possibilitando assim sua resistência por mais tempo ao congelamento, secagem e salga (TAYLOR; QUINN; KATAOKA, 2019).

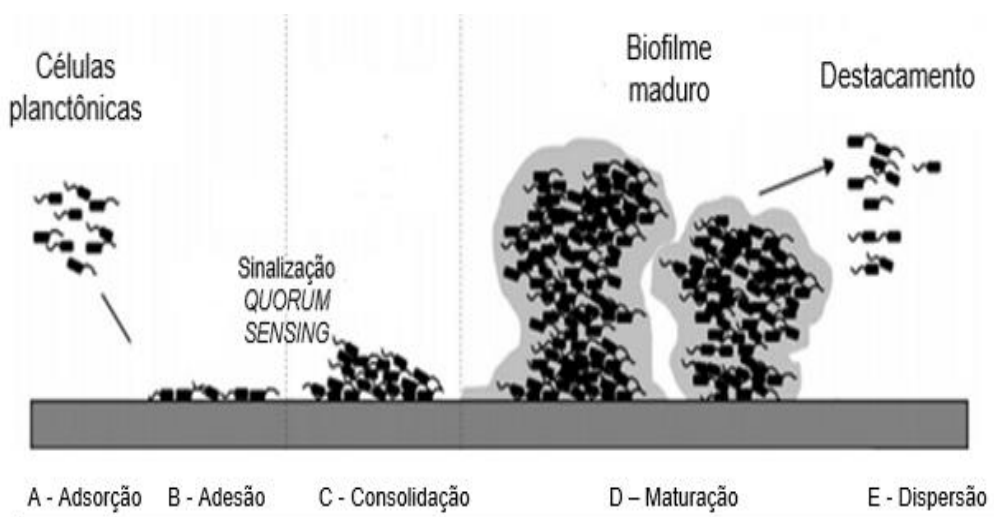
3.2 BIOFILMES MICROBIANOS NAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

Biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007) e aderidas a superfícies vivas (bióticas) ou inertes (abióticas) ou, ainda, como células ligadas umas às outras (IBUSQUIZA, 2011; MICHAEL DUNNE JR., 2002; WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). As bactérias são capazes de formar biofilme em várias superfícies abióticas, como plástico, madeira, vidro e aço inox (MORITA *et al.*, 2011b), porém, outros fatores e propriedades da superfície que afetam a produção

de biofilme ainda não foram totalmente elucidados (SCHLISSELBERG; YARON, 2013).

Os biofilmes estão organizados em camadas únicas ou arquiteturas tridimensionais (STOODLEY *et al.*, 2002). Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem fluxo de líquido e gases, dispersão de nutrientes e descarte de componentes (MCLANDSBOROUGH *et al.*, 2006; STOODLEY *et al.*, 2002). Sua dinâmica de formação é constituída por cinco etapas: adsorção, adesão, consolidação, maturação e dispersão, conforme ilustra a Figura 1 (GUPTA, 2015; MACEDO; ABRAHAM, 2009).

Figura 1 - Fases da formação do biofilme



A) adsorção da matéria orgânica e células bacterianas; B) adesão bacteriana reversível com formação de microcolônias e início do mecanismo de quorum sensing; C) agregados de microcolônias com início da deposição

Fonte: Adaptada de Macedo, Abraham (2009) e Tadielo (2020).

A primeira etapa da formação de biofilme se inicia pela adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas na superfície. Componentes que ajudam na formação da camada condicionante são os substratos proteicos, lipídicos e de carboidratos, oriundos de alimentos. Esses substratos podem ser considerados potenciais fontes de contaminação quando fixados em utensílios e equipamentos (ANDRADE, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017).

Em seguida ocorre a adesão bacteriana em ambientes industriais, podendo ser ainda reversível pela interação inicial fraca da bactéria com o substrato e superfícies. Isso envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e

forças de interações hidrofóbicas. Durante a adesão reversível, bactérias ainda exibem movimentos brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de forças mínimas (BONSAGLIA *et al.*, 2014; TADIELO, 2020; WATNICK; KOLTER, 2000).

Quando as células se aderem à superfície e começam a sinalização para que outras se liguem, ocorre a formação de um aglomerado de microcolônias, acontecendo, assim, a formação de multiespécies e monoespécies de biofilmes, denominado de *quorum sensing* (QS) (Figura 1, item B) (GANDRA *et al.*, 2019; MERINO *et al.*, 2019; RIEU *et al.*, 2007), que está presente em todas as etapas da formação de biofilmes, realizando a comunicação celular, estimulado por meio de moléculas autoindutoras, originando a noção da quantidade populacional e formação gênica (JU *et al.*, 2018; RIEU *et al.*, 2007).

A formação do biofilme maduro, apresentado na Figura 1 item D, ocorre entre 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias (HEYDORN *et al.*, 2000). A maturidade acontece, principalmente, por meio do aumento da quantidade populacional e também pelo desenvolvimento da produção e deposição de polímeros extracelulares, aumentando a espessura do biofilme (CHENG *et al.*, 2007).

A etapa final da formação acontece pela dispersão das células bacterianas ou fragmentos da matriz exopolissacarídica (EPS) e substâncias poliméricas, (conforme Figura 1, item E). O desenvolvimento de um ambiente anaeróbio no interior do biofilme quase sempre proporciona a produção de ácidos e gases e enfraquece o tamanho do biofilme fazendo com que ocorra o seu destacamento da matriz EPS. Isso também pode ser gerado pela ação mecânica de alimentos sobre a superfície, causando a contaminação cruzada (OLIVEIRA *et al.*, 2010; TADIELO, 2020).

3.3 SUPERFÍCIES UTILIZADAS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Ambientes industriais de processamento de alimentos apresentam uma variedade de micro-organismos que são capazes de aderir, sobreviver e formar biofilme em diversas superfícies, dificultando sua remoção quando aplicados programas rotineiros de higienização nas indústrias (GIAOURIS *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ-LÓPEZ; CABO, 2017). *Listeria monocytogenes* é um desses micro-organismos produtores de biofilme e sua resistência está relacionada a vários

fatores, como sorotipo, tempo de incubação e temperatura (LI *et al.*, 2018; NOWAK *et al.*, 2015). Além disso, essa bactéria possui uma habilidade de se fixar em vários tipos de materiais.

Portanto, a escolha da superfície utilizada na indústria alimentícia que tenha maior facilidade na higienização pode ser uma preocupação secundária. Cada tipo de superfície vai determinar a quantidade de fixação e resistência desse biofilme (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001; CHMIELEWSKI; FRANK, 2006; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; SINDE; CARBALLO, 2000), o que se torna um grave problema já que sua presença pode abrigar e transmitir bactérias deteriorantes e bactérias patogênicas (BRIDIER *et al.*, 2015; FAGERLUND; LANGSRUD; MORETRO, 2020).

Superfícies como aço inoxidável, poliestireno e vidro são possíveis de colonização bacteriana e formação de biofilme (DANTAS, 2014; VIVIAN, 2014). As propriedades físico-químicas do material também podem influenciar a aderência do biofilme nas superfícies, entre elas a carga, intensidade do líquido (biofilmes de fluxo elástico/ dinâmico), rugosidade, hidrofobicidade (superfície não polar, como plásticos) e de hidrofiliabilidade (vidros e metais) (DONLAN; COSTERTON, 2002; PILCHOVÁ *et al.*, 2014).

3.4 ARQUITETURA DO BIOFILMES DE *L. monocytogenes*

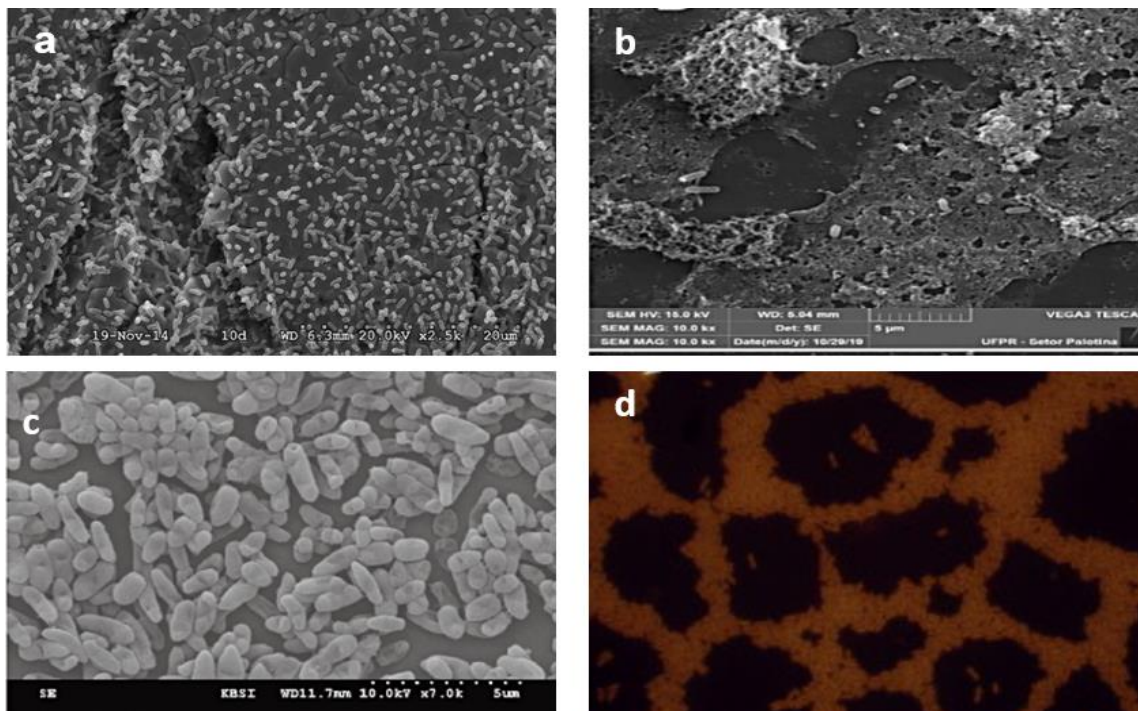
A arquitetura do biofilme, como espessura, densidade, arranjo espacial e resistência são importantes para definir as propriedades dos biofilmes formados pelos diversos micro-organismos (CHARLIER *et al.*, 2017; MOSQUERA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Essa arquitetura pode variar de acordo com diversas condições em que ele se desenvolveu, entre elas, disponibilidade de nutrientes, temperaturas, mobilidade bacteriana, comunicação celular, além da quantidade de matriz EPS produzida, sendo que a presença de poros e canais irão ajudar na distribuição de nutrientes e na degradação da estrutura de aspecto viscoso, contribuindo para o desenvolvimento do biofilme, formando estrutura tridimensional que promove a ramificação sobre as superfícies (PILCHOVÁ *ET AL.*, 2014; REIS-TEIXEIRA; ALVES; DE MARTINIS, 2017).

Uma distribuição homogênea de micro-organismos pela superfície pode ser denominada de “tapete celular”, um padrão plano em monocamada, estruturas com

canais, podendo ter ocorrido pela eliminação de metabólitos e obtenção de nutrientes, ou até mesmo de estruturas tridimensionais em padrão de “favo de mel”, dependendo das condições e parâmetros que forem avaliados (BRAUGE *et al.*, 2015, 2018; GAO *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2017).

Doijad *et al.* (2015) e Pilchová *et al.* (2014), classificam as arquiteturas de biofilme de *L. monocytogenes* em quatro principais, conforme mostrado na Figura 2, descritas como: estruturas em forma de “tapete celular”; “favo de mel”; e tridimensional densa e “bola”.

Figura 2 - Arquiteturas dos principais biofilmes de *L. monocytogenes*



a) “tapete celular”; b) “favo de mel”; c) tridimensional densa através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV); e d) “bola” por Microscopia de fluorescência (MF).

Fonte: Adaptada de Brauge *et al.* (2018), Tadielo (2020), Pilchová *et al.* (2014)

No entanto, para estudar a arquitetura dos biofilmes microbianos, métodos microscópicos, como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e inclusão de choro seguida de corte e exame microscópico, oferecem imagens mais consistentes das estruturas. (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014)

3.5 PROCESSOS DE HIGIENIZAÇÃO

Na indústria de alimentos, a higienização desempenha um importante papel para prevenção da formação de biofilmes. A introdução de programas de autocontroles, também conhecidos por Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), pela indústria, garante a eliminação dos biofilmes, especialmente, pela remoção do acúmulo dos resíduos oriundos do processamento, evitando que células microbianas e formadoras de biofilmes possam ser fixadas em superfícies e nos equipamentos (BRIDIER *et al.*, 2015; ZIECH, 2015).

Ao término das fases de processamento dos alimentos, a limpeza e higienização da planta industrial devem ser seguidas corretamente, divididas pelas seguintes etapas: I) remoção de resíduos oriundos do processamento; II) pré-enxague com água quente (45 °C); III) aplicação de detergente; IV) enxágue com água; V) sanitização com agentes químicos e VI) enxágue com água. Esse processo é realizado entre 12 horas e 24 horas no final do turno de abate, denominada higiene pré-operacional. Em intervalos de 4 e 8 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização durante intervalos na produção, que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxague (CONTRERAS *et al.*, 2002).

O objetivo da limpeza é retirar as sujidades que estão depositadas nas superfícies, impedindo que elas voltem a se aderir, por meio da dissolução no solvente. A limpeza deve ser realizada com soluções de detergentes com as características específicas para o material da superfície em que serão aplicados (LOPES, 2018).

Depois da limpeza realizada adequadamente ocorrerá a quebra da matriz (EPS) para que os desinfetantes tenham acesso às células bacterianas (SIMÕES *et al.*, 2006; SREY; JAHID; HA, 2013). Assim, o processo de limpeza remove cerca de 90% das células presentes nos equipamentos e as que não foram eliminadas depois da higienização podem continuar nas superfícies contribuindo para a formação de biofilmes (GRAM *et al.*, 2007; SREY; JAHID; HA, 2013).

A limpeza e a sanitização são etapas essenciais na prevenção de contaminação bacteriana (GRAM *et al.*, 2007). Nesse processo, muitos agentes sanitizantes são usados na indústria de alimentos, dentre eles, compostos

quaternários de amônia (CQA), cloro, iodóforos e ácidos (AARNISALO *et al.*, 2000, 2007).

3.6 COMPOSTOS SINTÉTICOS - SANITIZANTES QUÍMICOS COMERCIAIS

A sanitização é descrita como um procedimento indispensável para eliminar a formação de micro-organismos e biofilmes, sendo de grande importância que seja capaz de reduzir a quantidade de células livres e de evitar sua adesão nas superfícies (MILLEZI *et al.*, 2012).

A portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece os critérios de aplicação dos sanitizantes com ação antimicrobiana, sendo classificados desinfetantes os que possuem na sua composição substâncias microbianas que apresentem efeito letal para micro-organismos não esporulados.

O quaternário de amônio (CQA) é amplamente utilizado como antisséptico e desinfetante devido à sua ação surfactante, à sua baixa toxicidade e por possuir atividade antimicrobiana (MCDONNELL; RUSSELL, 1999; OBLĄK *et al.*, 2019). Esses compostos (CQA) também são catiônicos sintéticos, inodoros, incolores, não corrosivos (ANDRADE, 2008), não tóxicos e são frequentemente empregados na indústria de alimentos como parte do protocolo de limpeza (MCLANDSBOROUGH *et al.*, 2006).

Compostos quaternários de amônia (CQA) possuem maior ação de remoção contra micro-organismos Gram-positivos do que em Gram-negativos. Não são esporicidas e mais eficazes em eliminar vírus, sendo mais efetivos a altas temperaturas. Em bactérias lácticas são eficazes na eliminação, e melhores em pH alcalino (MASSAGUER, 2005). E muito pouco eficazes contra coliformes e psicotróficos (ANDRADE, 2008).

Os CQA são frequentemente empregados para sanitização de pisos, paredes e para o controle microbiológico do ar dos ambientes de produção (ANDRADE, 2008). Seu poder bactericida está ligado a vários mecanismos de ação, como inibição enzimática, de maturação proteica e lesão da membrana citoplasmática, com dispersão dos constituintes celulares (MASSAGUER, 2005).

O ácido peracético (APA) ($C_2H_4O_3$) é oriundo da reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido acético (CH_3COOH), ou por oxidação do acetaldeído. O APA é mais eficaz que o peróxido de hidrogênio, pois consegue atingir maiores níveis de remoção de micro-organismos e sua eficácia não é afetada por resíduos de proteína (SREY; JAHID; HA, 2013). Tem como meio de ação a oxidação de grupos sulfidrilas das enzimas, pela intervenção em ações metabólicas e com papel quimiosmótico da membrana citoplasmática (ANDRADE, 2018).

O APA é um sanitizante que possui algumas vantagens por permanecer ativo mesmo na presença de matéria orgânica e apresentar como produto de decomposição substâncias não tóxicas (ácido acético e oxigênio) e não mutagênicas. Além disso, possui baixa dependência de pH e pouco tempo de contato para promover uma efetiva desinfecção (SILVA; PARADELLA; NAVAS, 2008). Causa pouco impacto ambiental e pode ser eficaz contra biofilmes e também considerado um sanitizante esporicida, bactericida, sendo excelente contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos, vírus e esporos bacterianos (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

3.7 COMPOSTOS BIOATIVOS - BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS – BAL

A prevenção e o controle na formação de biofilmes microbianos nas indústrias de alimentos tornaram-se uma prioridade e a busca por tecnologias alternativas, como o uso de controles bioativos, (PÉREZ IBARRECHE; CASTELLANO; VIGNOLO, 2014). As BAL e seus metabólitos podem controlar a multiplicação e formação de biofilmes por *L. monocytogenes* (WINKELSTRÖTER; TULINI; DE MARTINIS, 2015). Essas bactérias pertencem a um amplo grupo de micro-organismos Gram-positivos, com morfologia de bacilos e cocos, imóveis, não esporulados, anaeróbicos, catalase negativa e produtores de ácido láctico, como principal ou único produto da fermentação (KHALID, 2011).

As BAL estão distribuídas na natureza (HWANHLEM *et al.*, 2013), e algumas pertencem à microbiota intestinal de humanos (MORITA *et al.*, 2011a) e de animais, como peixes (KAKTCHAM *et al.*, 2019; PÉREZ *et al.*, 2011) e aves (VOLOKHOV *et al.*, 2012). Estão presentes também em alimentos como leite (ESPECHE *et al.*, 2012; YERLIKAYA, 2019), carnes (HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA *et al.*, 2018), frutas e

vegetais (CAI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014, 2013; COSTA; VANETTI; PUSCHMANN, 2009; RANDAZZO *et al.*, 2009; TODOROV *et al.*, 2011; TRIAS *et al.*, 2008).

A maioria das BAL é relatada como micro-organismo seguro para ser utilizado em alimentos (GRAS – *Generally Recognized As Safe*), de acordo com *Food and Drug Administration* (FDA) (GASPAR *et al.*, 2013). Possuem uma importante característica, que é a capacidade de produzir compostos tais como bacteriocinas, enzimas, ácidos orgânicos, etanol, butanol, exopolissacarídeos e diacetil (DA COSTA *et al.*, 2019; LEROY; DE VUYST, 2004). Bacteriocinas são classificadas como peptídeos com atividade antimicrobiana contra várias bactérias não patogênicas e algumas patogênicas.

Além disso, as BAL têm grande utilidade na biotecnologia industrial, por apresentarem outras atividades biológicas (DABA; ELKHATEEB, 2020), características transformadoras, probióticas e bioconservadoras, sendo utilizadas como culturas iniciadoras (*starters*) (COTTER; HILL; ROSS, 2005; LEROY; DE VUYST, 2004; LOPES, 2018).

A utilização de isolados de BAL produtores de bacteriocinas se baseia em uma ação de exclusão competitiva, em que micro-organismos que têm atividade antagônica em relação a micro-organismos patogênicos podem controlar ou inativá-los, dependendo da competição por nutrientes e locais de fixação, bem como da produção de compostos (HOSSAIN *et al.*, 2020; Ukuku *et al.*, 2015).

Habimana *et al.*, (2011) observaram que a multiplicação de *L. monocytogenes* foi prejudicada pela presença de *Lactococcus lactis*. Essa competição de espaço por nutrientes poderia, portanto, ser uma justificativa pelo baixo ou nenhuma multiplicação de células de *L. monocytogenes* localizadas nas camadas inferiores de biofilmes de espécies mistas (HABIMANA *et al.*, 2011).

3.8 ASPECTOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes pode apresentar genes responsáveis por expressar fatores de virulência, assim como as estruturas antigênicas através de antígenos somáticos (O) e flagelares (H), que as distinguem em treze sorotipos : (1/2a, 1/2b,

1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) e sorogrupos: IIa (1/2a-3a), IIb (1b-3b-7), IIc (1/2-3c), IVa (4a-4c) e IVb (4ab-4b, 4d-4e) (DOUMITH *et al.*, 2004; LIU, 2006; WIECZOREK; OSEK, 2017).

Desses, quatro sorotipos (1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c e 4b) são normalmente isolados de aproximadamente 95% dos casos de listeriose humana são causados pela ingestão de diversos tipos de alimentos contaminados por esse micro-organismo, gerando, assim, muitos surtos (DOUMITH *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2007; WIECZOREK; OSEK, 2017).

O *prfA* (fator positivo de regulação A) é um dos genes que estão envolvidos na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Trata-se de um ativador transcricional chave que vai regular a maior parte da expressão dos genes de virulência já conhecidos (LIU *et al.*, 2013), entre eles estão *inlA*, *inlB*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* (SHEEHAN *et al.*, 1995).

Evidências revelam que o gene *prfA* também possui potenciais efeitos que podem ajudar na homeostase de *L. monocytogenes*, além de regular a expressão de genes envolvidos no transporte, enzimas metabólicas, reguladores e proteínas de função desconhecida (MILOHANIC *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2011), como a biossíntese da parede celular, no metabolismo, divisão celular e nas adaptações em diversas condições dos biofilmes microbianos (LUO *et al.*, 2013).

Diferentes níveis de adesão das células de *L. monocytogenes* (não aderente e fortemente aderente) foram encontrados por Gandra *et al.* (2019) em diferentes superfícies (poliestireno e aço inoxidável), que não mostraram interferência dos níveis de expressão gênica de *prfA*, porém, quando expostas a diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C e 37 °C), e tempos de incubação (8 h, 12 h, 24 h e 48 h), sendo que a maior expressão de *prfA* foi observada a 37 °C a partir de 24 h quando comparada 10 °C nos demais tempos de avaliação.

Por outro lado, Pieta *et al.* (2014) relataram maiores níveis de expressão para *prfA* a 7 °C quando comparados a 37 °C. Desse modo, a avaliação da expressão de *prfA*, o qual participa da regulação de genes de virulência e de formação de biofilme, tem sido bastante estudada, de forma a entender sua seu mecanismo de regulação e com o objetivo de controlar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* nas indústrias de alimentos (LI *et al.*, 2018; TADIELO, 2020; VAZQUEZ-ARMENTA *et al.*, 2020).

Outro grupo importante é o *locus agr* que se apresenta altamente conservado, envolvido na formação do biofilme que possui ortólogos em várias bactérias Gram-positivas (AUTRET *et al.*, 2003; GARMYN *et al.*, 2012; PASPALIARI *et al.*, 2014). O *locus agr* possui quatro genes co-transcritos em um *operon* (*agrBCDA*) que codificam quatro proteínas, sendo considerado um sistema regulador acessório para *L. monocytogenes*.

O gene *agrB* é responsável pela expressão de uma proteína de membrana, tendo como função transferir o peptídeo de *agrD*. Já o *agrD* é um peptídeo alterado e autoindutor maduro (AIP). O *agrA* (autorregulador) e o *agrC* (histidina quinase) formam um sinal de transdução que constituem dois componentes de um sistema.

Quando a concentração extracelular do AIP atinge certo limiar, em *quorum sensing*, o sistema é ativado através da detecção de *agrC-agrA* e exerce efeitos reguladores sobre substratos alvo, bem como induz a sua própria produção (autorregulação positiva) (AUTRET *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2012; RIEDEL *et al.*, 2009; RIEU *et al.*, 2007).

O *agrA* está relacionado à invasão e adesão celular e à autoindução do sistema de QS, mas também afeta as fases que iniciam da formação de biofilme (RIEDEL *et al.*, 2009; RIEU *et al.*, 2007). RIEU *et al.*, (2007) observaram uma queda de, aproximadamente, 62% no número de células aderidas nas superfícies de vidro com *agrA*- e *agrD*- mutantes em comparação com suas cepas parentais. Esses mutantes também tiveram uma redução de 33% na quantidade de biofilme sobre poliestireno durante horas iniciais.

O gene *agrB* ajuda a síntese de proteínas de membrana importantes para expressão do *agrD*. A formação de biofilme foi reduzida pela falta de nutrientes e o aumento da osmolaridade. Porém, observaram-se graus de expressões de *agrD*, o que sugere que o *agrD* está participando na formação de biofilme em condições parecidas com as encontradas na indústria de alimentos. Assim, o sistema *agr* é essencial para a regulação adequada da biossíntese, estrutura e função do envelope celular, adesão a diferentes superfícies, e interação de bactérias dentro do biofilme (ZETZMANN *et al.*, 2019).

Quantidades significativamente superior do gene *agrB* em células de *L. monocytogenes* aderidas em superfície de vidro foram descritas por Mata *et al.* (2015), quando comparadas com as células planctônicas das mesmas cepas. A

temperatura também teve influência na sua expressão, que se mostrou em quantidades nas células aderidas a 25 °C. Porém, os autores notaram níveis consideráveis do gene *agrD* nas mesmas condições de temperatura e superfícies avaliadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Biologia Molecular do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade Estadual de Santa Catarina de Pinhalzinho-SC, Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas – UFPel e no Laboratório Multiusuário da UDESC/Joinville.

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

4.1.1 Isolados de *L. monocytogenes*

Foram utilizados 10 isolados de *L. monocytogenes*, cinco provenientes de carcaça de frango e cinco de abatedouro de frangos. Todos pertencentes ao laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas – UFPel. Conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação dos isolados de *L. monocytogenes*

Micro-organismo	Identificação	Fonte	Sorotipo
<i>L. monocytogenes</i>	L 18	Carcaça de frango	4b
	L 19	Carcaça de frango	4b
	L 20	Carcaça de frango	1/2c
	L 21	Carcaça de frango	1/2c
	L 22	Carcaça de frango	4b
	L 31	Abatedouro de frango	4b
	L 32	Abatedouro de frango	4b
	L 33	Abatedouro de frango	4b
	L 34	Abatedouro de frango	1/2b
	L 35	Abatedouro de frango	1/2b

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Os isolados de *L. monocytogenes* e LLH20 foram mantidos em caldo Triptona de soja (TSB, Difco®) com 20% de glicerol a -80 °C. Para a recuperação dos isolados de *L. monocytogenes* uma alçada (10 µL) das culturas foram inoculadas em 10 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI HiMedia®) e incubadas a 37 °C por 24 h de incubação.

4.1.2 Isolado de *Lactococcus lactis*

Utilizou-se *L. lactis* subespécie *hordniae* (LLH20), obtido de alface tipo Crespa (*Lactuca sativa*) após processo de sanitização com hipoclorito de sódio 200 ppm. O LLH20 foi isolado e identificado pelo sequenciamento rDNA 16S por Souza (2018).

O isolado LLH20 foi recuperado em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS/Sigma-Aldrich®), e incubado a 36 °C por 24 h. Repetiu-se esse procedimento e, após a incubação, as culturas foram centrifugadas 5.000 x *g* por 10 min (Solab SL 703) a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em água peptonada 0,1% (Oxoid®) esterilizada, foi repicado para tubos com ágar Triptona de Soja (TSA/Merck®), incubado a 36 °C por 24 h e mantido a 4 °C, em refrigerador.

4.2 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

A capacidade dos isolados de *L. monocytogenes* em produzir biofilme foi avaliada pelo método descrito por Djordjevic; Wiedmann; Mcclandsborough (2002), com modificações. Os isolados foram cultivados em caldo BHI + YE (HiMedia®) a 37 °C por 18 h e as concentrações ajustadas para 10⁸ UFC.mL⁻¹ com auxílio da escala de McFarland 0,5. Em placa de microtitulação foram adicionados em cada poço 180 µL de caldo TSB suplementado com 1% de glicose e 20 µL do isolado na concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹.

Como controle negativo, foram utilizados 200 µL de caldo TSB suplementado com 1% de glicose, o qual foi incubado a 37 °C por 24 horas. O meio de cultura foi removido da microplaca, os poços foram lavados por três vezes com água destilada esterilizada e a microplaca incubada a 55-60 °C por 35 min. Foram adicionados 200 µL de cristal violeta (1%) nos poços e após 45 min em temperatura ambiente, lavaram-se os poços com água destilada esterilizada, e adicionou-se 200 µL de etanol 95% (v/v). Após 20 min, realizou-se a medida da densidade óptica D.O. (λ = 630 nm) da suspensão em leitora de microplaca (Kasuaki modelo DR-200BS). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram classificados de acordo com a densidade óptica (Tabela 2) descrito por Stepanović *et al.* (2000).

Tabela 2 - Classificação da produção de biofilme

$DOc \leq DOc_p$ = não produtor
$DOcp < DOc \leq (2 \times DOc_p)$ = fraco produtor
$(2 \times DOcp) < DOc \leq (4 \times DOc_p)$ = moderado produtor
$(4 \times DOcp) \leq DOc$ = forte produtor

| DOc: D.O do controle negativo. |
| DOcp: D.O do isolado. |

Fonte: Adaptada de Stepanović *et al.* (2000)

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *L. monocytogenes*

O DNA genômico dos 10 isolados de *L. monocytogenes*, bem como das cepas controle, foi extraído utilizando o kit Wizard[®]SV Genomic DNA Purification System (Promega). A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose (Kasvi), 1% utilizando GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1 e visualizada sob luz UV em transiluminador pelo programa LPIxImage (LOCCUS Biotecnologia, BRL[®]).

Para a identificação de genes relacionados a formação dos biofilmes dos isolados de *L. monocytogenes* foram utilizados os oligonucleotídeos *prfA*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *flaA*, *cheA*, *cheY*, *sigB*, *actA* (Tabela 3), conforme descritos por Autret *et al.* (2003), Fan *et al.* (2020), Huang *et al.* (2018), Lomonaco *et al.* (2012), Pieta *et al.* (2014) e Rieu *et al.* (2007). Todos os *primers* foram avaliados quanto à especificidade utilizando-se o Blast – like Alignment Tool (Blast), através do soft a e “Basic Alignment Search Tool” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume de 25 µL utilizando-se 12,5 µL de Go taq[®] Green Master Mix (Promega[®]), 10 pmol de cada *primer* e 10 ng (2 µL) de DNA molde. Após completadas as reações, os produtos gerados foram submetidos à eletroforese a 80 V por 70 minutos em gel de agarose 1,5% (Ludwig). O produto amplificado foi corado com GelRedTM e visualizado em transiluminador (Loccus[®]).

Tabela 3 - Genes alvo, sequências dos oligonucleotídeos utilizados para caracterização molecular dos isolados de *L.**monocytogenes*

(Continua)

Genes alvo	Oligonucleotídeos	Tamanho do produto (bp)	Temperatura de anelamento	Função	Referência
<i>prfA</i>	F:GGAAGCTTGGCTCTATTTGC R: ACAGCTGAGCTATGTGCGAT	145	60°C	Influência na formação de biofilme	Lomonaco <i>et al.</i> (2012)
<i>agrA</i>	F: CGGGTACTTGCCTGTATGAA R:TGAATAGTTGGCGCTGTCTC	149	60°C	Quorum sensing e formação de biofilme	Pieta <i>et al.</i> (2014)
<i>agrB</i>	F:AGGTACATTTGGATTTATACTGCTCAAC R: TCTTCACCGATTAAAGGCAAAC	81	60°C	Quorum sensing e formação de biofilme	Autret <i>et al.</i> (2003)
<i>agrC</i>	F:ATTGACAAGATTTTCGATGGATAGTATAGATT R: CACAAGTTAACGCCGCTTCA	88	60°C	Quorum sensing e formação de biofilme	Autret <i>et al.</i> (2003)
<i>agrD</i>	F: AAATCAGTTGGTAAATTCCTTTCTA R: AATGGACTTTTTGGTTCGTATACA	113	60°C	Quorum sensing e formação de biofilme	Rieuet <i>et al.</i> (2007)
<i>flaA</i>	F: GTGCTGGTATGAGTCGCCTT R: TCGGACATTTTCAGCAGCCAT	115	60°C	Formação de flagelos e formação de biofilme	Fan <i>et al.</i> (2020)
<i>cheA</i>	F: AGCGGACATTCAACACGTTC R: ATCGCCTAAAATCGTTGCC	144	60°C	Quimiotaxia	Fan <i>et al.</i> (2020)
<i>cheY</i>	F:CGATGCGATGTTTCATGCGTA R:TTGCCGATGGATCTTTTGCC	203	60°C	Quimiotaxia	Fan <i>et al.</i> (2020)
<i>sigB</i>	F: GATGATGGATTTGAACGTGTGAA R: CGCTCATCTAAAACAGGGAGAAC	191	60°C	Regulador global	HUANG <i>et al.</i> (2018)

Tabela 3 - Genes alvo, sequências dos oligonucleotídeos utilizados para caracterização molecular dos isolados de *L.**monocytogenes*

(Conclusão)

Genes alvo	Oligonucleotídeos	Tamanho do produto (bp)	Temperatura de anelamento	Função	Referência
actA	F: CCAAGCGAGGTAAATACGGGA R: GTCCGAAGCATTTACCTCTTC	724-619	60°C	Indutor da polimerização da actina	Lomonaco <i>et al.</i> (2012)

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

4.4 PREPARAÇÃO DOS CUPONS

Foram utilizados cupons de polietileno, aço inoxidável AISI 304 e vidro com 1 cm² conforme descrito por Webber (2015), previamente higienizados e esterilizados em autoclave. Para higienização, ficaram imersos em ácido peracético (AP) na concentração de 0,3% e temperatura de 50 °C por 30 minutos sob agitação de 50 rpm. Logo após, os cupons foram imersos em água destilada esterilizada a 80 °C por 15 min, e por fim autoclavados a 120 °C por 20 min (MILLEZI et al., 2012).

4.5 ADESÃO DOS BIOFILMES DE *L. monocytogenes* EM SUPERFÍCIES DE POLIETILENO AÇO INOXIDÁVEL E VIDRO

Para avaliação da adesão dos biofilmes de *L. monocytogenes*, os cupons foram adicionados em 20 mL de caldo BHI (HiMedia®) contendo 10⁸ UFC. mL⁻¹ do isolado de *L. monocytogenes* a ser testado. Foram incubados 20 mL de caldo BHI (HiMedia®) a 3 °C, 9 °C, 25 °C, 36 °C e 42 °C, simulando as temperaturas do ambiente de processamento, por 0, 4, 8, 12, 24 horas, 5 dias e 10 dias (KUSUMANINGRUM et al., 2003; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Na sequência, os cupons foram retirados nos tempos e temperaturas determinados e imersos em 5 mL de água peptonada 0,1 % (HiMedia®) por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Depois os cupons foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de água peptonada 0,1 %, e sonificados por 10 minutos em banho de ultrassom Quimis® (frequência de 40 kHz e potência de 81 W) para remover as células sésseis (SCHERBA; WEIGEL; O'BRIEN, 1991). Após sonificados, foram realizadas diluições decimais seriadas para 9 mL de água peptonada 0,1 % (AP, HiMedia®) 0,1 mL da cultura em placas de Tryptic Soy agar (TSA Difco®). Após 24 h de incubação a 37 °C, as colônias obtidas foram contadas e o resultado da diluição foi expresso em log, utilizando o cálculo descrito na equação (1) seguinte (TORTORA et al.; MIYANO; OIE; KAMIYA, 2003):

(1)

$$\text{LOG UFC.cm}^{-2} = \frac{\text{UFC/mL da suspensão} \times \text{contagem de } L. \text{ monocytogenes em placas}}{\text{Área}}$$

4.6 AÇÃO DOS SANITIZANTES SOBRE BIOFILME PRODUZIDO POR ISOLADOS DE *L. monocytogenes*

Os cupons preparados com as células aderentes, conforme descrito no item 4.4, foram imersos em soluções aquosas contendo os desinfetantes por 10 minutos em temperatura ambiente ou em água destilada para controle. Foram utilizados os desinfetantes: ácido peracético a 0,3% (v/v) (Ecooper) e o quaternário de amônia a 2% (v/v) (Divosan), ambos nas concentrações máximas recomendadas pelos fabricantes. A quantificação das células (sésseis) foi realizada de acordo com o descrito no item 4.4. Foram realizadas diluições decimais seriadas da cultura e semeadura em TSA. Após 24h de incubação a 37 °C, as colônias foram contadas e o resultado da diluição foi expresso em log.cm⁻².

4.7 EFEITO DO ISOLADO LLH20 SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *L. monocytogenes* EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL, POLIETILENO E VIDRO

A preparação do isolado LLH20 foi realizada conforme descrito no item 4.1 e os cupons foram preparados conforme o item 4.4. Cada cupom (aço inoxidável, polietileno e vidro) foi completamente imerso em 10 mL em tubos Falcon contendo TSB e depois adicionado 1 mL na concentração 10^8 UFC.mL⁻¹ do isolado de LLH20 e de 1 mL na concentração 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada isolado de *L. monocytogenes*. Uma amostra contendo apenas *L. monocytogenes* foi considerada o controle. Todas as amostras foram incubadas nos melhores tempos e temperaturas selecionados para formação de biofilme, descritas no item 4.5.

Após a incubação, cada cupom foi removido do tubo Falcon e lavado duas vezes com água destilada esterilizada para remover células planctônicas. Após, cada cupom foi transferido para placas de Petri (55 × 12 mm) contendo 2 mL de água peptonada (0,1 %) e, posteriormente, transferidos para um tubo de ensaio e agitados em agitador de tubo tipo vórtice por 2 min para dispersar o biofilme. A contagem de células do biofilme foi realizada em ágar Ágar Listeria Aloa (Laborclin®), incubado a 30 °C por 48 h (HOSSAIN *et al.*, 2020).

4.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As alterações morfológicas dos isolados de *L. monocytogenes* nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e vidro foram avaliadas por MEV. Essas superfícies foram avaliadas nos tempos e temperaturas determinados conforme item 4.4 Os cupons analisados foram tratados com ácido peracético (APA 0,3%), composto quaternário de amônia (CQA 2%), isolado LLH20 (10^8 UFC.mL⁻¹) e, como controle, utilizaram-se cupons sem os tratamentos, somente com os isolados de *L. monocytogenes*. Na sequência, as superfícies foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato PBS, e desidratadas com concentrações de 30, 50, 70, 80, 90 e 100% de etanol e secas em liofilizador (Ilshin Lab. Co. Ltd., TFD5503, Coréia) por 24 h (NING *et al.*, 2017). As amostras foram encaminhadas para o laboratório multiusuário da UDESC/Joinville e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610LV, JEOL).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P < 0,05$), usando a versão do programa Statistica 13.3 (Statsoft, inc 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE *L. monocytogenes*

Os 10 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de carcaça de frango e de abatedouro de frango foram capazes de produzir biofilme. Na Tabela 4 pode-se observar a classificação dos isolados de *L. monocytogenes* quanto à capacidade de produção de biofilme a 37 °C. Dos 10 isolados, 30% (3) foram considerados produtores moderados de biofilme, enquanto 70% (7) foram considerados forte produtores de biofilme. Nenhum isolado foi classificado como fraco produtor de biofilme (<0,054).

Tabela 4 - Capacidade de formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes* oriundos de carcaça de frango e abatedouro de frango, no teste de adesão em microplacas de 96 poços

Isolados de carcaça	D.O	Classificação ¹
L18	0,110 ± 0,01 ^b	Moderado produtor de biofilme
L19	0,124 ± 0,02 ^b	Moderado produtor de biofilme
L20	0,213 ± <0,01 ^a	Forte produtor de biofilme
L21	0,238 ± 0,01 ^a	Forte produtor de biofilme
L22	0,212 ± 0,01 ^a	Forte produtor de biofilme
Isolados de abatedouro	D.O	Classificação ¹
L31	0,274 ± 0,02 ^a	Forte produtor de biofilme
L32	0,321±0,05 ^a	Forte produtor de biofilme
L33	0,318± 0,01 ^a	Forte produtor de biofilme
L34	0,238±0,04 ^a	Forte produtor de biofilme
L35	0,120 ± 0,01 ^b	Moderado produtor de biofilme

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

¹Classificação de acordo com (STEPANOVIĆ et al., 2000), pela comparação de cada densidade ótica (D.O) com média de controles negativos conforme Tabela 1.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Liu *et al.* (2020) avaliaram 31 isolados de *L. monocytogenes* oriundos de frigorífico matadouro de carne bovina, dos quais 64,2% foram classificados como fortes produtores de biofilmes. Já Carandina (2013) avaliou 37 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de vários ambientes de laticínios, além de amostras provenientes de salmoura e queijos, e verificaram que 6 isolados (16,2%) foram capazes de produzir biofilme, sendo classificados como fracos produtores. Bonsaglia

et al. (2014) avaliaram 32 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de diferentes alimentos (leite e vegetais) e de ambientes de processamento de alimentos, e encontram dois (6,2%) isolados como fortes produtores de biofilme.

A diferença observada entre os resultados deste estudo e os dos autores citados acima pode ser explicada pelo fato da produção de biofilmes ser uma característica que vai depender da origem do isolado, Bonsaglia *et al.* (2014), Carandina, (2013), Liu *et al.* (2020). Além disso, de acordo com Doijad *et al.* (2015), condições de multiplicação dos isolados pode influenciar a quantidade de produção do biofilme.

Na Tabela 4 é possível observar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *L. monocytogenes*, bem como a classificação quanto ao nível de produção. Com intuito de obter um isolado com maior formação de biofilme, realizou-se uma análise estatística para cada grupo de origem, separadamente. Com isso, os isolados L20, L21 e L22, provenientes de carcaça de frango, foram considerados como fortes produtores de biofilme, apresentando valores (D.O) de 0,213, 0,238 e 0,212, respectivamente, não sendo diferentes estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Já quando os isolados oriundos de abatedouro de frango foram analisados, constatou-se que somente o isolado L35 (D.O de 0,120) divergiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais, sendo o único isolado de *L. monocytogenes* classificado como produtor moderado de biofilme. Portanto, com base nos resultados, foram escolhidos, dentre os isolados com forte produção de biofilme, o L21 (carcaça de frango) e o L32 (abatedouro de frango) para as etapas subsequentes deste estudo.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE *L. monocytogenes*

Neste estudo, realizou-se a identificação da presença dos genes do *locus agr*, *prfA*, *actA*, *cheA*, *cheY*, *flaA* e *sigB* em isolados de *L. monocytogenes* com capacidade de formação de biofilme (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação de genes envolvidos na formação de biofilme em dez isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaça de frango e de abatedouro de frangos

Gene	identificação dos isolados									
	L18	L19	L20	L21	L22	L31	L32	L33	L34	L35
<i>prfA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>agrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>agrB</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>agrC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>agrD</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>flaA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>cheA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cheY</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>sigB</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>actA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): presença do gene. (-): ausência do gene.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Os genes *agrA* e *agrC* são importantes na primeira etapa da formação do biofilme, que consiste na adesão do micro-organismo e no *quorum sensing*. Já o gene *prfA*, que também tem influência na formação de biofilme, foi identificado nos 10 isolados de *L. monocytogenes*. Por outro lado, somente 50% dos isolados avaliados apresentaram o gene *agrB*, que está relacionado ao *quorum sensing* e à formação de biofilme. O gene *agrD* foi identificado somente no isolado L35. O gene *agrD* está relacionado ao *quorum sensing* e à formação de biofilme (LEMON; FREITAG; KOLTER, 2010; LUO *et al.*, 2013).

Gandra *et al.* (2019) sugerem que o *locus agr* tem participação ativa, principalmente os genes *agrB*, *agrC*, *agrD*, na fase inicial de formação de biofilme por isolados de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas. A identificação de pelo menos um gene do *locus agr* não está relacionada à formação de somente um sorotipo específico de *L. monocytogenes*, mas demonstra a ligação desses genes na produção de qualquer biofilme dos isolados de *L. monocytogenes* (GANDRA *et al.*, 2019; KADAM *et al.*, 2013).

Quanto à identificação do gene *prfA*, todos os isolados de *L. monocytogenes* avaliados portavam esse gene, também já observado por outros autores (GANDRA *et al.*, 2019; RAMIRES *et al.*, 2020). Esse gene, segundo Luo *et al.* (2013), é um ativador transcricional chave, que vai regular a expressão da maioria dos genes de virulência de *L. monocytogenes*. O gene *PrfA* pode desempenhar outra finalidade sobre a homeostase de *L. monocytogenes*, regulando indiretamente a expressão de genes transportadores, enzimas metabólicas, reguladores e proteínas de função ainda desconhecida (ZHOU *et al.*, 2011).

O gene *actA* codifica uma proteína que é responsável por dar propulsão e deslocamento da célula bacteriana no citoplasma da célula hospedeira e a propagação célula a célula de *L. monocytogenes* (TRAVIER *et al.*, 2013; VAZQUEZ-ARMENTA *et al.*, 2020). Além de ter como função gênica a agregação bacteriana em ambientes extracelulares por interações diretas (TRAVIER; LECUIT, 2014). No presente estudo, esse gene foi identificado em todos os isolados de *L. monocytogenes*, o que está em concordância com outros estudos que também demonstraram a presença desse gene em isolados de *L. monocytogenes* (FAN *et al.*, 2020; RAMIRES *et al.*, 2020; VAZQUEZ-ARMENTA *et al.*, 2020).

Foram avaliados os genes *flaA* que têm participação na produção de fímbrias e formação de biofilme e os genes *cheA/cheY*, um sistema de quimiotaxia de dois componentes. Observa-se, na Tabela 5, que os 10 isolados do *cheA* carregavam esse gene, enquanto dos 10 isolados avaliados do *cheY*, apenas o L20 não portou esse gene. Fan *et al.* (2020) também avaliaram a presença desses genes na formação de seis isolados de biofilme de *L. monocytogenes* e identificaram sua presença em todos os avaliados.

Em *L. monocytogenes*, os genes *cheY/cheA* estão associados à regulação da flagelina. O gene *flaA* está relacionado com a codificação da flagelina e o *cheY* e *cheA*, estão ligados às proteínas de quimiotaxia, desempenhando também função importante na virulência, uma vez que são de grande importância na etapa da invasão e adesão celular (DONS *et al.*, 2004; DONS; J.E.OLSEN; O.F.RASMUSSEN, 1994; TIENSUU *et al.*, 2019).

O gene *flaA* participa no início da formação do biofilme, atuando na motilidade, flagelos por quimiotaxia cheguem mais próximo a uma superfície desses micro-organismos para fazer fixação (LEMON; HIGGINS; KOLTER, 2007; ZHANG *et al.*,

2018). Dos 10 isolados de *L. monocytogenes* avaliados, em 8 (80%) não foi identificado o gene *flaA*, sendo identificado apenas nos isolados L34 e L35, ambos provenientes de abatedouro de frango, possivelmente porque os biofilmes foram avaliados já maduros, o que é correlacionado à ausência desse gene (TADIELO, 2020).

Pieta *et al.* (2014) avaliaram dois isolados de *L. monocytogenes* provenientes de queijos, sendo que em ambos foi possível detectar o gene *flaA*. Já Zhang *et al.* (2018) avaliaram um isolado de *L. monocytogenes* oriundo da abatedouro de carne crua, o qual carregava o gene *flaA*. O mesmo resultado foi encontrado por Fan *et al.* (2020) num estudo com seis cepas ATCC, no qual todas portavam o gene *flaA*.

O gene *sigB* é um regulador global da resposta ao estresse em *L. monocytogenes*, e está altamente relacionado à virulência, uma vez que influencia na transcrição do gene *prfA* por ligação direta com sua região promotora (ASAKURA *et al.*, 2012; FERREIRA; O'BYRNE; BOOR, 2001). Portanto, a regulação negativa de *sigB* evita a superexpressão de *prfA* e *actA*, afetando a capacidade da célula microbiana de aderir irreversivelmente e formar biofilmes (VAZQUEZ-ARMENTA *et al.*, 2020).

Dos 10 isolados de *L. monocytogenes* formadores de biofilmes avaliados no presente trabalho, seis (60 %) portavam o gene *sigB*. Asakura *et al.* (2012) avaliaram dois isolados de *L. monocytogenes* oriundos de queijos e constataram que o gene *sigB* foi transcrito somente em um isolado. A provável justificativa desses isolados não terem portado o *sigB* é devido à sua exibição em níveis indetectáveis (ASAKURA *et al.*, 2012).

5.3 EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *L. monocytogenes* EM SUPERFÍCIES DE POLIETILENO, AÇO INOXIDÁVEL E VIDRO

Nesta etapa do experimento, avaliou-se o efeito da temperatura (3 °C, 9 °C, 25 °C, 36 °C, 42 °C), em diferentes tempos (0, 4, 8, 12, 24, 120, 240 horas) sobre a formação de biofilme por dois isolados de *L. monocytogenes* selecionados (L21 e L32), em superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro. Observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas diferentes combinações realizadas, avaliadas

pela técnica de contagem de colônias em placas, conforme pode ser observado nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Contagem do isolado *L. monocytogenes* L21 nas superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro, sob diferentes temperaturas e tempos de incubação

Superfícies de polietileno (log UFC.cm ⁻²)							
Temperatura	0 h	4 h	8 h	12h	24 h	120h	240h
3°C	4,57 ± 0,10 ^{aE}	5,20 ± 0,08 ^{bD}	5,18 ± 0,10 ^{dD}	5,49 ± 0,13 ^{bC}	5,55 ± 0,13 ^{bcBC}	5,81 ± 0,06 ^{bB}	6,38 ± 0,07 ^{cA}
9°C	4,59 ± 0,14 ^{aD}	5,44 ± 0,14 ^{aC}	5,55 ± 0,09 ^{cC}	5,52 ± 0,19 ^{bC}	5,70 ± 0,19 ^{bC}	6,66 ± 0,11 ^{cB}	7,29 ± 0,10 ^{aA}
25°C	4,66 ± 0,10 ^{aD}	5,67 ± 0,11 ^{aC}	6,70 ± 0,16 ^{aB}	6,82 ± 0,05 ^{aB}	7,64 ± 0,16 ^{aA}	7,62 ± 0,03 ^{aA}	6,94 ± 0,10 ^{bB}
36°C	4,46 ± 0,15 ^{aF}	5,48 ± 0,12 ^{abE}	6,19 ± 0,15 ^{bD}	6,86 ± 0,12 ^{aC}	7,32 ± 0,20 ^{aAB}	7,39 ± 0,05 ^{abA}	6,98 ± 0,16 ^{bBC}
42°C	4,37 ± 0,30 ^{aE}	5,41 ± 0,14 ^{abD}	6,56 ± 0,16 ^{aC}	6,80 ± 0,17 ^{aBC}	7,56 ± 0,25 ^{aA}	7,23 ± 0,20 ^{bAB}	4,32 ± 0,15 ^{dE}
Superfícies de aço inoxidável (log UFC.cm ⁻²)							
3°C	4,16 ± 0,16 ^{aC}	4,83 ± 0,21 ^{cB}	4,88 ± 0,25 ^{cB}	5,26 ± 0,19 ^{dAB}	5,33 ± 0,13 ^{cAB}	5,32 ± 0,10 ^{cAB}	6,13 ± 0,23 ^{aA}
9°C	4,37 ± 0,10 ^{aC}	5,31 ± 0,17 ^{bB}	5,64 ± 0,08 ^{bB}	5,59 ± 0,20 ^{cdB}	5,62 ± 0,15 ^{cB}	6,21 ± 0,06 ^{aA}	6,29 ± 0,13 ^{aA}
25°C	4,13 ± 0,05 ^{aD}	5,63 ± 0,08 ^{abC}	5,64 ± 0,14 ^{bC}	5,87 ± 0,15 ^{cBC}	6,14 ± 0,12 ^{bB}	6,73 ± 0,26 ^{abA}	6,26 ± 0,26 ^{aAB}
36°C	4,50 ± 0,17 ^{aD}	5,86 ± 0,07 ^{aC}	6,42 ± 0,19 ^{aB}	6,46 ± 0,15 ^{bB}	6,62 ± 0,15 ^{aAB}	6,91 ± 0,02 ^{aA}	6,54 ± 0,02 ^{aB}
42°C	4,34 ± 0,19 ^{aE}	5,32 ± 0,27 ^{bC}	6,21 ± 0,05 ^{aB}	6,92 ± 0,10 ^{aA}	6,90 ± 0,13 ^{aA}	5,42 ± 0,39 ^{cC}	4,52 ± 0,24 ^{bD}
Superfície de vidro (log UFC.cm ⁻²)							
3° C	4,74 ± 0,20 ^{aE}	4,95 ± 0,21 ^{dCD}	5,27 ± 0,16 ^{bBC}	5,14 ± 0,03 ^{cBC}	5,38 ± 0,04 ^{dB}	5,86 ± 0,12 ^{bA}	6,12 ± 0,11 ^{bA}
9° C	4,25 ± 0,01 ^{aD}	5,11 ± 0,14 ^{cdC}	5,58 ± 0,37 ^{bBC}	5,47 ± 0,49 ^{bcBC}	5,79 ± 0,20 ^{cBC}	6,14 ± 0,12 ^{bAB}	6,70 ± 0,19 ^{aA}
25° C	4,50 ± 0,35 ^{aD}	5,71 ± 0,05 ^{bC}	5,57 ± 0,18 ^{bC}	6,10 ± 0,17 ^{bBC}	6,61 ± 0,15 ^{bA}	6,46 ± 0,15 ^{aAB}	6,37 ± 0,06 ^{abAB}
36° C	4,32 ± 0,06 ^{aD}	6,23 ± 0,08 ^{aC}	6,68 ± 0,14 ^{aB}	6,99 ± 0,09 ^{aA}	7,10 ± 0,02 ^{aA}	6,09 ± 0,02 ^{bC}	6,02 ± 0,16 ^{bC}
42° C	4,25 ± 0,07 ^{aE}	5,32 ± 0,19 ^{bcD}	6,40 ± 0,11 ^{aB}	6,81 ± 0,09 ^{aA}	6,70 ± 0,09 ^{bAB}	5,83 ± 0,12 ^{bC}	5,26 ± 0,24 ^{cd}

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas na coluna e maiúscula na linha pelo teste de Tukey (p>0,05).

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Na Tabela 6, são apresentados os resultados obtidos com o isolado de *L. monocytogenes* L21 nas superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro. Observou-se que a maior contagem do isolado L21, entre as superfícies avaliadas, foi na de polietileno, com contagem de 7,64 log UFC.cm⁻² na temperatura 25 °C, no tempo de 24 h. Quando avaliadas as superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro separadamente, observou-se que os maiores resultados sempre foram em temperaturas mais elevadas.

Quando a superfície de aço inoxidável, inoculada do isolado L21, foi submetida à temperatura de 42 °C, as contagens do micro-organismo não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tempos 12 h (6,92 log UFC.cm⁻²) e 24 h (6,90 log UFC.cm⁻²). O mesmo foi observado quando a superfície de aço inoxidável foi incubada a 36 °C por 120 h, resultando em contagens de 6,91 log UFC.cm⁻².

As contagens do isolado L21 na superfície de vidro quando submetido à temperatura de 36 °C não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tempos 12 h (6,99 log UFC.cm⁻²) e 24 h (7,10 log UFC.cm⁻²). Sendo essas as maiores contagens do L21 quando aplicados em superfície de vidro.

Quando avaliado o efeito da temperatura 3 °C e 9 °C sobre o isolado L21, a superfície de polietileno foi a que teve maior contagem, em comparação às superfícies de vidro e aço inoxidável avaliadas, sendo que a maior contagem foi a 9 °C (6,70 log UFC.cm⁻²), apresentando diferença estatística quando comparada a 3 °C (6,12 log UFC.cm⁻²) ambas em 240 h de incubação. Em relação à superfície de aço inoxidável, os resultados não divergiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), tanto a 3 °C como 9 °C, apresentando contagens de 6,13 log UFC.cm⁻² e 6,29 log UFC.cm⁻², respectivamente, no tempo de 240 h. Já para a superfície de vidro, o isolado L21 apresentou contagens para as mesmas condições de temperatura, 6,12 log UFC/cm² e 6,70 log UFC.cm⁻² para 3 e 9 °C, respectivamente, diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Pôde-se observar que a multiplicação do isolado L21 em temperaturas mais baixas (3 °C e 9 °C) ocorreu de forma mais lenta, sempre no tempo de 240 h, quando comparado em temperaturas mais elevadas (25 °C, 36 °C e

42 °C), em que seus maiores resultados de contagem foram sempre nos tempos de 24 h e 12 h (Tabela 7).

Tabela 7 - Contagem do isolado *L. monocytogenes* L32 nas superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro, sob diferentes temperaturas e tempos de incubação

Superfícies de polietileno (log UFC.cm ⁻²)							
Temperatura	0 h	4 h	8 h	12h	24 h	120h	240h
3°C	4,50 ± 0,08 ^{aD}	4,92 ± 0,20 ^{cC}	5,49 ± 0,09 ^{cB}	5,56 ± 0,02 ^{cAB}	5,57 ± 0,06 ^{dAB}	5,61 ± 0,08 ^{bAB}	5,87 ± 0,15 ^{bA}
9°C	4,30 ± 0,20 ^{aD}	5,45 ± 0,24 ^{bC}	5,57 ± 0,05 ^{cC}	5,58 ± 0,04 ^{cC}	6,18 ± 0,18 ^{cB}	6,64± 0,11 ^{aA}	6,78 ± 0,13 ^{aA}
25°C	4,45 ± 0,20 ^{aD}	5,56 ± 0,16 ^{bC}	6,27 ± - 0,05 ^{bB}	6,61 ± 0,16 ^{bB}	7,41 ± 0,14 ^{aA}	6,64 ± 0,19 ^{aB}	6,51 ± 0,19 ^{aB}
36°C	4,55 ± 0,04 ^{aC}	6,54 ± 0,05 ^{aB}	6,68 ± 0,12 ^{aB}	7,13 ± 0,05 ^{aA}	7,13 ± 0,05 ^{abA}	6,73 ± 0,05 ^{aB}	6,67 ± 0,15 ^{aB}
42°C	4,59 ± 0,11 ^{aE}	5,46 ± 0,16 ^{bC}	6,26 ± 0,20 ^{bB}	6,44 ± 0,08 ^{bB}	6,87 ± 0,13 ^{bA}	5,20 ± 0,17 ^{cACD}	5,06 ± 0,10 ^{cD}
Superfícies aço inoxidável (log UFC.cm ⁻²)							
3°C	4,08 ± 0,13 ^{aE}	4,62 ± 0,15 ^{bC}	5,06 ± 0,15 ^{cB}	5,04 ± 0,13 ^{dB}	5,16 ± 0,14 ^{dB}	5,42 ± 0,17 ^{cAB}	5,80 ± 0,18 ^{bA}
9°C	4,28 ± 0,27 ^{aD}	5,13 ± 0,07 ^{aC}	5,66 ± 0,08 ^{bB}	5,58 ± 0,04 ^{cB}	5,92 ± 0,08 ^{cAB}	5,91± 0,10 ^{bAB}	6,02 ± 0,06 ^{bA}
25°C	4,57 ± 0,28 ^{aE}	5,48 ± 0,17 ^{aD}	5,52± 0,22 ^{bD}	5,95 ± 0,14 ^{bcCD}	6,41 ± 0,15 ^{cBC}	6,88 ± 0,09 ^{aAB}	6,96 ± 0,23 ^{aA}
36°C	4,30 ± 0,52 ^{aB}	5,21 ± 0,22 ^{aB}	6,39 ± 0,16 ^{aA}	7,06 ± 0,20 ^{aA}	7,03 ± 0,23 ^{aA}	7,00 ± 0,01 ^{aA}	7,00 ± 0,61 ^{aA}
42°C	4,19 ± 0,13 ^{aE}	5,27 ± 0,09 ^{aC}	6,17 ± 0,15 ^{aB}	6,30 ± 0,30 ^{bB}	7,20 ± 0,27 ^{aA}	5,31 ± 0,27 ^{cC}	4,10 ± 0,17 ^{cE}
Superfície de vidro (log UFC.cm ⁻²)							
3°C	4,30 ± 0,21 ^{b^{cE}}	4,20 ± 0,17 ^{cD}	4,82 ± 0,46 ^{cBC}	4,94 ± 0,12 ^{dB}	5,06 ± 0,66 ^{dAB}	5,17 ± 0,18 ^{dAB}	5,62 ± 0,13 ^{dA}
9°C	4,05 ± 0,10 ^{cE}	5,52 ± 0,16 ^{aD}	5,63 ± 0,04 ^{bCD}	5,66 ± 0,09 ^{cCD}	5,81 ± 0,11 ^{cBC}	5,94± 0,11 ^{cB}	6,33 ± 0,01 ^{cbA}
25°C	4,40 ± 0,17 ^{abcD}	5,33 ± 0,14 ^{bC}	5,59 ± 0,11 ^{bC}	6,06 ± 0,10 ^{bB}	6,20 ± 0,17 ^{bB}	7,19 ± 0,09 ^{aA}	7,15 ± 0,14 ^{aA}
36°C	4,81 ± 0,17 ^{aE}	5,83 ± 0,14 ^{aD}	6,34 ± 0,07 ^{aC}	6,79 ± 0,15 ^{aAB}	7,13 ± 0,05 ^{aA}	6,69 ± 0,21 ^{bBC}	6,70 ± 0,17 ^{bBC}
42°C	4,56 ± 0,11 ^{abD}	5,46 ± 0,19 ^{abC}	6,31 ± 0,26 ^{aB}	6,44 ± 0,08 ^{bAB}	6,86 ± 0,13 ^{aA}	5,20 ± 0,06 ^{dC}	5,06 ± 0,10 ^{eC}

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas na coluna e maiúscula na linha pelo teste de Tukey (p>0,05).

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A Tabela 7 apresenta os resultados das contagens do isolado *L. monocytogenes* L32 sobre as superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro. Da mesma forma que foi observado para isolado L21 (Tabela 6), a superfície de polietileno foi onde houve maior contagem também para o isolado L32, com 7,41 log UFC.cm⁻², na temperatura de 25 °C, no tempo de 24 h.

Na superfície de aço inoxidável mantida na temperatura de 42 °C por 120 h, observou-se contagem de 7,20 log UFC/cm² para o isolado L32. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) quando o isolado foi submetido à temperatura de 36 °C (7,03 log UFC.cm⁻²) durante o mesmo tempo de incubação. Em superfície de vidro o L32 teve sua maior contagem de formação de biofilme de 7,19 log UFC.cm⁻², na temperatura de 25 °C e no tempo de 120 h.

O vidro e o aço inoxidável são superfícies hidrofílicas, enquanto as superfícies de plástico são mais hidrofóbicas (STEPANOVIĆ *et al.*, 2004). Superfícies hidrofóbicas possibilitam a aproximação entre micro-organismo e a matriz sólida, eliminando a água interfacial presente nas superfícies de interação, facilitando, assim, a adesão de micro-organismos (ZERAİK; NITSCHKE, 2010).

Pelos resultados obtidos, observou-se que, os dois isolados L21 e L32 apresentaram maiores contagens de *L. monocytogenes* na superfície de polietileno (hidrofóbica). Bonsaglia *et al.* (2014) descrevem que superfícies hidrofílicas, independente da temperatura, formam mais biofilme de *L. monocytogenes* em comparação a superfícies hidrofóbicas (CHAVANT *et al.*, 2002). Porém, os resultados deste estudo são consistentes com os de Aarnisalo *et al.* (2007), que utilizaram 10 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de diversas instalações de indústrias alimentícias, e verificaram que as contagens dos biofilmes de *L. monocytogenes* nas superfícies de aço inoxidável e polietileno foi de 5,91 log UFC.cm⁻² e de 7,30 log UFC.cm⁻², respectivamente. Já Abeyesundara *et al.* (2017), avaliaram seis isolados de *L. monocytogenes* oriundos de diferentes fontes de alimentos, e verificaram que as contagens de *L. monocytogenes* foi de 5,5 e 6,0 log UFC.cm⁻², nas superfícies de aço inoxidável e polietileno, respectivamente.

Os isolados de L21 e L32 aderiram-se às superfícies de aço inoxidável e vidro em todas as temperaturas e tempos avaliados. Os resultados deste estudo corroboram os obtidos por Giaouris *et al.* (2013), que avaliaram três isolados de *L. monocytogenes* (um de procedência clínica, um de alimento congelado e outro de

ambiente de fábrica de processamento de alimentos), e constataram que esses isolados atingiram contagens de $6,05 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ em superfícies de aço inoxidável. Reis-Teixeira *et al.* (2017) obtiveram contagens de $6,0 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ e de $8,0 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ de *L. monocytogenes* em biofilmes em superfície de aço inoxidável e vidro, respectivamente. Bonsaglia *et al.* (2014) avaliaram a produção de biofilme em aço inoxidável e vidro e observaram que de 35 isolados de *L. monocytogenes* estudados, 32 (93,8%) produziram biofilme.

Pode-se observar, pelas Tabelas 6 e 7, que as maiores contagens dos dois isolados de *L. monocytogenes* (L21 e L32) sempre aconteceram sob a influência das temperaturas mais altas (25 °C, 36 °C e 42 °C), para todas as superfícies. Outros autores relatam que a produção de biofilme por *L. monocytogenes* aumenta com a elevação da temperatura (IN LEE *et al.*, 2017; KADAM *et al.*, 2013; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017).

Segundo Lemon, Higgins, Kolter (2007), os flagelos são importantes na produção de biofilme por *L. monocytogenes*, dando-lhe motilidade, sendo que a temperatura é um fator decisivo para a expressão dos genes flagelares. Esses flagelos relacionados com a formação do biofilme são expressos a 25 °C (GANDRA *et al.*, 2019; LEMON; HIGGINS; KOLTER, 2007; TRÉMOULET *et al.*, 2002).

Outros estudos descrevem que em alguns isolados em temperaturas iguais ou superiores a 37 °C os genes responsáveis pela motilidade podem ser expressados (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDSBOROUGH, 2002; LUO *et al.*, 2013; WAY *et al.*, 2004). Outra justificativa para os biofilmes terem maiores taxas de fixação em temperaturas altas é a hidrofobicidade da superfície, pois com o aumento da temperatura há um aumento na fixação das células microbianas em superfícies mais rígidas (ABEYSUNDARA *et al.*, 2017; DI BONAVENTURA *et al.*, 2008).

Como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7, temperaturas mais baixas (3 °C e 9 °C) não são um obstáculo para a multiplicação de *L. monocytogenes*, haja vista que foram obtidos resultados de contagens dos dois isolados (L21 e L32) nas diversas condições e nas superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro. Abeysundara *et al.* (2017) avaliaram seis isolados de *L. monocytogenes* oriundos de diferentes fontes de alimentos, as temperaturas baixas não são uma barreira para o crescimento de *L. monocytogenes*. Essa característica psicrófila é um dos

principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em ambientes frios.

De modo que as condições ambientais desempenham um papel importante na formação do biofilme (LIU *et al.*, 2020). Portanto, as temperaturas foram escolhidas com base nas condições de processamento estabelecendo-se cinco para determinar a formação de biofilme de *L. monocytogenes* sob condições simuladas de processamento, sendo elas: de armazenamento refrigerado (3 °C), de salas de fabricação de carne (10 °C), e outras mais elevadas não comuns no processamento, porém, muito importantes a serem estudadas, simulam a temperatura ambiente (25 °C), do corpo humano (36 °C) e 42 °C, pois alguns genes podem ser expressos.

Com base nas contagens, foram selecionados os melhores tempos e temperaturas dos isolados L21 e L32 pra avaliação do efeito dos sanitizantes e do *L. Lactis* (LLH20) contra a formação de biofilmes de *L. monocytogenes*, os 10 isolados foram avaliados nos tempos e temperaturas conforme descritos abaixo:

a) superfície de polietileno:

- todos os isolados à temperatura de 25 °C/24 h;

b) superfície de aço inoxidável:

- isolados L18, L19, L20, L21 (isolados de carcaça de frango) à temperatura de 42 °C / 12 h e isolados L31, L32, L33, L34, L35 (isolados de abatedouro de frango) 42 °C / 24 h;

c) superfície de vidro:

- isolados L18, L19, L20, L21 (isolados de carcaça de frango) à temperatura de 36 °C / 24 h e isolados L31, L32, L33, L34, L35 (isolados de abatedouro de frango) 25 °C / 120 h.

5.4 EFEITO DA REMOÇÃO DE BIOFILME DE *L. monocytogenes* SOB A AÇÃO DE SANITIZANTES

Os 10 isolados de *L. monocytogenes*, foram cultivados nas melhores condições (item 5.3) para a formação de biofilme nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e vidro e avaliados quanto a ação de sanitizantes comumente utilizados na indústria de alimentos (ácido peracético e quaternário de amônio).

Os sanitizantes ácido peracético 0,3% e quaternário de amônio 2% foram eficazes na remoção dos biofilmes, reduzindo as contagens de *L. monocytogenes* até o limite de detecção ($<2,0 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$). As concentrações dos sanitizantes utilizadas neste estudo foram as máximas recomendada pelos fabricantes, e constam nas especificações técnicas do fabricante nos anexos A e B, visando o controle de *L. monocytogenes* em sua forma livre.

Segundo diversos autores, tais sanitizantes conseguem reduzir a adesão de micro-organismos e, conseqüentemente, a formação de biofilmes, contudo, não há uma atuação satisfatória em relação ao biofilme em formação (BELESSI *et al.*, 2011; BELTRAME *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017).

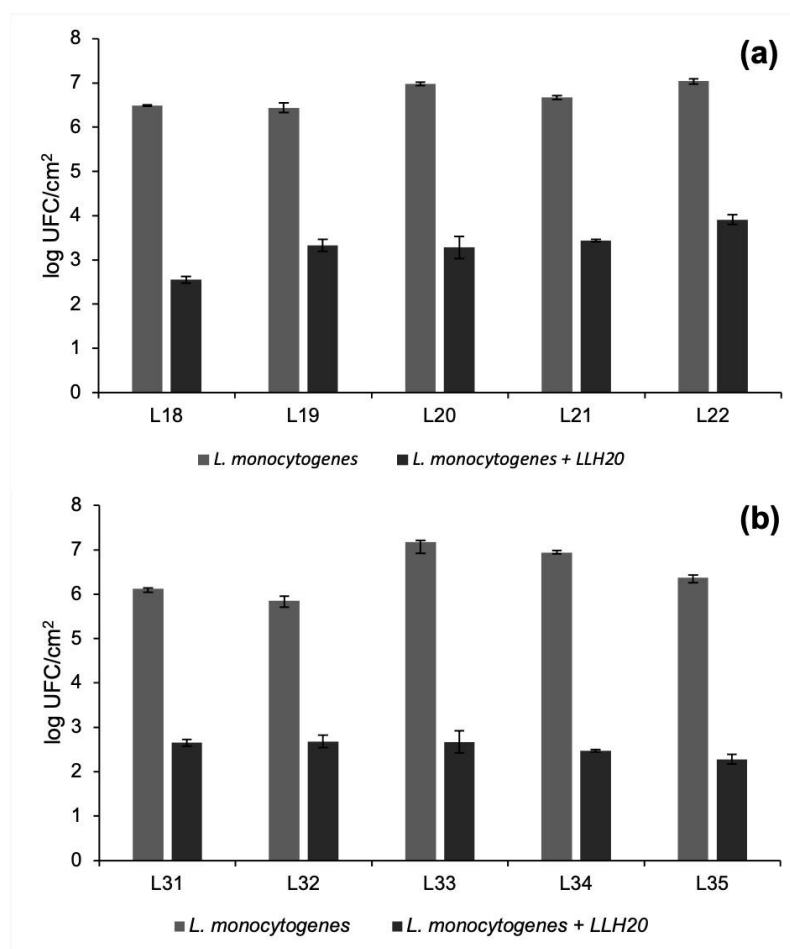
Beltrame *et al.* (2012) avaliaram a eficácia do ácido peracético (0,2; 0,5; 0,8 e 1,1%) e do quaternário de amônio (0,2; 0,6; 1,0 e 1,4%) em concentrações menores do que o fabricante recomenda contra *L. monocytogenes* e descrevem que os sanitizantes mostraram-se eficazes contra esse patógeno em todas as condições inferiores à da recomendação.

A formação do biofilme maduro pode ocorrer entre 3 a 6, podendo chegar até 10 dias, sua remoção se torna um problema na indústria de alimentos, pois os micro-organismos ligados a essa matriz podem diminuir a eficácia dos sanitizantes utilizados. Assim, a matriz EPS cria uma barreira que dificulta a penetração dos sanitizantes, impedindo sua atuação nas camadas internas do biofilme (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; LI *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017).

5.5 EFEITO ANTIBIOFILME DE *L. monocytogenes* PELO ISOLADO LLH20 EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL, POLIETILENO E VIDRO

Avaliou-se a capacidade antibiofilme do isolado *L. lactis* LLH20 contra *L. monocytogenes* em superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro, conforme mostram as Figuras 2, 3 e 4.

Figura 3 - Inibição da formação de biofilme de *L. monocytogenes* em cocultura com o isolado LLH20 em superfície de polietileno

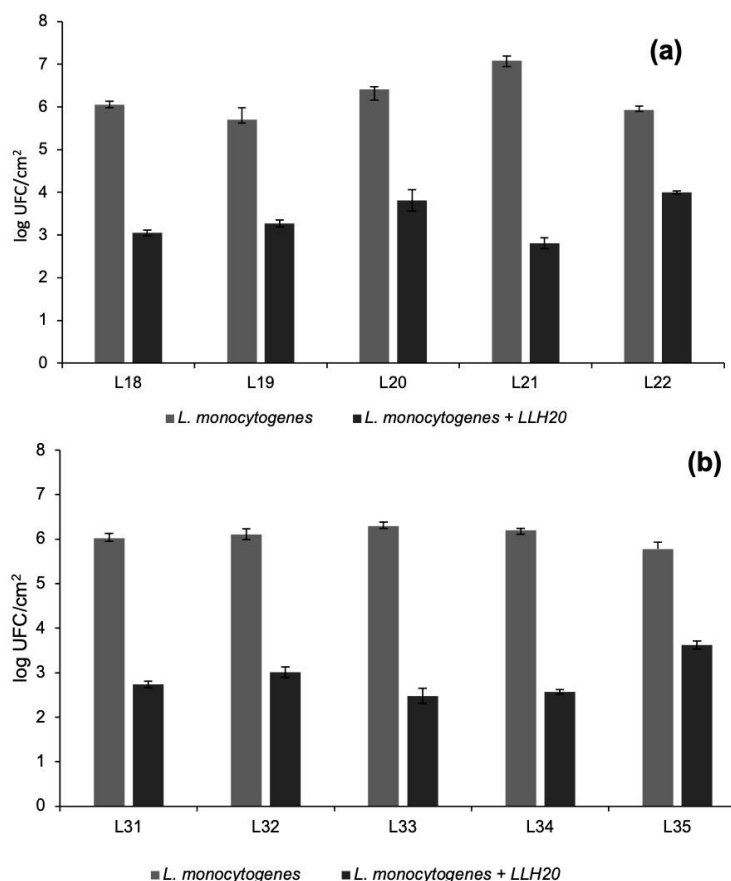


(a) isolados de carcaça de frango (b) isolados de abatedouro de frango, a 25 °C por 24 h.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A maior redução nas contagens de *L. monocytogenes* quando aplicado o biocontrole LLH20 foi observada para o isolado L33 (4,5 log UFC.cm⁻²) na superfície de Polietileno (Figura 3b). As reduções nas contagens de *L. monocytogenes* podem ser atribuídas à capacidade do isolado LLH20 de produzir compostos antagonistas, tais como: ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (VESTERLUND *et al.*, 2006; WOO; AHN, 2013). Outra justificativa para a redução microbiana, segundo Habimana *et al.* (2011), é a competição por nutrientes, visto que os isolados de *L. monocytogenes* e o LLH20 estavam no mesmo meio de cultura.

Figura 2 - Inibição da formação de biofilme de *L. monocytogenes* em cocultura com o isolado de LLH20 em superfície de aço inoxidável

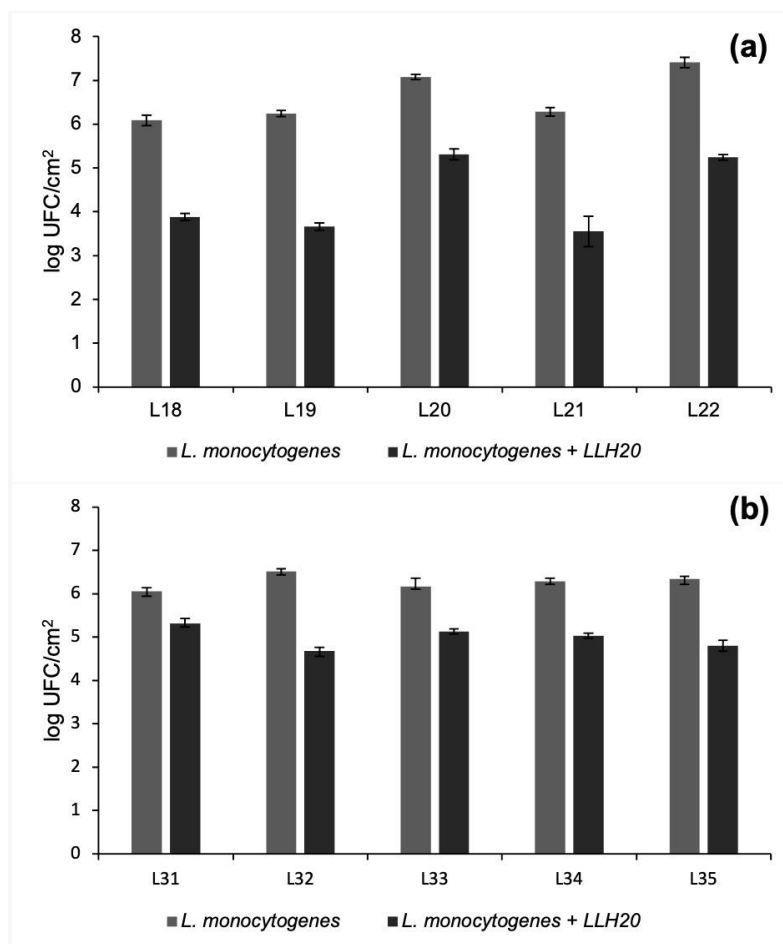


(a) isolados de carcaça de frango (42 °C por 12 h); (b) isolados de abatedouro de frango (42 °C por 24 h).

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O isolado L21 apresentou a maior redução nas contagens da formação de biofilme de *L. monocytogenes* na presença de LLH20, com 4,27 log UFC.cm⁻² e o L22 teve a menor redução de 1,93 log UFC.cm⁻² em superfície de aço inoxidável. Resultados semelhantes foram relatados por Hossain *et al.* (2020) quando utilizaram 6 isolados de BAL (sendo três *Lactobacillus plantarum* e os outros três, *L. curvatus*, *L. sakei* e *Leuconostoc mesenteroides*), oriundos de kimchi, no controle da formação de biofilme por *L. monocytogenes* e verificaram uma redução de 2,17 log UFC.cm⁻² em superfície de aço inoxidável.

Figura 3 - Inibição da formação de biofilme de *L. monocytogenes* em cocultura com o isolado LLH20 em superfície de vidro



(a) isolados de carcaça de frango (36 °C por 24 h) (b) isolados de abatedouro de frango (25 °C por 120 h).

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O isolado LLH20 foi capaz de reduzir as contagens de *L. monocytogenes* nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e vidro (Figura 3, 4 e 5). Houve redução nas contagens de *L. monocytogenes* quando em cocultura com LLH20 com resultado mínimo de 0,75 log UFC.cm⁻² (Figura 5b) e chegando à máxima de 4,5 log UFC.cm⁻² (Figuras 3b) de redução, quando comparado aos controles positivos contendo só *L. monocytogenes* e a cocultura de *L. monocytogenes* + LLH20.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o isolado LLH20 apresentou atividade antimicrobiana contra os 10 isolados de *L. monocytogenes* avaliados. Entretanto, não foi possível afirmar qual substância antimicrobiana produzida pelo isolado LLH20 reduziu a multiplicação dos isolados de *L. monocytogenes*, uma vez que o ágar MRS, utilizado como meio de cultivo,

apresenta uma grande quantidade de carboidratos, o que permite a produção de metabólitos, como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil, acetaldeído, acetoína, dióxido de carbono, reuterina, reuteriicina e bacteriocinas, que podem ser responsáveis pela inibição desse micro-organismo (AZHAR; ZIN; ABDUL HAMID, 2017; DE MARCO, 2019; YERLIKAYA, 2019).

Ácidos orgânicos possuem atividade antimicrobiana que está ligada à diminuição do pH e também a habilidade da separação de carboxilas. Em sua forma livre, os ácidos podem invadir a célula do micro-organismo onde ânions e prótons serão liberados, ocasionando a redução do pH intracelular, impossibilitando, assim, que aconteça ação enzimática, provocando a destruição desse patógeno (BELTRAME *et al.*, 2012; RUSSELL, 1992).

Acredita-se também que a inibição de *L. monocytogenes* pelo LLH20 se deva não somente aos ácidos orgânicos produzidos, mas também à ação da bacteriocina produzida, tendo em vista que De Marco (2019) avaliou o isolado LLH20 e verificou que esse micro-organismo é produtor de uma bacteriocina que possui ação antagonista contra a *L. monocytogenes*.

Dessa forma, o mecanismo de ação das bacteriocinas vai depender de diversas condições em que se encontra o micro-organismo produtor de bacteriocina, entre elas: fase de crescimento, concentração do peptídeo e nível de estresse (temperatura, pH e atividade de água alterada). Essas condições podem gerar maior quantidade de metabólitos, podendo gerar uma ação bactericida ou bacteriostática (JUODEIKIENE *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes foram relatados por Hossain *et al.* (2020) quando utilizaram 6 isolados de BAL (sendo três *Lactobacillus plantarum* e os outros três, *L. curvatus*, *L. sakei* e *Leuconostoc mesenteroides*), oriundos de kimchi, no controle da formação de biofilme por *L. monocytogenes* e verificaram uma redução de 2,17 log UFC.cm⁻² em superfície de aço inoxidável.

Já Garcia-almendárez *et al.* (2008) descreveram reduções superiores a > 5,0 log UFC.cm⁻² de *L. monocytogenes* em superfície de aço inoxidável, quando aplicado um isolado de *L. lactis*, portanto, resultado superior aos encontrados no presente estudo.

A prevenção e o controle de micro-organismos produtores de biofilme são prioridade para garantir a qualidade nas indústrias de alimentos. O uso de BAL

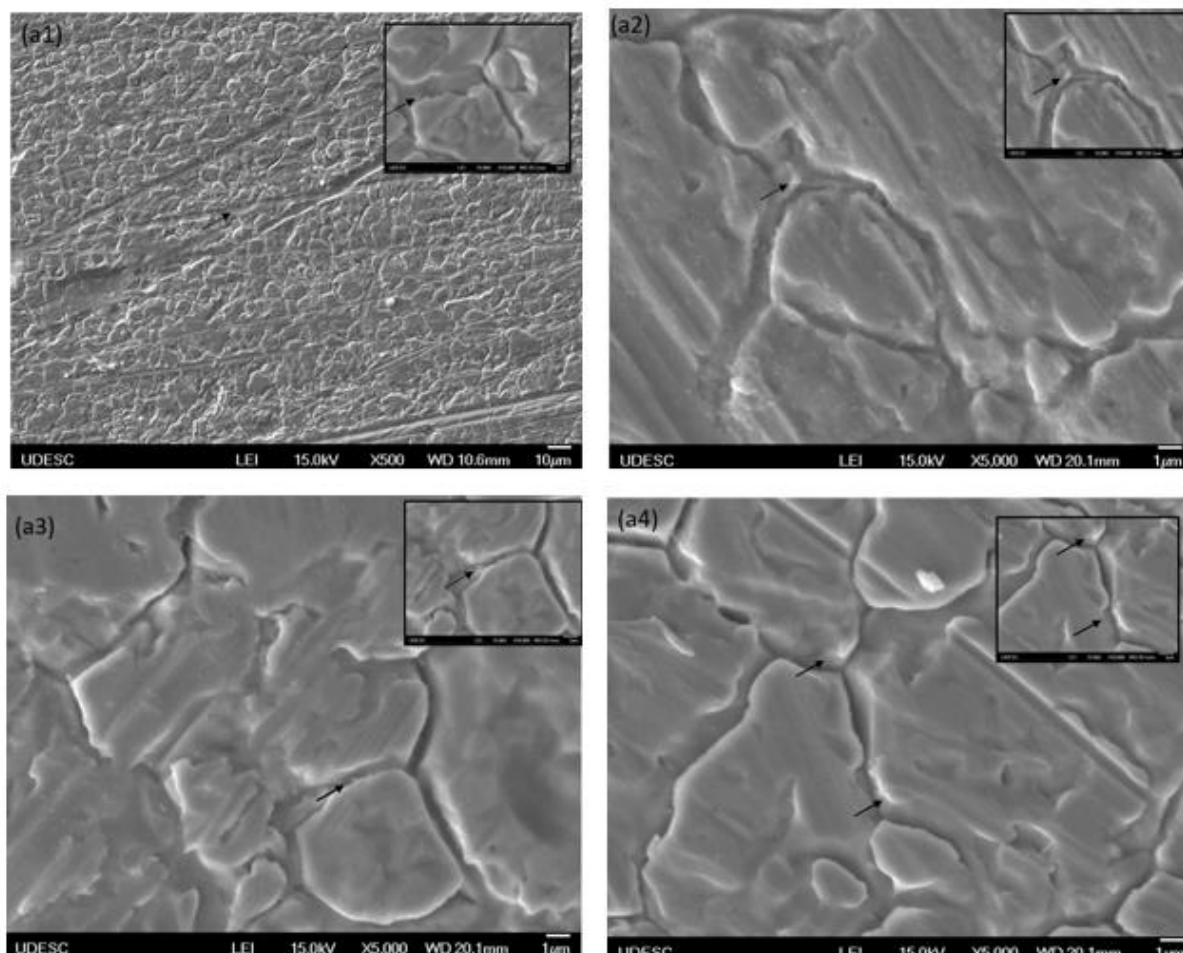
enquanto cultura bioprotetora, como sanitizantes bioativos, é relatado por vários autores (PÉREZ IBARRECHE; CASTELLANO; VIGNOLO, 2014).

Hossain, Sadekuzzaman, Ha (2017) relatam que a aplicação de vários isolados de BAL com potencial probiótico pode reduzir ou até inibir a multiplicação e a formação de biofilme por patógenos de origem alimentar em superfícies de contato com alimentos. Logo, pode melhorar a qualidade, prolongar a vida útil dos alimentos e controlar sua contaminação na indústria alimentícia (WEI; WOLF; HAMMES, 2006).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para elucidar o efeito dos tratamentos com APA (0,3%), CQA (2%) e LLH20 sobre o isolado *L. monocytogenes* L32, formador de biofilme, realizou-se a MEV antes e após os tratamentos. As Figuras 6, 7 e 8 apresentam as alterações morfológicas das células desse micro-organismo.

Figura 4 – Avaliação por MEV da formação do biofilme pelo isolado *L. monocytogenes* L32 em superfície de aço inoxidável submetidos aos tratamentos de APA 0,3%, CQA 2% e cocultura de LLH20 a 25 °C/24 h



(a1) controle de *L. monocytogenes*; (a2) tratamento com APA 0,3%; (a3) tratamento de CQA 2%; (a4) tratamento de cocultura de LLH20. “Setas pretas” indicam que é a mesma região, a imagem menor está com aumento mais próximo.

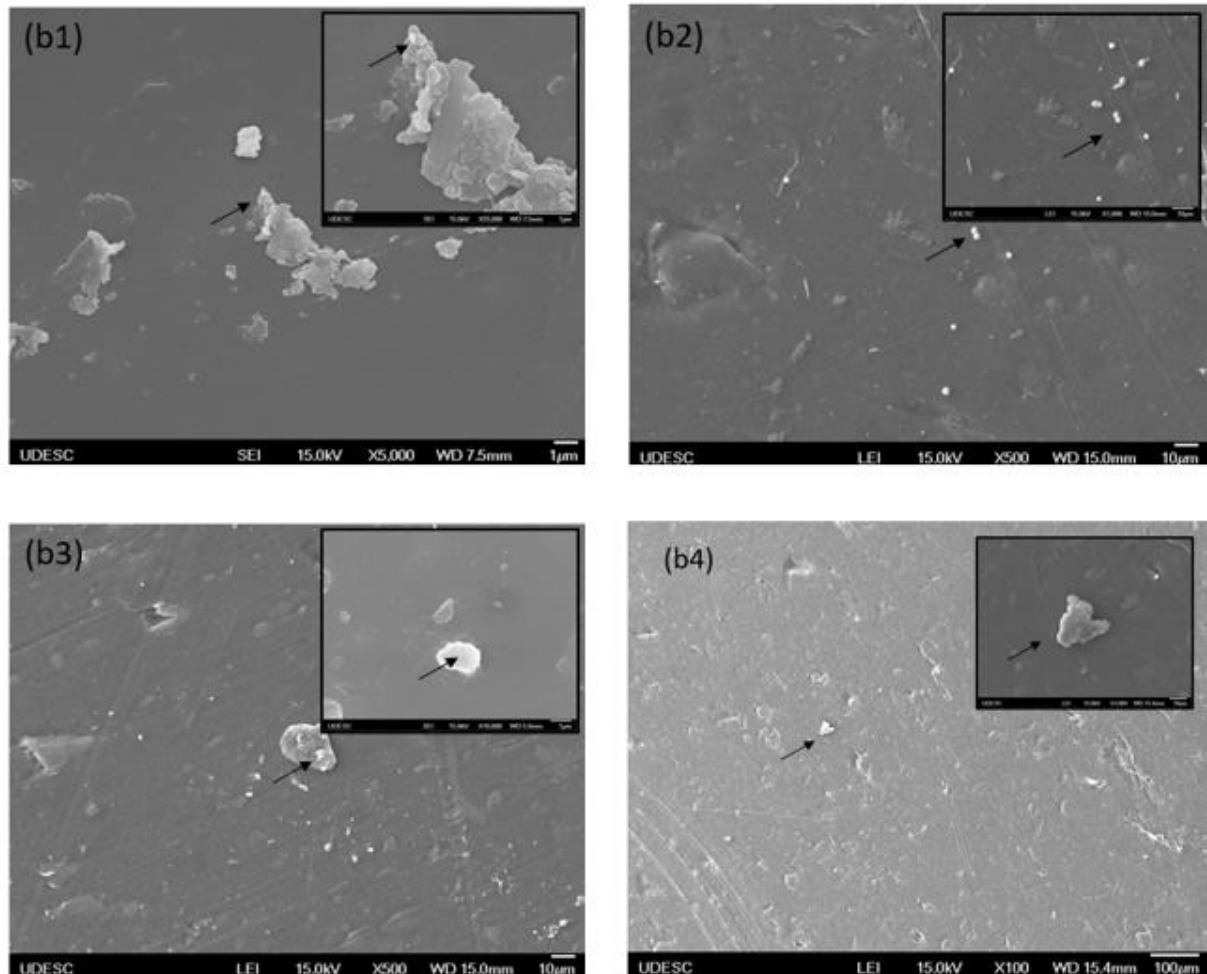
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Nas superfícies de aço inoxidável observou-se que as células do isolado L32 na formaram cadeias ao longo do limite granulado (Figura 6). Para Mosquera-fernández *et al.* (2014), a topografia do aço inoxidável é caracterizada por figuras pseudo-geométricas, formadas por fendas profundas induzidas durante a decapagem, que promovem o aprisionamento celular nos estágios iniciais da formação do biofilme.

Dessa maneira, conclui-se que as células de *L. monocytogenes* foram afetadas por conta da topografia do aço inoxidável, o que já foi relatado por estudos

anteriores (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDSBOROUGH, 2002; MARSH; LUO; WANG, 2003; MOSQUERA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Figura 5- Avaliação por MEV da formação do biofilme pelo isolado *L. monocytogenes* L32 em superfície de polietileno submetidos aos tratamentos de APA 0,3%, CQA 2% e cocultura de LLH20 a 42 °C/24 h

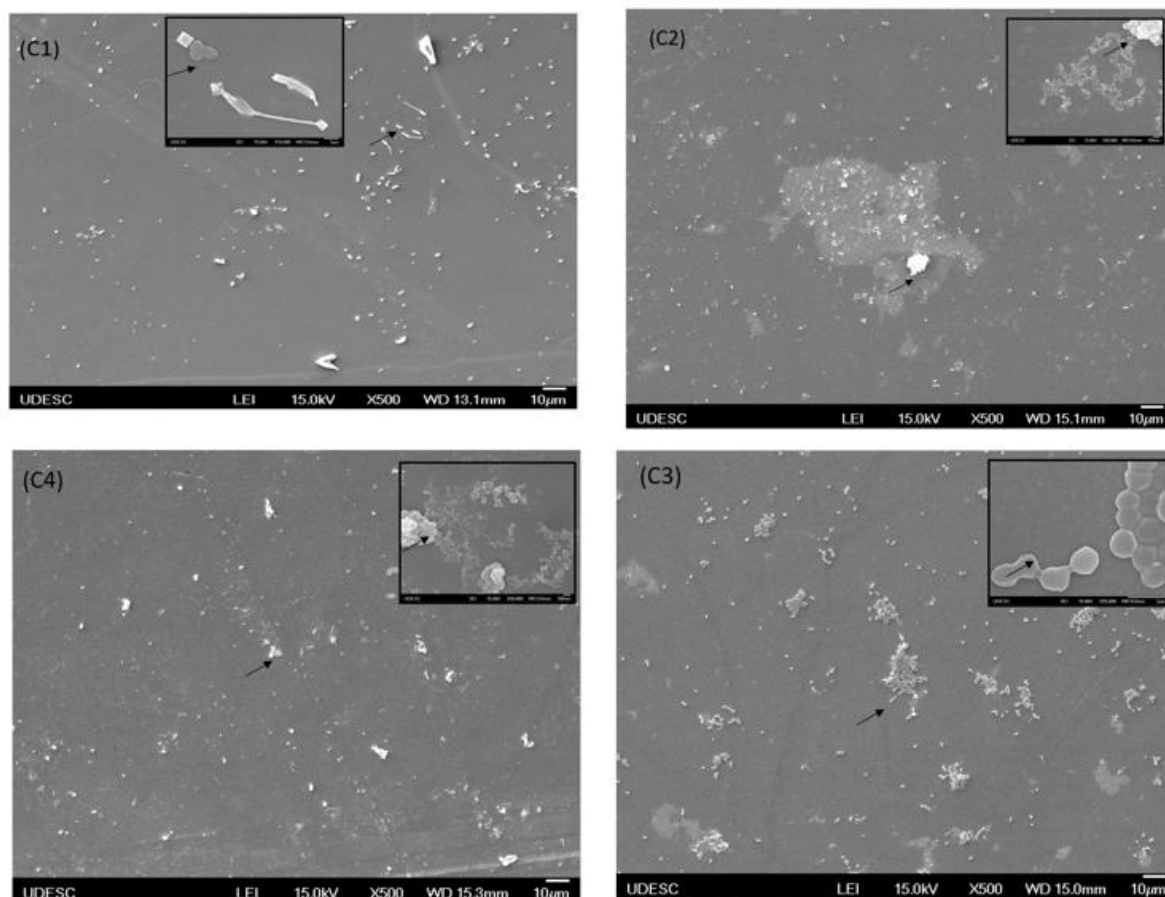


(b1) controle de *L. monocytogenes*; (b2) tratamento com APA 0,3%; (b3) tratamento de CQA 2%; (b4) tratamento de cocultura de LLH20. “Setas pretas” indicam que é a mesma região, a imagem menor está com aumento mais próximo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

As microscopias da Figura 7 mostram que o isolado L32, em superfície de polietileno, foi capaz de formar biofilme (Figura 7 b1). Entretanto, observa-se que houve diminuição da matriz EPS e nas populações residuais de biofilme de *L. monocytogenes* quando aplicados os tratamentos de APA, CQA e a cocultura de LLH20 (Figura 7 b2, b3, b4).

Figura 6 - Avaliação por MEV da formação do biofilme pelo isolado *L. monocytogenes* L32 em superfície de vidro submetidos aos tratamentos de APA 0,3%, CQA 2% e cocultura de LLH20 a 25 °C/120 h



(c1) controle de *L. monocytogenes*; (c2) tratamento com APA 0,3%; (c3) tratamento de CQA 2%; (c4) tratamento de cocultura de LLH20. "Setas pretas" indicam que é a mesma região, a imagem menor está com aumento mais próximo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Nas microscopias da Figuras 8, observa-se que o isolado *L. monocytogenes* L32, em superfície de vidro, foi capaz de formar biofilmes heterogêneos com células isoladas, bem como agregados de bactérias em mono camadas. Conforme indicado pela seta preta nas figuras do MEV (Figura 8 c2, c3 c4), uma matriz EPS também pode ser observada como material difuso distribuído de maneira heterogênea na superfície e a quantidade dessa matriz pode ser identificada claramente como produto gerado pelos agregados de células do biofilme. Brauge *et al.* (2015) também observaram uma grande quantidade de matriz EPS em seus isolados dos biofilmes de *L. monocytogenes*.

Apesar de não ter sido possível observar uma distribuição homogênea e o padrão “favo de mel” no presente trabalho, as superfícies de polietileno e vidro (Figuras 7 e 8) exibiram pequenos aglomerados de biofilmes, enquanto na Figura 6 (aço inoxidável) verificou-se a formação de pequenas cadeias ao longo do limite granulado.

Observações semelhantes também foram são relatadas por Andre (2015), Brauge *et al.* (2015) e por Mosquera-Fernández *et al.* (2014). Uma suposição para a não visualização das estruturas mais complexas como padrão “favo de mel”, “tapete celular”, forma de “bolas” é o próprio processo de preparação da amostra do biofilme para a realização do MEV, porque a utilização de solventes para desidratação pode levar a alterações na amostra e modificações na matriz EPS (BELLÉ, 2020; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os tratamentos com APA (0,3%), CQA (2%) e a cocultura de LLH20 aplicados contra o biofilme do isolado *L. monocytogenes* L32 (Figura 7 b2, b3e b4 e Figura 8 c2, c3, c4), mostraram-se em menores populações de biofilme quando comparadas ao controle positivo *L. monocytogenes* (Figura 7b1 e Figura 8c1). Quando o isolado L32 foi co-cultivado com o isolado de BAL LLH20, as imagens micrográficas mostraram que a capacidade de *L. monocytogenes* para formar biofilme foi reduzida.

Haddad *et al.* (2021) avaliaram o potencial antagônico do *L. plantarum* e visualizaram que a morfologia das células de *L. monocytogenes* formadora de biofilme foi drasticamente afetada. Outros estudos também obtiveram resultados semelhantes utilizando BAL contra biofilmes de *L. monocytogenes* (HOSSAIN *et al.*, 2020; KAVITHA; HARIKRISHNAN; JEEVARATNAM, 2020).

Pelas imagens de microscopia foi possível observar que houve alteração nas estruturas dos biofilmes após os tratamentos com APA e CQA, mostrando rearranjo e até desestruturação da arquitetura em relação aos controles de *L. monocytogenes* (Figura 7 e 8), efeito também observado por Bellé, (2020); Jung *et al.*, (2018).

Os resultados de MEV permitiram observar que nas amostras tratadas com antimicrobianos houve diferença na quantidade dos biofilmes quando comparadas ao controle. Muito embora não seja possível confirmar que as células residuais nas amostras com os tratamentos APA, CQA, LLH20 sejam viáveis cultiváveis, possivelmente por conta dos tratamentos aplicados.

6 CONCLUSÃO

Os 10 isolados de *L. monocytogenes* oriundos de carcaça de frango e abatedouro de frango produzem biofilmes em superfícies de polietileno, aço inoxidável e vidro em diferentes temperaturas, e portam os genes *prfA*, *agrA*, *agrb*, *agrC*, *agrD*, *flaA*, *cheA*, *CheY*, *sigB* e *actA*, os quais estão relacionados à formação de biofilme por essas bactérias.

A ação dos sanitizantes químicos APA (0,2%) e o CQA (2%) mostrou-se eficaz na redução dos biofilmes de *L. monocytogenes* em todas as superfícies testadas. A cocultura de LLH20 apresentou reduções significativas para a formação todos os isolados de *L. monocytogenes*, o que pode ser atribuída aos compostos antagonistas produzidos pelo isolado LLH20, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocina.

Nas superfícies de polietileno e vidro, quando aplicado tratamentos com APA (0,3%), CQA (2%) e a cocultura de LLH20 contra o biofilme do isolado de *L. monocytogenes* L32, mostraram-se em menores populações de biofilme quando comparadas ao controle positivo de *L. monocytogenes* nas micrografias em MEV. Enquanto na superfície de aço inoxidável, as células de *L. monocytogenes* foram afetadas por conta da estrutura topográfica do material.

Dessa forma, a utilização de LLH20 pode ser uma potencial alternativa para o controle de biofilmes por *L. monocytogenes* em alimentos e equipamentos. No entanto, estudos subsequentes serão necessários para identificar os componentes ativos responsáveis pela ação antilisterial e antibiofilme e aplicá-los isoladamente em planta-piloto de abatedouro de frango.

REFERÊNCIAS

AARNISALO, K. *et al.* Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. **Journal of Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 237-250, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2000.tb00302.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4565.2000.tb00302.x>. Acesso em: 20 dez. 2020.

AARNISALO, K. *et al.* Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **LWT**, v. 40, n. 6, p. 1041-1048, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.07.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643806001964?via%3Di> hub. Acesso em: dez. 2020.

ABEYSUNDARA, P. D. A. *et al.* Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in cantaloupe flesh and peel extracts on four food-contact surfaces at 22 °C and 10 °C. **Food Control**, v. 80, p. 131-142, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.043>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713517302372>. Acesso em: 02 fev. 2021

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 16-23, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61778-X/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61778-X/fulltext). Acesso em: 29 fev. 2021.

ALMEIDA, R. M. de *et al.* Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 21, n. 3, p. 282-289, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.01.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867016302628?via%3Di> hub. Acesso em: 15 jan. 2021.

ANDRADE, J. M. de. **Listeria monocytogenes formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Centro de Morfologia e Fisiologia animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/7200>. Acesso em: 22 jan. 2021.

ANDRADE, N. J. de. **Higiene e sanitização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 2008.

ANDRE, C. *et al.* **Adesão, formação e composição de biofilme por Staphylococcus aureus em poliestireno na presença de nisina**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/6504>. Acesso em: 17 fev. 2021.

ANVISA. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/index.php?option=com_gmg&controller=document&id=454. Acesso em: 27 nov. 2020.

ASAKURA, H. *et al.* Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 94-101, 2012. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.10.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134811003716?via%3Dihub>. Acesso em: 28 abr. 2021.

AUTRET, N. *et al.* Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4463-4471, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.8.4463-4471.2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/10651178_Identification_of_the_agr_Locus_of_Listeria_monocytogenes_Role_in_Bacterial_Virulence. Acesso em: 17 dez. 2020.

AZHAR, N. S.; ZIN, N. H. M.; ABDUL HAMID, T. H. T. Lactococcus lactis strain A5 producing nisin-like bacteriocin active against gram positive and negative bacteria. **Tropical Life Sciences Research**, v. 28, n. 2, p. 107-118, 2017. DOI: 10.21315/tlsr2017.28.2.8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584827/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00150.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2011.00150.x>. Acesso em: 27 jan. 2021.

BAKA, M. *et al.* Critical assessment of the time-to-detection method for accurate estimation of microbial growth parameters. **Journal of Food Safety**, v. 35, n. 2, p. 179-192, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12170>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12170>. Acesso em: 16 mar. 2021.

BARANCELLI, G. V. **Ocorrência e caracterização sorológica e genotípica de *Listeria monocytogenes* em indústrias de queijo do Estado de São Paulo**. 2010. Tese (Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-21022011-104735/pt-br.php>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BARANCELLI, G. V. *et al.* *Listeria Monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011. DOI: 10.1590/1808-1657v78p1552011. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aib/v78n1/1808-1657-aib-78-1-0155.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2021.

BELLÉ, T. H. **Ação de sanitizantes no controle de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* em superfície de polipropileno**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Saúde

Animal, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2020. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/68901>. Acesso em: 18 mar. 2021.

BELTRAME, C. A. *et al.* Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 228-232, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000046>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/fNkTCfrQjRYj6k69ZCfGgzJ/?lang=en>. Acesso em: 11 jan. 2021.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1000-1005, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01330.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2001.01330.x>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BONSAGLIA, E. C. R. *et al.* Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 386-391, 2014. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.07.023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260704580_Production_of_biofilm_by_Listeria_monocytogenes_in_different_materials_and_temperatures. Acesso em: 10 mar. 2021.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* *Listeria monocytogenes* em hortaliças: isolamento e sorotipagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 117-122, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8502>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BRAUGE, T. *et al.* Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 2, p. 1-7, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv229>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/363/2/fnv229/2600009>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BRAUGE, T. *et al.* The absence of N-acetylglucosamine in wall teichoic acids of *Listeria monocytogenes* modifies biofilm architecture and tolerance to rinsing and cleaning procedures. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190879>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190879>. Acesso em: 10 fev. 2021.

BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, n. PB, p. 167-178, 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2014.04.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25500382/>. Acesso em: 11 abr. 2021.

BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>. Acesso

em: 28 nov. 2020.

CAI, Y. *et al.* Lactococcus fujiensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1590-1594, 2011. DOI: 10.1099/ijs.0.67774-0.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/51558322_Lactococcus_fujiensis_sp_nov_a_lactic_acid_bacterium_isolated_from_vegetable_matter. Acesso em: 19 jan. 2021.

CARANDINA, D. C. Avaliação de biofilmes formados por isolados de Listeria monocytogenes provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-19042013-094323/pt-br.php>. Acesso em: 12 mar. 2021.

CARRASCOSA, C. *et al.* Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2606-2616, 1 abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10301>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021600117X>. Acesso em: 12 mar. 2021.

CHANG, Y. *et al.* Identification of genes involved in Listeria monocytogenes biofilm formation by mariner-based transposon mutagenesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2051-2062, 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3719-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120623/>. Acesso em: 19 jan. 2021.

CHARLIER, C. *et al.* Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 510-519, 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28139432/>. Acesso em: 23 jan. 2021.

CHAVANT, P. *et al.* Listeria monocytogenes LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 728-737, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.2.728-737.2002. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/68/2/728>. Acesso em: 28 mar. 2021.

CHEN, Y. S. *et al.* Lactococcus formosensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 146-151, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.052811-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24067730/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

CHEN, Y. S. *et al.* Lactococcus taiwanensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from fresh cummingcordia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, Part 7, p. 2405-2409, 2013. DOI: 10.1099/ijs.0.045757-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23178728/>. Acesso em: 14 mar. 2021.

CHENG, G. *et al.* Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 29, p. 4192-4199, 2007. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17604099/>. Acesso em: 11 jan. 2021.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 11-19, 2006. DOI: 10.1016/j.lwt.2004.10.006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/248558425_A_predictive_model_for_heat_inactivation_of_Listeria_monocytogenes_biofilm_on_buna-N_rubber. Acesso em: 24 jan. 2021.

COSTA, W. A.; VANETTI, M. C. D.; PUSCHMANN, R. Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 785-792, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/dRT9P36wf54XJ5mDS7SnC7S/?lang=pt>. Acesso em: 17 mar. 2021.

CONTRERAS, C. J. C. *et al.* **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. 1. ed. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda., 2002.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1273#citeas>. Acesso em: 21 fev. 2021.

DA COSTA, R. J. *et al.* Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. **Journal of Food Quality**, v. 2019, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2019/4726510/>. Acesso em: 25 mar. 2021.

DABA, G. M.; ELKHATEEB, W. A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101750. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343680116_Bacteriocins_of_lactic_acid_bacteria_as_biotechnological_tools_in_food_and_pharmaceuticals_Current_applications_and_future_prospects. Acesso em: 23 mar. 2021.

DANTAS, S. T. A. **Transferência de Salmonella Enteritidis por contaminação cruzada e formação de biofilme em diferentes superfícies de corte**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110355?locale-attribute=pt_BR. Acesso em: 14 jan. 2021.

DEN BAKKER, H. C. *et al.* Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov, *L.*

aquatica sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov. *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, Part 6, p. 1882-1889, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.052720-0. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260559467_Listeria_floridensis_sp_nov_Listeria_aquatica_sp_nov_Listeria_cornellensis_sp_nov_Listeria_riparia_sp_nov_and_Listeria_grandensis_sp_nov_from_agricultural_and_natural_environments. Acesso em: 23 fev. 2021.

DI BONAVENTURA, G. *et al.* Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1552-1561, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18194252/>. Acesso em: 11 mar. 2021.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12039754/>. Acesso em: 13 fev. 2021.

DOIJAD, S. P. *et al.* Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. 1-14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137046>. Acesso em: 19 jan. 2021.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932229/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

DONS, L. *et al.* Role of flagellin and the two-component cheA/cheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3237-3244, 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3237-3244.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC415653/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

DONS, L.; J.E.OLSEN; O.F.RASMUSSEN. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. **DNA Sequence**, v. 4, n. 5, p. 301-311, 1994. DOI: 10.3109/10425179409020856. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7803815/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

DOUMITH, M. *et al.* Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819-3822, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497638/>. Acesso em: 20 mar. 2021.

EFSA. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 17, n. 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>. Disponível em:

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2019.5926>. Acesso em: 15 maio 2021.

ESPECHE, M. C. *et al.* Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 103-109, 2012. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.01.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22261519/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

FAGERLUND, A.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T. Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 171-178, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799320301053>. Acesso em: 17 maio 2021.

FAN, Y. *et al.* Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. **Food Research International**, v. 137, p. 109405, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109405. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233092/>. Acesso em: 19 dez. 2020.

FERREIRA, A.; O'BYRNE, C. P.; BOOR, K. J. Role of ζ^B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4454-4457, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4454-4457.2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93189/>. Acesso em: 17 dez. 2020.

GANDRA, T. K. V. **Aspectos genéticos envolvidos na formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* avaliados por RT- qPCR em diferentes superfícies, temperaturas e tempos de contato.** 2015. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

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, 2019. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30981136/>. Acesso em: 18 maio 2021.

GAO, Z. *et al.* Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle against *Listeria monocytogenes*. **Industrial Crops and Products**, v. 144, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112036. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/338973606_Chemical_composition_and_anti-biofilm_activity_of_essential_oil_from_Citrus_medica_L_var_sarcodactylis_Swingle_against_Listeria_monocytogenes. Acesso em: 14 abr. 2021.

GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E. *et al.* Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 670-

680, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713507001508?via%3Dihub>. Acesso em: 19 dez. 2020.

GARMYN, D. *et al.* *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent agr regulation and suggests overlaps with other regulons. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043154>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043154>. Acesso em: 10 dez. 2020.

GASPAR, P. *et al.* From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 764-788, 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23567148/>. Acesso em: 19 dez. 2020.

GIAOURIS, E. *et al.* Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 1-14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077276>. Acesso em: 22 dez. 2020.

GIAOURIS, E. *et al.* Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 841, p. 1-26, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00841/full>. Acesso em: 19 jan. 2021.

GRAM, L. *et al.* Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, 2007. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.06.014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/240429802_Influence_of_food_soiling_matrix_on_cleaning_and_disinfection_efficiency_on_surface_attached_Listeria_monocytogenes. Acesso em: 20 jan. 2021.

GUPTA, A. Biofilm quantification and comparative analysis of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) & MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration) value for different antibiotics against *E. coli*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 2, p. 198-224, 2015. Disponível em: <https://www.ijcmas.com/vol-4-2/Ankit%20Gupta.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2020.

HABIMANA, O. *et al.* Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1065-1072, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626124>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22043862/>. Acesso em: 17 dez. 2020.

HALTER, E. L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 63, Part 2, p. 641-647, 2013. DOI: 10.1099/ij.s.0.036830-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544790/>. Acesso em: 28 dez. 2020.

HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA, A. M. *et al.* Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 249-257, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.12.063. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322532395_Probiotic_properties_and_stress_response_of_thermotolerant_lactic_acid_bacteria_isolated_from_cooked_meat_products. Acesso em: 27 fev. 2021.

HEYDORN, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2395-2407, 2000. DOI: 10.1099/00221287-146-10-2395. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11021916/>. Acesso em: 10 dez. 2020.

HOSSAIN, M. I. *et al.* Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. **LWT- Food Science and Technology**, v. 118, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108864. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337396418_Inhibitory_effects_of_probiotic_potential_lactic_acid_bacteria_isolated_from_kimchi_against_Listeria_monocytogenes_biofilm_on_lettuce_stainless-steel_surfaces_and_MBEC_biofilm_device. Acesso em: 18 abr. 2021.

HOSSAIN, M. I.; SADEKUZZAMAN, M.; HA, S. DO. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: a review. **Food Research International**, v. 100, p. 63-73, 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.077. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318854613_Probiotics_as_potential_alternative_biocontrol_agents_in_the_agriculture_and_food_industries_A_review. Acesso em: 12 jan. 2021.

HUANG, Y. *et al.* Comparison of oxidative stress response and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b and 1/2a. **Food Control**, v. 85, p. 416-422, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713517304784>. Acesso em: 25 fev. 2021.

HUANG, Y. T. *et al.* Listeriosis, Taiwan, 1996-2008. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 9, p. 1731-1733, 2011. DOI: 10.3201/eid1709.110093. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322081/>. Acesso em: 19 mar. 2021.

HWANHLEM, N. *et al.* Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in Southern Thailand as potential bio-control agents: purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT₂W₂L. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 5, n. 4, p. 264-278, 2013. DOI: 10.1007/s12602-013-9150-2. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26783072/>. Acesso em: 17 abr. 2021.

IANNETTI, L. *et al.* *Listeria monocytogenes* in poultry: detection and strain characterization along an integrated production chain in Italy. **Food Microbiology**, v. 91, 2020. DOI: 0.1016/j.fm.2020.103533. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002020301222?via%3Dihub>. Acesso em: 24 mar. 2021.

IBUSQUIZA, P. S. **Biofilm formation by *Listeria monocytogenes***: resistance to industrial biocides and cross- response caused by adaptation to benzalkonium chloride. 2011. Tese (Doutorado em Microbiologia alimentar) – Universidade de Vigo, Vigo, 2011. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/36043797.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

IN LEE, S. H. *et al.* Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**, v. 91, p. 88-91, 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.039. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28290331/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

JU, X. *et al.* Effect of the *luxS* gene on biofilm formation and antibiotic resistance by *Salmonella* serovar Dublin. **Food Research International**, v. 107, p. 385-393, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.02.039. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323248799_Effect_of_the_luxS_gene_on_biofilm_formation_and_antibiotic_resistance_by_Salmonella_serovar_Dublin. Acesso em: 10 abr. 2021.

JUNG, S. J.; PARK, S. Y.; HA, S. DO. Synergistic effect of X-ray irradiation and sodium hypochlorite against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilms on quail eggshells. **Food Research International**, v. 107, p. 496-502, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.02.063. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29580512/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

JUODEIKIENE, G. *et al.* Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. **Advances in Applied Biotechnology**, 2012. p. 63-100. DOI: 10.5772/30692. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/221922675_Fermentation_Processes_Using_Lactic_Acid_Bacteria_Producing_Bacteriocins_for_Preservation_and_Improving_Functional_Properties_of_Food_Products. Acesso em: 31 mar. 2021.

KADAM, S. R. *et al.* Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 259-264, 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160513002729?via%3Dihub>. Acesso em: 29 abr. 2021.

KAKTCHAM, P. M. *et al.* Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2MT isolated from freshwater Nile tilapia in Cameroon: bacteriocin screening, characterization, and optimization in a low-cost medium. **LWT - Food Science and**

Technology, v. 107, p. 272-279, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643819301884>. Acesso em: 12 mar. 2021.

KAVITHA, S.; HARIKRISHNAN, A.; JEEVARATNAM, K. Characterization and evaluation of antibacterial efficacy of a novel antibiotic-type compound from a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* KJB23 against food-borne pathogens. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, 2019, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108759>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643819311016?via%3Dihub>. Acesso em: 30 mar. 2021.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences (IJB)**, Bangladesh, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.735.4119&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 10 abr. 2021.

KHAN, F. et al. Contribution of chitooligosaccharides to biofilm formation, antibiotics resistance and disinfectants tolerance of *Listeria monocytogenes*. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, 2019. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103673. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31437576/>. Acesso em 30 abr. 2021.

KLJUJEV, I. et al. *Listeria monocytogenes* – danger for health safety vegetable production. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, n. 3, p. 23-31, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.04.034. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401018301827?via%3Dihub>. Acesso em: 26 fev. 2021.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 47-57, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817303572>. Acesso em: 30 jan. 2021.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. . Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 30 jun. 1998. DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00060-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9706794/>. Acesso em: 25 mar. 2021.

KUSUMANINGRUM, H. . et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 227-236, 25 ago. 2003. DOI: 10.1016/s0168-1605(02)00540-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12878381/>. Acesso em: 16 jan. 2021.

LEMON, K. P.; FREITAG, N. E.; KOLTER, R. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 15, p. 3969-3976, 28 maio 2010. DOI: 10.1128/JB.00179-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916369/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

LEMON, K. P.; HIGGINS, D. E.; KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 12, p. 4418-4424, 6 abr. 2007. DOI: 10.1128/JB.01967-06. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1913361/>. Acesso em: 9 mar. 2021.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 1 fev. 2004. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.004. Disponível em: https://www.academia.edu/17707891/Lactic_acid_bacteria_as_functional_starter_cultures_for_the_food_fermentation_industry. Acesso em: 02 mar. 2021.

LI, R. *et al.* Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterin, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, v. 84, p. 529-535, 2018. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.08.031. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319341410_Control_of_Listeria_monocytogenes_biofilm_by_paenibacterin_a_natural_antimicrobial_lipopeptide. Acesso em: 01 fev. 2021.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 645-659, 01 jun. 2006. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46495-0>. Acesso em: 21 abr. 2021.

LIU, D. *et al.* A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 2, p. 133-140, 2007. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.08.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701207002849?via%3Dihub>. Acesso em: 04 mar. 2021.

LIU, J. *et al.* Identification of *Clostridium butyricum* as the bacteria causing soy sauce explosion and leakage and its control using nisin. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 509-513, 2013. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.05.030. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257399471_Identification_of_Clostridium_butyricum_as_the_bacteria_causing_soy_sauce_explosion_and_leakage_and_its_control_using_nisin. Acesso em: 21 abr. 2021.

LIU, S. *et al.* Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1697-1705, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.4.1697-1705.2002. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/68/4/1697>. Acesso em: 20 jan. 2021.

LIU, Y. *et al.* Effect of four kinds of natural antimicrobial compounds on the biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolated from beef processing plants in China. **LWT - Food Science and Technology**, v. 133, n. 1, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343408407_Effect_of_four_kinds_of_natural_antimicrobial_compounds_on_the_biofilm_formation_ability_of_Listeria_monocytogenes

enes_isolated_from_beef_processing_plants_in_China10.1016/j.lwt.2020.110020. Acesso em: 14 jan. 2021

LOMONACO, S. *et al.* Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese.

International Journal of Food Microbiology, v. 160, n. 1, p. 76-79, 2012.

DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.011. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23141648/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

LOPES, C. S. S. **Levantamento da eficácia dos procedimentos de higienização em uma indústria de alimentos derivados de amendoim**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Qualidade e Segurança de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Santo Antônio da Patrulha, 2018. Disponível em:

https://sistemas.furg.br/sistemas/sab/arquivos/conteudo_digital/f8752d10de4461bff85ae7245c680c85.pdf. Acesso em: 02 fev. 2021.

LUNDÉN, J. **Persistent listeria monocytogenes contamination in food processing plants**. 2004. Tese (Doutorado em Higiene Alimentar e Ambiental) – Universidade de Helsinki, Helsinki, 2004. Disponível em:

<https://helda.helsinki.fi/handle/10138/18947>. Acesso em: 04 abr. 2021.

LUO, Q. *et al.* PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm-forming *Listeria monocytogenes*. **Current Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 372-378, 2013. DOI: 10.1007/s00284-013-0377-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652633/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

MACEDO, A.; ABRAHAM, W.-R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 517-528, 2009.

DOI: 10.2174/157340609790170515. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19534686/>. Acesso em: 02 mar. 2021.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

MARCO, I. de. **Atividade antilisterial de peptídeos sintetizados por lactococcus lactis subsp. hordniae e sua aplicação na bioconservação de alface (lactuca sativa) variedade crespa minimamente processada**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2019.

MARSH, E. J.; LUO, H.; WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, n. 2, p. 203-210, 2003. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00752-3. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/8991313_A_three-tiered_approach_to_differentiate_Listeria_monocytogenes_biofilm-forming_abilities. Acesso em: 03 mar. 2021.

MATA, M. M. *et al.* Attached and planktonic *Listeria monocytogenes* global proteomic

responses and associated influence of strain genetics and temperature. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 2, p. 1161-1173, 2015. DOI: 10.1021/pr501114e. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25516393/>. Acesso em: 09 abr. 2021.

MATTILA, M. *et al.* Role of *flhA* and *motA* in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 177-183, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21683466/>. Acesso em: 09 abr. 2021.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999. DOI: 10.1128/CMR.12.1.147. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88911/>. Acesso em: 21 dez. 2021.

MCLANDSBOROUGH, L. *et al.* Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, v. 1, n. 2, p. 94-114, 2006. DOI: 10.1007/s11483-005-9004-x. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/227287445_Biofilms_At_the_Interface_between_Biophysics_and_Microbiology. Acesso em: 02 dez. 2021.

MERINO, L. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, v. 119, 2017, p. 530-540, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30884686/>. Acesso em: 02 dez. 2021.

MICHAEL DUNNE JR., W. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118072/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

MILLEZI, F. M. *et al.* Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 32, n. 3, p. 351-359, 02 jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00387.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4565.2012.00387.x>. Acesso em: 20 jan. 2021.

MILOHANIC, E. *et al.* Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1613-1625, 05 mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03413.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2003.03413.x>. Acesso em: 28 dez. 2020.

MIYANO, N.; OIE, S.; KAMIYA, A. Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 671-674, 2003. DOI: 10.1248/bpb.26.671. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/26/5/26_5_671/_article/-char/en. Acesso em: 02 fev. 2021.

MORITA, H. *et al.* *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy

infant faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2610-2615, 2011a. DOI: 10.1099/ijso.0.024521-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148680/>. Acesso em: 28 fev. 2021.

MORITA, Y. *et al.* Survival of biofilm-forming *Salmonella* on stainless steel bolt threads under dry conditions. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 52, n. 5, p. 299-303, 2011b. DOI: 10.3358/shokueishi.52.299. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22200749/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

MOSQUERA-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 182-183, p. 26-36, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24858448/>. Acesso em: 19 mar. 2021.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, p. 407-439, 1926. DOI: 10.1002/path.1700290409. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/229781295_A_disease_of_rabbits_characterised_by_a_large_mononuclear_leucocytosis_caused_by_a_hitherto_undescribed_bacillus_Bacterium_monocytogenes_nsp. Acesso em: 10 maio 2021.

NATIONAL center for biotechnology information – NCBI. Taxonomy *Listeria*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1637>. Acesso em: 29 nov. 2020.

NIKOLAEV, I. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm -"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Mikrobiologiya**, v. 76, n. 2, p. 149-163, 2007.

NING, Y. *et al.* Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms. **Food Chemistry**, v. 228, p. 533-540, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28317760/>. Acesso em: 20 fev. 2021.

NOWAK, J. *et al.* Biofilm formation of the *L. monocytogenes* strain 15G01 is influenced by changes in environmental conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 189-195, 2015. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.10.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26524221/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

OBŁĄK, E. *et al.* Activity of gemini quaternary ammonium salts against microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 625-632, 2019. DOI: 10.1007/s00253-018-9523-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460534/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

OLIVEIRA, M. M. M. de *et al.* Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 97-106, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100016>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjm/a/fmZYXNL4nS5md8M6cpDsrWp/?lang=en>. Acesso em: 14 fev. 2021.

PASPALIARI, D. K. *et al.* Chitinase expression in *Listeria monocytogenes* is positively regulated by the Agr system. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095385>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095385>. Acesso em: 22 mar. 2021.

PÉREZ IBARRECHE, M.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 295-303, 2014. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.07.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23933630/>. Acesso em: 23 fev. 2021.

PÉREZ, T. *et al.* *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, Part 8, p. 1894-1898, 2011. DOI: 10.1099/ijs.0.023945-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833888/>. Acesso em: 02 jan. 2021.

PIETA, L. *et al.* Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1707-1714, 2014. DOI: 10.1007/s13213-014-0814-2. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260526936_Transcriptional_analysis_of_genes_related_to_biofilm_formation_stress-response_and_virulence_in_Listeria_monocytogenes_strains_grown_at_different_temperatures. Acesso em: 18 fev. 2021.

PILCHOVÁ, T. *et al.* Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 366-372, 2014. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.07.021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/270915359_Influence_of_food_processing_environments_on_structure_initiation_of_static_biofilm_of_Listeria_monocytogenes. Acesso em: 18 jan. 2021.

RAMIRES, T. *et al.* Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. **Food Research International**, v. 140, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109871. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33648189/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

RANDAZZO, C. L. *et al.* Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. **Food Control**, v. 20, p. 756-763, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713508002624>. Acesso em: 19 abr. 2021.

REIS-TEIXEIRA, F. B. DOS; ALVES, V. F.; DE MARTINIS, E. C. P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 587-591, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/5jv8krbwGFDKTgGVNPvDk8F/?lang=en>. Acesso em: 10 jan. 2021.

RIEDEL, C. U. *et al.* AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1177-1189, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06589.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19154329/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

RIEU, A. *et al.* agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6125-6133, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00608-07. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2075002/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

RIPOLLES-AVILA, C. *et al.* New approach for the removal of mature biofilms formed by wild strains of *Listeria monocytogenes* isolated from food contact surfaces in an Iberian pig processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 323, p. 108595, 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108595. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32224347/>. Acesso em: 15 mar. 2021.

ROCHA, Matheus. **Não me julgue pela capa**: inseguranças de um ansioso. São Paulo: Planeta, 2019.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P.; CABO, M. L. Tolerance development in *Listeria monocytogenes*-*Escherichia coli* dual-species biofilms after sublethal exposures to pronase-benzalkonium chloride combined treatments. **Food Microbiology**, v. 67, p. 58-66, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002016311030>. Acesso em: 29 jan. 2021.

ROSSONI, E. M. ; GAYLARDE, C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 1 out. 2000. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00369-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11028962/>. Acesso em: 16 abr. 2021.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x>. Acesso em: 22 mar. 2021.

SCHÄFER, D. F. *et al.* Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 393-398, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817305947>. Acesso em: 10 abr. 2021.

SCHERBA, G.; WEIGEL, R. M.; O'BRIEN, W. D. Quantitative assessment of the

germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2079-2084, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183525/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

SCHLECH, W. F. *et al.* Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 4, p. 203-206, 1983. DOI: 10.1056/NEJM198301273080407. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6401354/>. Acesso em: 23 jan. 2021.

SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. **Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 65-72, 1 ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002013000282>. Acesso em: 02 maio 2021.

SHEEHAN, B. *et al.* Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6469-6476, 1995. DOI: 10.1128/jb.177.22.6469-6476.1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7592422/>. Acesso em: 14 dez. 2021.

SILVA, D. A. L. *et al.* *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to food-contact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 2, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12313>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfs.12313>. Acesso em: 20 jan. 2021.

SILVA, F. C. *et al.* DE A. Influência de agentes desinfetantes sobre a aderência de *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável. *Brazilian Dental Science*, v. 11, n. 3, p. 60-65, 2008. DOI: <https://doi.org/10.14295/bds.2008.v11i3.509>. Disponível em: <https://bds.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/509>. Acesso em: 03 fev. 2021.

SIMÕES, M. *et al.* Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioprocess Processing**, v. 84, n. C4, p. 338-345, 2006. DOI: 10.1205/fbp06022. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/55607099.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0339>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002000903393>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SONZA, E. Microbiota de alface (*Lactuca sativa*) variedade: caracterização e identificação de bactérias resistentes aos sanitizantes clorados utilizando o sequenciamento de novas gerações – NGS. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2018.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. DO. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713512006536>. Acesso em: 12 jan. 2021.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 1 abr. 2000. DOI: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10699673/>. Acesso em: 19 jan. 2021.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15059216/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12142477/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

TADIELO, L. E. **Dinâmica da formação de biofilmes puros e mistos de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* em superfície de polipropileno.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná, Pelotina, 2020. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/handle/1884/67172>. Acesso em: 15 fev. 2021.

TAYLOR, B. J.; QUINN, A. R.; KATAOKA, A. *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods and ingredients. **Food Control**, v. 103, p. 153-160, 1 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713519301586>. Acesso em: 13 mar. 2021.

TIENSUU, T. *et al.* Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing *Listeria monocytogenes* to transition from a saprophyte to a killer. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 8, p. 819-833, 2019. DOI: 10.1099/mic.0.000808. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31107205/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

TODOROV, S. D. *et al.* Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - From isolation to application: characterization of a bacteriocin. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1351-1363, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.01.027. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/251629326_Bacteriocinogenic_Lactobacillus_plantarum_ST16Pa_isolated_from_papaya_Carica_papaya_-_From_isolation_to_application_Characterization_of_a_bacteriocin. Acesso em: 15 mar. 2021.

TRAVIER, L. *et al.* ActA Promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003131>. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003131>. Acesso em: 15 jan. 2021.

TRAVIER, L.; LECUIT, M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a “classic” virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 53-60, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527413002294>. Acesso em: 10 maio 2021.

TRÉMOULET, F. *et al.* Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, n. 1, p. 25-31, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11155.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12023073/>. Acesso em 23 jan. 2021.

TRIAS, R. *et al.* Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 91-98, 2008. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/5225890_Bioprotective_Leuconostoc_strains_against_Listeria_monocytogenes_in_fresh_fruits_and_vegetables. Acesso em: 19 abr. 2021.

VAZQUEZ-ARMENTA, F. J. *et al.* Quercetin repressed the stress response factor (sigB) and virulence genes (prfA, actA, inlA, and inlC), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 87, 2019, p. 103377, 2020. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103377. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31948618/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

VESTERLUND, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. **Microbiology**, v. 152, n. 6, p. 1819-1826, 2006. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28522-0?crawler=true>. Acesso em: 02 dez. 2020.

VIVIAN, R. Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola. 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/11449/110628/1/000788531.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2020.

VOLOKHOV, D. V. *et al.* *Lactobacillus brantae* sp. nov., isolated from faeces of Canada geese (*Branta Canadensis*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2068-2076, 2012. DOI: 10.1099/ij.s.0.033852-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22021580/>. Acesso em: 22 dez. 2021.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000. DOI: 10.1128/jb.182.10.2675-2679.2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101960/>. Acesso em: 19 dez. 2021.

WAY, S. S. *et al.* Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 235-242, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2004.00360.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1462-5822.2004.00360.x>. Acesso em: 13 mar. 2021.

WEBBER, B. **Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella Enteritidis* sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção**. 2015. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/1442>. Acesso em: 01 dez. 2021.

WEI, H.; WOLF, G.; HAMMES, W. P. Indigenous microorganisms from iceberg lettuce with adherence and antagonistic potential for use as protective culture. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, n. 4, p. 294-301, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.02.002>. Acesso em: 16 dez. 2021.

WELLER, D. *et al.* *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 286-292, 2015. DOI: 10.1099/ijs.0.070839-0. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267326516_Listeria_booriae_sp_nov_and_Listeria_newyorkensis_sp_nov_from_food_processing_environments_in_the_USA. Acesso em: 14 abr. 2021.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. **Food Microbiology**, v. 64, p. 164-171, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002016306827>. Acesso em: 04 mar. 2021.

WINKELSTRÖTER, L. K. *et al.* Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 35-46, 2014. DOI: 10.1007/s00248-013-0347-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24370864/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

WINKELSTRÖTER, L. K.; TULINI, F. L.; DE MARTINIS, E. C. P. Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 586-592, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643815004417>. Acesso em: 10 jan. 2021.

WOO, J.; AHN, J. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 307-313, 2013. DOI: 10.1111/lam.12051. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/lam.12051>. Acesso em:

24 jan. 2021.

XU, Y. *et al.* Enhanced biofilm formation in dual-species culture of *Listeria monocytogenes* and *Ralstonia insidiosa*. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 774–783, 2017. DOI: 10.3934/microbiol.2017.4.774. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6604966/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 124-134, 2019. DOI: 10.3168/jds.2018-14983. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(18\)31012-9/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(18)31012-9/pdf). Acesso em: 09 dez. 2021.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 554-559, 2010. DOI: 10.1007/s00284-010-9652-z. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/43346380_Biosurfactants_as_Agents_to_Reduce_Adhesion_of_Pathogenic_Bacteria_to_Polystyrene_Surfaces_Effect_of_Temperature_and_Hydrophobicity. Acesso em: 01 mar. 2021.

ZETZMANN, M. *et al.* Characterization of the biofilm phenotype of a *Listeria monocytogenes* mutant deficient in agr peptide sensing. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 9, p. 1-9, 2019. DOI: 10.1002/mbo3.826. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6741131/>. Acesso em: 02 fev. 2021.

ZHANG, H. *et al.* Stress resistance, motility and biofilm formation mediated by a 25kb plasmid pLMSZ08 in *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 94, n. July, p. 345-352, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713518303311>. Acesso em: 02 fev. 2021.

ZHOU, Q. *et al.* Virulence regulator PrfA is essential for biofilm formation in *Listeria monocytogenes* but not in *Listeria innocua*. **Current Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 186-192, 2011. DOI: 10.1007/s00284-011-9964-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21656247/>. Acesso em: 10 abr. 2021.

ZIECH, R. E. **Caracterização de Salmonella sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37368?show=full>. Acesso em: 26 mar. 2021.

ANEXO A – FICHA TÉCNICA ÁCIDO PERACÉTICO



ECOPER QUÍMICA LTDA
Rua Orazio Stanco, 520 – Pq. dos Eucaliptos – Pólo Industrial
CEP 07832-040 - Franco da Rocha - SP
Vendas: Fone: (11) **4997- 8300** / Fone/Fax: (11) **4997- 8666**
E-mail: vendas@ecoper.com.br - ecoper@ecoper.com.br

PERACETIC P - 170		BOLETIM TÉCNICO
Ácido Peracético 17%		BT PERACETIC P170 25112016
UN 3109 Classe 5.2		Registro Anvisa:
Validade: 18 meses após data Fab.		MS: 32154.0005.001-0

PROPRIEDADES

Produto líquido, incolor, constituído de mistura equilibrada de Ácido Peracético, Peróxido de Hidrogênio, Ácido Acético e veículo estabilizado.
Desinfetante de uso profissional especialmente desenvolvido para utilização em indústrias de lavanderias, papel celulose, têxtil, laticínios, bebidas e alimentícia em geral, não formando compostos tóxicos e não deixando resíduos.

PROPRIEDADES FÍSICAS

Aspecto	Líquido Límpido Incolor
Odor	Avinagrado
Ácido Peracético	Mín. 17,0 % em peso
Peroxido de Hidrogênio	Max. 28,5 % em peso
Densidade à 20 °C	1,16 g/cm ³
pH produto puro	< 1,5
Temperatura recomendada para estocagem	Max. 35 °C
Solubilidade	Totalmente miscível com água
Temperatura de transporte	Max. 35 °C

APLICAÇÃO

O Peracetic P-170 é um desinfetante que pode ser usado manualmente, por fricção úmida, imersão ou lavagem, com objetivo de desinfecção de superfícies, tubulações, tanques, tachos, painéis, e equipamentos especiais, tais como: ordenhadeiras, enchedoras de garrafas, planetárias, processadoras, e demais matérias cujas superfícies sejam de plásticos ou Inox. Sua rápida atuação faz dele um agente ideal para desinfecção em tempos curtos, de 10 a 30 minutos em temperatura ambiente ou até 40°C de acordo com a necessidade sem qualquer ataque por corrosão e sem formação de espuma.

As dosagens de ácido peracético variam de acordo com a finalidade sendo aplicado de 0,03% a 0,3% (300 ppm a 3000 ppm) Para obter uma solução na concentração de 300ppm ou 0,03% deve-se adicionar 1 litro de Peracetic P-170 em 560 litros de água .

Agente auxiliar de controle de desinfecção destinado ao tratamento de sistemas de águas de indústrias de papel, onde a contaminação bacteriológica das mesmas pode afetar diversos itens, tais como qualidade de ambiente e tempo de re-uso de água.

O Peracetic P-170 é recomendado sua aplicação sempre feito no ponto mais distante das dosagens de materiais alcalinos e sulfetos.

A **ECOPER** está à disposição para orientações na utilização do Peracetic P-170. Consulte-nos

ANEXO B – FICHA TÉCNICA QUATERNÁRIO DE AMÔNIO



Divosan G-5

Desinfetante à base de quaternário de amônio de 5ª geração

Finalidade de Uso

Divosan G-5 é um desinfetante à base de quaternário de amônio de quinta geração, próprio para aplicação em diferentes tipos de superfícies encontradas em frigoríficos, laticínios e indústrias alimentícias e de bebidas em geral.

Características / Benefícios

- Quaternário de amônio de 5ª geração: ampla ação biocida contra bactérias gram positivas e gram negativas, incluindo espécies de pseudomonas, bolores e leveduras.
- Desodorizante: eliminação de odores causados por microrganismos proliferados e alimentos deteriorados em ralos, calhas e no ambiente.
- Versátil: desinfetante terminal de superfícies pelos métodos de imersão, pulverização e nebulização.
- Estável: princípio ativo de caráter não volátil e não degradável por matéria orgânica; ideal para desinfecção de botas.
- Seguro: seguro aos funcionários e a qualquer superfície metálica, plástica e demais revestimentos, sem risco de corrosão ou ressecamento, bem como danos à saúde desde que obedecidas as recomendações de uso contidas no rótulo.

Considerações Técnicas

Divosan G-5 é um poderoso desinfetante cuja ação biocida provém da sinergia entre misturas de compostos de quaternários de amônio de cadeia dupla, que fornecem ação biocida superior contra um largo espectro de microrganismos, tais como: bactérias, fungos, vírus, e algas.

Divosan G-5 é indicado para a desinfecção de equipamentos abertos e superfícies em geral por pulverização, de peças e utensílios por imersão, de ralos, botas e calhas por aplicação de solução e desinfecção de ambiente por nebulização.

Modo de Usar

Para manutenção diária da desinfecção, Divosan G-5 deve ser aplicado após o procedimento de limpeza, à concentração mínima de 0,45% p/v, à temperatura ambiente, permanecendo em contato com a superfície pelo tempo mínimo de 10 minutos. Deve ser aplicado em equipamentos e superfícies, peças e utensílios por pulverização e imersão.

Para desinfecção de ambientes, antes de iniciar o procedimento, certificar-se de que nenhuma superfície é incompatível com a solução desinfetante e de que a área está desocupada. Utilizar obrigatoriamente todos os EPI's, a proteção respiratória deve contemplar uma máscara facial com cartucho para gases ácidos. Nebulizar Divosan G-5 utilizando o equipamento fog gun da Diversey, na concentração de 0,45% (p/v), durante 15-30 minutos, e preferencialmente em ambientes com temperatura superior à 10°C, após aplicação a área deve permanecer vazia por 1 - 2 horas.

Para desinfecção de botas, recomendamos a diluição do Divosan G-5 à concentração de 0,45 % p/v e tempo de contato de 10 minutos. A solução deve ser trocada a cada 6 horas.