UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SAMUEL FERREIRA GONÇALVES

Aplicação de combinações enzima-sanitizante contra biofilmes de *Staphyloccocus aureus*

Pirassununga
2021

SAMUEL FERREIRA GONÇALVES

Aplicação de combinações enzima-sanitizante contra biofilmes de *Staphyloccocus aureus*

(Versão Corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Mestrado em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G635a

Gonçalves, Samuel Ferreira
Aplicação de combinações enzima-sanitizante contra biofilmes de Staphyloccocus aureus / Samuel Ferreira Gonçalves ; orientador Carlos Augusto Fernandes de Oliveira. -- Pirassununga, 2021.
50 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Staphylococcus aureus. 2. Adesão bacteriana. 3. Hipoclorito de Sódio . 4. Ácido Peracético. 5. Alfa-amilase. I. de Oliveira, Carlos Augusto Fernandes, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

SAMUEL FERREIRA GONÇALVES

Aplicação de combinações enzima-sanitizante contra biofilmes de *Staphyloccocus aureus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data da Aprovação:___/___/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr._____

Instituição_____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição_____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição_____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição_____

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu infinito amor e por me manter perseverante para a conclusão de mais um sonho. Obrigado Sua infinita misericórdia e ter colocado pessoas tão especiais durante essa trajetória.

A toda minha família, em especial a minha querida mãe, Jizel, que sempre me apoiou e ensinou a persistir na caminhada em busca de cada sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela orientação, ensinamentos e paciência durante o mestrado.

A Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, por ter sido uma segunda casa durante dois anos e ter me proporcionado tantos momentos de aprendizados e alegrias. Por ter me proporcionado a experiência de conhecer pessoas que se tornaram amigas durante todo esse percurso, Elizangela, Jéssica e Vinicius, que possibilitaram essa caminhada ser leve.

Ao laboratório de Microbiologia e Micotoxologia de Alimentos – LMMA/FZEA-USP, em especial a Sarah e Roice pelo auxilio durante todo o experimento.

Aos meus amigos que a vida me proporcionou, Eduardo, Hanna e Yhago pelo incentivo e apoio durante toda esta trajetória, obrigado se fazerem presente durante o percurso, obrigado pelos conselhos e incentivos.

A Marta, amiga especial, que durante o mestrado foi uma base sólida e sempre esteve ao meu lado, obrigado pela ajuda durante a execução do estudo, por tornar essa trajetória leve e divertida, pelos conselhos e me fazer acreditar no meu potencial.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxilio financeiro na concessão da bolsa – código de financiamento 001.

RESUMO

GONÇALVES, S.F. **Aplicação de combinações enzima-sanitizante contra biofilmes de *Staphyloccocus aureus*.** 2021. 50f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do hipoclorito de sódio (HS, 0,5%, v/v), ácido peracético (APA, 0,3%, v/v) e alfa-amilase (100 mg/mL, v/v), isolados ou em combinação, sobre biofilmes mono-espécies de *Staphylococcus aureus* (P01F2T1, P01FTT2, P16 e P24) isolados de fazenda leiteira localizada no estado de São Paulo, Brasil. Os ensaios de índice de formação de biofilmes (IFB) e contagem de células cultiváveis foram realizados em microplacas de poliestireno em condições experimentais por 72 horas a 25ºC. O IFB dos isolados P16 e P24 diminuiu significativamente (P <0,05) após o tratamento com APA ou HS combinado com AA, em comparação com os sanitizantes isolados. Os biofilmes formados pelos isolados P01F2T1 e P01F5T2 apresentaram menores valores de IFB (P <0,05) após o tratamento com as combinações de APA+ AA e HS + AA, respectivamente. No entanto, reduções significativas nas contagens de biofilme cultiváveis foram observadas apenas para os isolados P01F2T1 tratados com HS + AA e APA + AA, P01F5T2 tratado com HS + AA e P24 tratado com APA + AA. Mais estudos são necessários para definir as melhores combinações de AA e HS ou APA para remover completamente os biofilmes de *S. aureu*s formados em superfícies de plástico em ambientes de processamento de laticínios.

Palavras-chave: *S. aureus*. Adesão Bacteriana. Ácido Peracético. Hipoclorito de Sódio. Alfa-amilase.

ABSTRACT

GONÇALVES, S.F. **Application of enzyme-disinfectant combinations against *Staphyloccocus aureus* biofilms**. 2021. 50f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

This work aimed to evaluate the effect of alpha-amylase (AA, 100 mg/mL), sodium hypochlorite (SH,0.5%), peracetic acid (PAA, 0.3%), and enzyme-biocide combinations (SH or PAA and AA) on mono-species biofilms formed by four *Staphylococcus aureus* strains (P01F2T1, P01F5T2, P16 and P24) previously isolated from dairy farms in São Paulo state, Brazil. Biofilm formation index (BFI) and culturable cell counts were evaluated for biofilms formed on polystyrene microplates for 72 h at 25ºC. The BFI of isolates P16 and P24 significantly decreased ($P < 0.05$) after treatment with PAA or SH combined with AA, compared with the biocides alone. The biofilms formed by isolates P01F2T1 and P01F5T2 had lower BFI values ($P<0.05$) after treatment with combinations of PAA + AA and SH +AA, respectively. However, significant reductions in the biofilm culturable counts were observed only for isolates P01F2T1 treated with HS + AA and PAA + AA, P01F5T2 treated with HS + AA, and P24 treated with PAA + AA. Further studies are required to define the best combinations of AA and SH or PAA to completely remove S. aureus biofilms formed on plastic surfaces in processing dairy environments.

Keywords: S. aureus. Bacterial Adhesion. Peracetic Acid. Sodium Hypochlorite. Alpha-amylase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **9**

REFERÊNCIAS **11**

2.ABORDAGENS BASEADAS EM ENZIMAS PARA CONTROLA BIOFILMES MICROBIANOS EM AMBIENTES DE PROCESSAMENTODE LEITE: UMA REVISÃO DE LITERATURA **14**

RESUMO **14**

ABSTRACT **15**

2.1 INTRODUÇÃO **16**

2.2 FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO BIOFILME **20**

2.3 ABORDAGENS BASEADAS EM ENZIMAS PARA REMOÇÃO DEBIOFILMES.22

CONCLUSÃO **27**

REFERÊNCIAS **28**

3.EFEITOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DE ALFA-AMILASE E SANITIZANTES SOBRE BIOFILMES DE *STAPHYLOCCOCUS AUREUS* ISOLADOS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS BRASILEIRAS **34**

RESUMO **34**

ABSTRACT **35**

3.1 INTRODUÇÃO **36**

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS **37**

3.2.1 Isolados de S. aureus 37

3.2.2 Efeito de biocidas e alfa-amilase em biofilmes formados em microplacas de poliestireno 38

3.2.3 Análise Estatística 39

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO **40**

CONCLUSÃO **46**

REFERÊNCIAS **47**

1. INTRODUÇÃO

Superfícies que entram em contato com alimentos são considerados fontes importantes para a veiculação de microrganismos patogênicos ou deteriorantes em locais de processamentos de alimentos (SOUZA et al., 2014). Nesse contexto, indústria do leite pode apresentar riscos de contaminações, pois o leite cru é considerado meio de cultura ideal para os microrganismos patogênicos. O leite possui compostos como vitaminas, minerais e cálcio, os quais podem deixar resíduos em diversos materiais, influenciando diretamente a multiplicação microbiana no ambiente, tais como na superfície de tanques de armazenamento, tubulações e ambientes processadores do leite, potencializando possíveis riscos à Saúde Pública (MAHDI et al., 2009; MARCHAND et al., 2012; MIGUEL et al., 2014).

Existe uma tendência natural para a sobrevivência das bactérias em um ambiente inóspito através da fixação e adesão em superfícies (KHELISSA et al., 2017; SIMÕES, SIMÕES, VIEIRA, 2010), tais como aço inox, poliestireno, polipropileno e vidro, constituindo comunidades complexas denominadas biofilmes (KIM et al., 2017; LEE et al., 2012). Biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos agregados, de vida microbiana séssil (OLIVEIRA, BRUGNETRA, PICCOLI, 2010), com capacidade de adesão a uma superfície sólida e produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Estas substâncias contêm em sua matriz compostos como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios e DNA extracelular (eDNA) (BOELS, CLARISSE, FAILLE, 2010; VAN HOUDT, MICHIELS, 2010; FULAZ et al., 2019), representando cerca de 90% da biomassa do biofilme, conferindo proteção ao mesmo (KOSTAKIOTI, HADJIFRANGISKOU, HULTGREN, 2013). Entre as principais espécies de microrganismos capazes de produzir biofilmes, e de interesse para a indústria de alimentos, encontram-se o *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* (GAILÉ et al., 2018).

S. aureus é uma bactéria esférica Gram positiva, aeróbica facultativa e positiva nos testes de coagulase e catalase (ABRIL et al., 2020). É considerada uma bactéria oportunista e patogênica, causando doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em humanos (GUTIÉRREZ et al., 2012), levando a quadro de vômitos e náuseas quando ingeridos alimentos contaminados por esse microrganismo (KADARIYA et al., 2014; ROSEGREN et al., 2010). *S. aureus* é um microrganismo de interesse para toda a cadeia produtora de leite, visto que a contaminação começa desde o animal infectado

com mastite clínica ou subclínica (THIRAN et al., 2018) até o processamento em laticínios, contaminando superfícies e equipamentos processadores do leite e seus derivados (KUMMEL et al., 2016). De maneira a evitar biofilmes aderidos em superfícies e outras instalações, procedimentos tais como a limpeza no local (cleaning-in-place, CIP) são necessários para a remoção de células planctónicas do ambiente (KUMARI, SAKAR, 2014). O hipoclorito de sódio (HS, NaOCl) é um dos sanitizantes mais empregados na indústria de alimentos, por possuir rápida ação e fácil aplicação (RUI et al., 2010). HS é um agente sanitizante relatado na literatura com potencial efeito antimicrobiano frente a biofilmes de *S. aureus* (SREY, JAHID, HA, 2013). O ácido peracético (APA, C2H4O3) é outro sanitizante empregado em indústrias de alimentos, sobretudo de leite e derivados, devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (LEE et al., 2016) O APA ainda possui vantagens em sua decomposição em resíduos não tóxicos e ecologicamente corretos, produzindo ácido acético e oxigênio em sua decomposição, evitando danos ambientais (MACHADO et al., 2010; PARK et al., 2014).

A utilização de solução de enzimas junto aos sanitizantes comerciais tem se tornado uma alternativa para complementar a higienização de superfícies (TANG et al., 2018). O uso de enzimas tem como principal objetivo a degradação da matriz de biofilme, ou seja, o SPE (LEQUETTE et al., 2010; MOLOBELA, CLOETE, BEUKES, 2010). Certas enzimas são capazes de degradar os componentes estruturais do biofilme, podendo assim serem removidos por ação mecânica durante o processo de higienização industrial (BOELS, 2011). Entre as principais enzimas de interesse comercial, destacam-se as proteases, glicosidades e DNAses (AUGUSTIN et al., 2004; SAGGU et al., 2019). A alfa-amilase (α-1,4-glucan-4-glucano-hidrolase) é uma enzima de degradação do amido que é produzida por quase todos os organismos vivos, sendo capaz de hidrolisar ligações α-1,4-glicosídicas para produção de açúcares fermentáveis, produzindo glicose e maltose (SUNDARRAM, MARTHY, 2014; MELNICHUK et al., 2020). Craigen et al. (2011) descreveram a potencialidade da utilização da alfa-amilase frente a biofilmes de *S. aureus* formados durante 18h, no qual os autores observaram redução de 79% da massa de biofilme. Estes dados ressaltam o potencial da alfa-amilase frente a microrganismos patogênicos, incluindo sua possível associação com sanitizantes comerciais. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliaro efeito do HS, APA e da alfa-amilase, além de combinações enzima-sanitizante, sobre biofilmes produzidos em microplacas de poliestireno por cepas de *S. aureus* isoladas de fazendas produtoras de leite.

REFERÊNCIAS

ABRIL, A.G. et al. ***Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis**. Toxins, v.12, p.1-18, 2020.

AUGUSTIN, M.; ALI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. **Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms**. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.7, p.55–64, 2004.

CRAIGEN, B.; DASHIFF, A.; KADOURI, D.E. The **Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms**. The Open Microbiology Journal, v.5, p.21-31, 2011.

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

FULAZ, S. et al. **Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix**. Trends in Microbiology, v.27, p.915-926, 2019.

GUTIÉRREZ, D. et al. **Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated Bacterial Communities on Food Industry Surfaces**. Applied and Environmental Microbiology, v.78, p.8547–8554, 2012.

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, p.259–264, 2013.

KADARIYA, J.; SMITH, T.C.; THAPALIYA, D. ***Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health**. BioMed Research International, 2014.

KHELISSA, S.O et al. **Effect of incubation duration, growth temperature, and abiotic surfasse type on cell surfasse properties, adhesion and pathogenicity of bioflm-detached *Staphylococcus aureus* cells**. AMB Express, v.7, p.1-13, 2013.

KIM, C.Y. et al. **Resistance of *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces with different surface characteristics to chemical sanitizers**. Journal of Food Safety, 2017.

KOOHY, H., DOWN, T.A., HUBBARD, T.J. **Chromatin accessibility data sets show bias due to sequence specificity of the DNAse I enzyme**. PLoS One, v.8, p.1–9, 2013.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S.J.**Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era**. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v.3, p.1-23, 2013.

KUMARI, S.; SARKAR, P.K. **In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology**. Food Control, v.36, p.153–158, 2014.

KÜMMEL, J. et al. ***Staphylococcus aureus* Entrance into the Dairy Chain: Tracking S. aureus from Dairy Cow to Cheese**. Frontiers in Microbiology, v.7, p.1-12, 2016.

LEE, S.H.I. et al. **Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants**. Journal of Dairy Science, v.99, p.2384– 2390, 2016.

LIM, E.S.et al. **Bio-enzymes for inhibition and elimination of Escherichia coli O157:H7 bioflm and their synergistic effect with sodium hypochlorite**. Scientific Reports, v.9, p.9920, 2019.

MAHDI, Y., MOUHEB, A., OUFER, L. **A dynamic model for milk fouling in a plate heat exchanger**. Applied Mathematical Modelling, v.33, p.648-662, 2009.

MARCHAND, S. et al. **Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v.11, p.133–147,2012.

MELNICHUK, N. et al. **Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from 25 *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation**. Waste Management, v.106, p.155-161, 2020.

MIGUEL, E.M. et al. **Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.69, p.53-63,2014.

MOLOBELA, I.P.; CLOETE, T.E.; BEUKES, M. **Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bactéria**. African Journal of Microbiology Research, v.4, p.1515-1524, 2010.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNETRA, D.F.; PICCOLI, R.H**. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.69, p.277-284, 2010.

PARK, E. et al. **Efficiency of peracetic acid in inactivating bacteria, viruses, and spores in water determined with ATP bioluminescence, quantitative PCR, and culture-based methods**. Journal of Water and Health, v.12, p.13– 23, 2014.

ROSEGREN, A. et al. **Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies**. International Journal of Food Microbiology, v.144, p.263–269, 2010.

RUI, B.R.et al. **Principais métodos de desinfecção e desinfectantes utilizados na avicultura: Revisão de literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 2011.

SADEKUZZAMAN, M. et al. **Current and recente advanced strategies for combating biofilms**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v.14, p.491–509, 2015.

SAGGU, S.et al. **Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from *Microbacterium* sp.Sks10**.Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v.7, p.1-13, 2019.

SIMÕES, M.; SIMÕES, M.L.; VIEIRA, M.J. **A review of current and emergent biofilm control strategies**. LWT - Food Science and Technology, v.43, p.573-583, 2010.

SOUZA, E.L. et al. **Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers**. Brazilian Journal of Microbiology, v.45, p.67-75, 2014.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. **Biofilm formation in food industries: A food safety concern**. Food Control, v.31, p.572–585, 2013.

SUNDARRAM, A., MURTHY, T.P.K. ***α*-Amylase production and applications: a review**. Journal of Applied and Environmental Microbiology, v.2, p.166–175, 2014.

THIRAN E. et al. **Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes**. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.1000-1012, 2018.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. **Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface**. Journal of Applied Microbiology, v.109, p.1117–1131, 2010.

2. ABORDAGENS BASEADAS EM ENZIMAS PARA CONTROLA BIOFILMES MICROBIANOS EM AMBIENTES DE PROCESSAMENTODE LEITE: UMA REVISÃO DE LITERATURA

(Artigo publicado na revista *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*)

RESUMO

Nesta revisão, são apresentados a formação de biofilmes e os dados disponíveis sobre preparações baseadas em enzimas para o controle de biofilmes microbianos em ambientes de processamento de laticínios. Biofilmes maduros, especialmente aqueles formados por bactérias patogênicas, têm maior resistência aos biocidas, enfatizando a importância de procedimentos higiênicos rigorosos. Proteases, amilases, celulases e DNAses estão entre as enzimas mais recentemente estudadas que podem estar associadas aos principais biocidas usados na indústria de laticínios para aumentar o efeito de remoção de biofilme. No entanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para selecionar as melhores combinações de custo-benefício de enzimas e biocidas selecionados para remover biofilmes de forma eficiente em ambientes de processamento de laticínios.

Keywords: Biofilme; Preparações à base de enzimas; Higiene industrial; Contaminação de superfície.

ABSTRACT

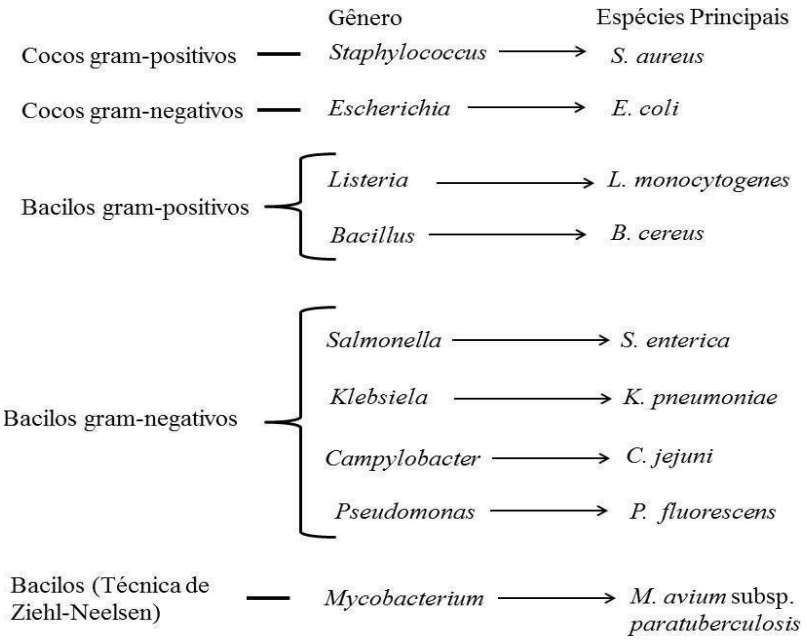
In this review, formation of biofilms and the available data on enzyme-based preparations to control microbial biofilms in dairy processing environments are presented. Mature biofilms, especially those formed by pathogenic bacteria, have increased resistance to biocides, hence stressing the importance of stringent hygienic procedures. Proteases, amylases, cellulases and DNAses are among the most recently studied enzymes that could be associated with the main biocides used in the dairy industry to increase the effect of removal of biofilm. However, additional studies should be conducted to select the best cost-benefit combinations of selected enzymes and biocides to remove efficiently biofilms in dairy processing environments.

Keywords: Biofilm; Enzyme-Based Preparations; Industrial Hygiene; Surface Contamination.

2.1 INTRODUÇÃO

Superfícies contaminadas que foram expostas a alimentos são fontes potenciais de transmissão de microrganismos patogênicos ou em deterioração no processamento de alimentos e nos locais de manuseio. Os microrganismos podem ser encontrados nas superfícies de equipamentos e utensílios na forma de células planctônicas ou sésseis, que podem formar biofilmes que aumentam o risco de contaminação dos alimentos (FLEMING et al., 2016). Biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos, de vida microbiana séssil, com adesão a suportes sólidos e produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), representando cerca de 50-95% (p/p), garantindo assim a proteção celular (HOOSHDAR et al., 2020). Biofilmes podem conter muitas células bacterianas e fúngicas que podem coexistir e estabelecer um fenótipo cooperativo/agressivo no qual podem formar uma camada ou estrutura tridimensional (OXARAN et al., 2018). Biofilmes são considerados formas altamente organizadas, permitindo a troca de nutrientes e metabólitos em um mesmo ecossistema para garantir a sobrevivência (SHI e ZHU, 2009). Entre os microrganismos de origem alimentar que formam biofilmes em superfícies (Figura 1), *Staphylococcus aureus* (LEE et al., 2014), *Bacillus cereus* (EHLING-SCHULZ et al., 2019; GOPAL et al., 2015), *Listeria monocytogenes* (LEE et al., 2017a), *Escherichia coli* (CHERIF-ANTAR et al., 2016), *Salmonella* spp. (WANG et al., 2016) e *Pseudomonas* spp. (CHERIF-ANTAR et al., 2016; ROSSI et al., 2018) são de grande importância para a indústria de laticínios por causa de sua ocorrência frequente e potenciais efeitos econômicos e para a saúde.

Figura 1. Principais microrganismos patogênicos formadores de biofilme encontrados em ambientes de processamento de laticínios



Fonte: Autor (2021).

S. aureus é um coco Gram-positivo, bactéria anaeróbia faculatória, coagulase e catalase positiva e é considerada uma das principais causas de doenças bacterianas de origem alimentar em humanos (GUTIÉRREZ et al., 2012). A intoxicação alimentar por *S. aureus* é caracterizada por sintomas como náuseas, vômitos, cólicas e diarreia, que podem ser desencadeados se a concentração de *S. aureus* nos alimentos for superior a 10^5 unidades formadoras de colônias/grama (UFC/g) (JAMALI et al., 2015). *S. aureus* é frequentemente encontrado no leite e produtos lácteos, que são excelentes substratos para o crescimento do patógeno (LEE et al., 2014). *B. cereus* é uma bactéria aeróbia facultativa em forma de bastonete e Gram-positiva que pode formar esporos, com impacto significativo na saúde humana como agente causador de doenças transmitidas por alimentos (OWUSU- KWARTENG et al., 2017). Alimentos lácteos contaminados com *B. cereus* estão entre os veículos mais frequentes de suas toxinas responsáveis por síndromes diarreicas ou eméticas (VIDIC et al., 2020). A síndrome diarreica causada por *B. cereus* é caracterizada por dor abdominal, diarreia aquosa e tenesmo retal, que se desenvolvem entre 8 e 16 horas após a ingestão de alimentos contaminados contendo níveis acima de 10^5 UFC/g (BOTTONE, 2010). A concentração necessária para o

desenvolvimento da síndrome emética é em torno de 10^7 UFC/g, que se caracteriza por náuseas e vômitos após 1 a 5 horas da ingestão de alimentos contaminados (BOTTONE, 2010).

L. monocytogenes é outra bactéria Gram-positiva em forma de bastonete encontrada no leite e produtos lácteos que causa doenças humanas, incluindo listeriose, após consumir alimentos contaminados (Akrami-Mohajeri et al., 2018) causando meningite, endocardite, encefalite, septicemia, aborto espontâneo, depressão imunológica e morte em casos extremos (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2018). Diversas avaliações de risco concluíram que níveis $>10^6$ UFC g são responsáveis pela maioria dos casos de listeriose invasiva (RYSER, 2011). *L. monocytogenes* foi relatada em leite cru de vaca, ovelha e cabra (MANSOURI-NAJAND et al., 2015), bem como em laticínios prontos para consumo, como queijo (JAKOBSEN et al., 2011) e sorvete (CHEN et al., 2016). Outras bactérias freqüentemente encontradas no leite e produtos lácteos, com interesse econômico e de saúde, bem como capacidade de formação de biofilme, incluem várias espécies de *Pseudomonas* como *P. fluorescens* (MENG et al., 2017), *Klebsiela pnemoniae* (MOHAMED et al., 2018), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Mullan, 2019), *Campylobacter jejuni* (SONG et al., 2020), *S. enterica* e *E. coli* O157: H7 (AHMED e SHIMAMOTO, 2014).

Considerando que os biofilmes são formados, dispersos e, em seguida, distribuídos na mesma superfície com os restos dos biofilmes formados, métodos de limpeza regulares e eficazes são geralmente úteis para prevenir a adesão inicial de células bacterianas em superfícies na indústria de laticínios. Por esse motivo, programas de qualidade de alimentos, como Boas Práticas de Fabricação, Procedimentos Operacionais Padrão de Saneamento e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, são ferramentas fundamentais para garantir limpeza e desinfecção eficazes em ambientes de produção de alimentos (CUSATO et al., 2014), evitando assim a adesão de células bacterianas e a consequente formação de biofilmes nas superfícies (DOMINCIANO et al., 2016). Nesse contexto, o processo de limpeza no local (CIP) é considerado um ponto central no controle do biofilme, desde que sanitizantes (ou biocidas) sejam utilizados para garantir a inativação de microrganismos (SREY et al., 2013). A aplicação correta de biocidas durante o processo de CIP é fundamental para reduzir a carga bacteriana ao final do procedimento de desinfecção (DOMINCIANO et al., 2016). Porém, conexões de tubos, válvulas e outros locais de difícil acesso para biocidas são os principais obstáculos para a limpeza adequada das linhas de

processamento de laticínios, representando assim a formação de biofilme potencial (MARCHAND et al., 2012). Além disso, os microrganismos aderidos às superfícies após a formação do biofilme são mais resistentes aos biocidas, como o cloro, do que os microrganismos não aderentes (LEE et al., 2016, 2017b).

Em ambientes de processamento de alimentos, as espécies bacterianas normalmente residem em biofilmes de espécies mistas, levando a várias interações entre as espécies, que influenciam marcadamente o crescimento de biofilmes (OXARAN et al., 2018). Nesse contexto, microrganismos que frequentemente ocorrem em ambientes de laticínios, como algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, foram testados quanto à sua potencial atividade anti-biofilme (JEONG et al., 2018). Além disso, biofilmes formados por *L. rhamnosus* GG foram usados com sucesso para a desintoxicação da aflatoxina M1 no leite (ASSAF et al., 2019). YEGANEH et al. (2017) relataram que *L. plantarum*, *L. casei* e *L. acidophilus* foram eficazes cepas uropatogênicas resistentes à ciprofloxacina de *E. coli* em leite pasteurizado, resultando em um efeito inibitório na formação de seu biofilme. De acordo com Kim et al. (2019), o uso de bacteriocinas produzidas por *L. brevis* reduziu significativamente os biofilmes formados por *E. coli* e *S. enterica* sorotipo Typhimurium, principalmente nos estágios iniciais de formação de biofilme. No entanto, a aplicação prática de microrganismos contra biofilmes formados por patógenos de origem alimentar em ambientes reais de processamento de alimentos não foram avaliados.

Nos últimos anos, vários trabalhos de pesquisa demonstraram que algumas preparações baseadas em enzimas são eficazes contra biofilmes microbianos em superfícies, degradando os componentes da matriz do biofilme (COUGHLAN et al., 2016). Nahar et al. (2018) publicou uma extensa revisão das estratégias de redução do biofilme baseadas em enzimas com aplicações potenciais na indústria de alimentos. O interesse científico por essas questões aumentou acentuadamente nos últimos anos, levando a dados publicados recentemente sobre abordagens baseadas em enzimas para lidar com o problema do biofilme. Nas próximas seções, são apresentados conceitos sobre a formação de biofilme e os dados publicados recentemente sobre preparações baseadas em enzimas para controlar biofilmes formados por bactérias patogênicas em ambientes de processamento de laticínios.

2.2 FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO BIOFILME

A formação e o desenvolvimento de biofilmes em superfícies dependem de vários fatores, como o tipo de material de superfície, pH, temperatura e disponibilidade de materiais orgânicos e inorgânicos (DI CICCIO et al., 2015; FLEMING et al., 2016; SREY et al., 2013). Os biofilmes possuem uma estrutura porosa com canais onde água e nutrientes são distribuídos, proporcionando uma arquitetura homogênea do ambiente que garante um crescimento consistente com transporte efetivo de água, nutrientes e oxigênio para o seu interior (OXARAN et al., 2018). A formação dos biofilmes começa nas superfícies quando os nutrientes estão disponíveis, e o primeiro estágio de formação é considerado como a adesão de microrganismos através da matriz de exopolissacarídeos favorecendo o aparecimento de microcolônias (LEE et al., 2016). O estágio de adesão irreversível resulta de alta especificidade e interações de curta distância entre os pili, flagelos e produção de SPE, pelas quais as ligações de interação dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, ligações covalentes e iônicas são fortalecidas (HØIBY, 2017). Esses fatores fornecem adesão inicial às superfícies, levando ao início do crescimento da massa celular, que acaba formando o biofilme bacteriano(CHERIF-ANTAR et al., 2016; MARCHAND et al., 2012). O biofilme assume uma forma plana organizada ou cogumelo durante a fase de maturação, dependendo da fonte de nutrientes encontrada nas superfícies (SREY et al., 2013). O período entre a formação e maturação dos biofilmes é variável, geralmente entre 3 e 6 dias após o estágio inicial de adesão (NAHAR et al., 2018). Dispersão é a última dispersão é a última etapa do ciclo do biofilme, permitindo que as células se desprendam e iniciem um novo ciclo. O descolamento ocorre devido a processos internos, como a liberação de enzimas endógenas e SPE (SREY et al., 2013).

Entre os patógenos de origem alimentar, a adesão de *B. cereus* é atribuída às suas características hidrofóbicas (EHLING-SCHULZ et al., 2019). Além disso, os biofilmes de *B. cereus* podem se comportar como ninhos para a formação e liberação de esporos em ambientes produtores de alimentos, os quais são difíceis de erradicar, pois os esporos são envolvidos pela matriz aderida para garantir sua germinação completa, tornando-o resistente à higienização (KWON et al., 2017). A capacidade do *S. aureus* de formar biofilmes também é um importante fator de virulência, uma vez que esse mecanismo garante sua sobrevivência em um novo ambiente (WATTERS et al., 2016). Materiais como aço inoxidável, vidro e polipropileno provaram ser as fontes de

contaminação por *S. aureus* após sofrer adesão e, posteriormente, formar biofilmes (LEE et al., 2014; UNLU et al., 2018). *L. monocytogenes* é outra bactéria patogênica cujos biofilmes representam um problema significativo nas áreas de processamento de laticínios, principalmente devido à contaminação de superfícies de manuseio de alimentos, equipamentos e tubos (KADAM et al., 2013). A formação de biofilmes de *L. monocytogenes* depende de vários fatores, como pH, material de superfície para adesão, disponibilidade de matéria inorgânica ou orgânica, resistência à adesão e temperatura (LEE et al., 2017a, 2017b). De acordo com Silva e De Martinis (2013), *L. monocytogenes* pode aderir e formar biofilmes a uma concentração celular de 10^4 –10^7 UFC/cm^2 . Além disso, Colagiorgi et al. (2017) e Oxaran et al. (2018) demonstrou que *L. monocytogenes* pode formar biofilmes de espécies mistas com *S. aureus Flavobacterium* spp. em superfícies de aço inoxidável amplamente utilizadas na indústria de laticínios. Em outro estudo, Alonso e Kabuki (2019) observaram um comportamento dominante de *Enterococcus faecalis* em mono-espécies, bem como em multiespécies, biofilmes com *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus* em superfícies de aço inoxidável a 25°C.

Os procedimentos de limpeza e desinfecção com biocidas adequados são geralmente eficazes contra os estágios iniciais de biofilmes formados por bactérias patogênicas (LEE et al., 2017a). Os principais tipos de biocidas usados na indústria de laticínios incluem compostos halogênicos, peroxigênio, ácidos orgânicos e amônia quaternária. É importante ressaltar que a eficácia desses compostos, entre outros fatores, depende da carga bacteriana inicial, tempo de aplicação, tipo de superfície e espectro contra o microrganismo (DOMINCIANO et al., 2016). Foi demonstrado que os sanitizantes à base de cloro foram eficazes contra os biofilmes de *L. monocytogenes* devido aos processos de oxidação rápidos no metabolismo das células bacterianas (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2018). No entanto, a presença de matriz extracelular nos biofilmes formados por bactérias patogênicas geralmente oferece maior resistência aos biocidas em comparação com seu estágio planctônico (SREY et al.,2013). Os mecanismos responsáveis pela resistência do biofilme aos biocidas não são totalmente compreendidos, embora a arquitetura específica dos biofilmes, a atividade metabólica diminuída ou a composição do SPE tenham sido hipotetizados como possíveis razões (BRIDIER et al., 2011). Portanto, avaliações de rotina são recomendadas no ambiente da indústria de laticínios para identificar patógenos com a capacidade de produzir

biofilmes em superfícies a partir de materiais comumente usados para a fabricação de produtos lácteos (LEE et al., 2014).

2.3 ABORDAGENS BASEADAS EM ENZIMAS PARA REMOÇÃO DE BIOFILMES

Em biofilmes maduros, o SPE formado compreende vários tipos de moléculas, incluindo polissacarídeos, DNA e proteínas, embora a complexidade da composição do SPE possa variar acentuadamente entre as espécies bacterianas (COMBROUSE et al., 2013). O SPE tem sido considerado um alvo importante em procedimentos de higienização para lidar com problemas de biofilme em ambientes de processamento de alimentos (SADEKUZZAMAN et al., 2015). Neste contexto, o uso de preparações à base de enzimas em combinação com biocidas oferece uma abordagem atraente para resolver o problema de biofilmes em superfícies na indústria de laticínios pela degradação de seus componentes da matriz, facilitando a inativação e remoção de células destacadas durante os procedimentos de limpeza e desinfecção industrial (THALLINGER et al., 2013). A Tabela 1 apresenta os resultados primários de estudos recentes sobre a aplicação de preparações à base de enzimas para a remoção de biofilmes microbianos formados em diferentes superfícies.

As proteases é a principal classe de enzimas com alto potencial para remoção de biofilmes bacterianos e resíduos de proteínas fixados em superfícies internas de equipamentos como vasos e tubos (AUGUSTIN et al., 2004). Os exemplos incluem proteinase K, lisostafina e aureolisina (SAGGU et al., 2019). As proteases obtiveram maior atividade na degradação de SPE dos biofilmes formados por *P. fluorescens* do que as amilases (SREY et al., 2013). Glicosidases e desoxirribonuclease (DNAses) também são enzimas com potencial atividade para degradação do SPE de biofilmes e liberação de células planctônicas (SAGGU et al., 2019). Craigen et al. (2011) observaram que o DNAse I degradou de forma eficiente o DNA extracelular de biofilmes de *S. aureus*, evitando assim a adesão da matriz do biofilme à superfície. No entanto, as aplicações práticas de enzimas na indústria de laticínios são limitadas devido aos altos custos das preparações à base de enzimas, especialmente quando comparadas aos métodos tradicionais de sanitização com biocidas, e variações nas atividades enzimáticas de diferentes tipos de enzimas relatadas em experimentos estudos (AUGUSTIN et al., 2004). Usando metaloproteínas secretadas por *Mycobacterium* spp.

SKS10, Saggu et al. (2019) observaram uma degradação enzimática de quase 62% na biomassa do biofilme e aumentou a acessibilidade ao antibiótico dentro do biofilme. Anteriormente, Watters et al. (2016) demonstraram que α-amilase, papaína e bromelaína removeram quase totalmente o biofilme formado por diferentes cepas (ATCC 25923, ATCC 33591, IQ0070, SA5214, SA5123 e SA5120) de *S. aureus* em microplaca de poliestireno.

O efeito da DNAse I em biofilmes de duas espécies formados por *L. monocytogenes* e *E. coli* em cupons de aço inoxidável foi relatado por Rodríguez-López et al. (2016). Os autores observaram uma redução de quase 2 ciclos logarítmicos nas contagens bacterianas para ambas as espécies por DNAse I a 400 μg/mL. A remoção de biofilmes por DNAses é creditada à digestão da fita de eDNA, levando à destruição da matriz do biofilme e morte celular (KOOHY et al., 2013). No entanto, o papel do eDNA como um componente estrutural da matriz do biofilme ainda necessita de esclarecimento para elucidar completamente o modo de ação dos DNAses para reduzir a adesão de células bacterianas em biofilmes maduros (Grande et al., 2011).

Vários tipos de proteases têm sido estudados contra biofilmes microbianos, isoladamente ou em combinação com outros compostos. Araújo et al. (2017) observaram reduções de 1,59 e 1,93 log UFC/cm^2 após o tratamento de *P. fluorescens* biofilmes com protease isolada ou associada ao brometo de cetiltrimetilamônio, respectivamente. A eliminação completa de biofilmes formados por *Macrococcus caseolyticus* após contato de 1,5 h com protease (500 mg/mL) a 45ºC foi relatada por Mnif et al. (2020). A combinação de proteases com surfactantes e fenoxietanol contra biofilmes *L. monocytogenes* proporcionou uma redução na contagem de células de 6,9 log UFC/cm^2 (Mazaheri et al., 2020). A aplicação de proteinase K contra biofilmes de *E. coli* O157: H7 resultou em maior eficácia do que outras enzimas, como DNAse I e celulose, levando a reduções de massa de biofilme de 91-99%, equivalente a 2,43 log UFC/cm^2 (Lim etal., 2019). No entanto, Wang et al. (2016) observaram uma redução percentual menor (55%) pela proteinase K contra biofilmes de *Salmonella* spp., indicando variações espécie-específicas na eficácia desta enzima.

Tabela 1. Estudos recentes sobre a aplicação de preparações à base de enzimas para a remoção de biofilmes microbianos formados em diferentes superfícies

Preparação enzimática	Microrganismo/formação do biofilme	Condições experimentais	Efeitos principais	Referência
β-glucanase, α-amilase, lipase e protease, associada ao brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	*P. fluorescens* cultivado no biorreator I (contendo superfície de aço inoxidável) e gotejado no biorreator II a 30ºC por 7 dias	Soluções enzimáticas ou CTAB aplicadas através de células de fluxo por 1 h, e avaliadas após 2, 12 e 24 h.	Protease obteve uma redução celular maior (1,59 log UFC/cm^2) do que a lipase, β-glucanase e α-amilase (1,34, 1,25 e 1,09 log UFC/cm^2 respectivamente). A protease associada ao CTAB reduziu 1,93 log UFC/cm.^{2}	Araújo et al., 2017
Pronase, celulase, pectinase, DNAse I, lisozima, fosfolipase, peroxidase, β-glucanase e quitinase	Biofilmes mono e dual-espécies de *L. monocytogenes* cultivados em cupons de aço inoxidável a 25ºC por 48 h	1 mL de solução de enzimas mistas aplicada nos cupons de aço inoxidável com biofilmes em temperatura ambiente por 1 h	Biofilmes de mono-espécies de células de *L. monocytogenes* reduziram quase 1 log de ciclo. Em biofilmes de duas espécies, apenas efeitos moderados foram observados	Puga et al., 2018
Papaína (de *C. papaya*)	*K. pneumoniae* cultivada em placas a 37ºC por 24 h	Papaína a 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/mL testada contra células planctônicas e durante a formação de biofilme	Nenhum efeito bactericida foi observado. O nível mais alto (100mg/mL) reduziu 55-59% da massa do biofilme	Mohamed et al., 2018
Metaloprotease (de *Mycobacterium* spp. (SKS10)	*S. aureus* MTCC 11949 cultivado em superfície de poliestireno a 37ºC por 72 h	Metaloproteína dissolvida em caldo Luria-Bertani a 10, 100 ou 1.000 µg/mL e incubada com biofilmes por 24 h a 37°C	A enzima degradou ≥ 62% da biomassa do biofilme, a partir de 10 µg/mL. Aumento da acessibilidade de antibióticos dentro do biofilme também foi observada	Saggu et al., 2019
DNAse I, proteinase K e celulase	*E. coli* O157: H7 cultivado em poliestireno e aço inoxidável a 25ºC por 24 h.	Celulase (20 mg/mL), proteinase K (10 mg/mL) e DNAse I (1 mg/mL) incubados com biofilmes em placas de poliestireno (25ºC, 24 h) e aço	Proteinase K e celulase reduziram 91-99% e 65-98% da massa do biofilme, respectivamente. O tratamento com	Lim et al., 2019

		inoxidável (37ºC, 1 h)	proteinase K resultou em maior redução de células de biofilme (2,43 log UFC/cm^2)	
Endolisina LysCSA13 secretada por *S. aureus*	*S. aureus* RN4220 e CCARM 3090 cultivados em placas de poliestireno, aço inoxidável e superfície de vidro a 37ºC por 24 h	Soluções de endolisina LysCSA13 (100, 300 e 1000 nM) incubadas com biofilmes em poliestireno (2h), aço inoxidável (1h) e vidro (2h).	Endolisina LyCAS13 em níveis 300 nM reduziu 82-84% da massa do biofilme em todas as superfícies testadas	Cha et al., 2019
Proteases em combinação com lauril éter glicolato de sódio etoxilado, N-óxido N, N-dimetil-C12-C14-alquilamina, surfactantes aniônicos e não iônicos e fenoxietano	*L. monocytogenes* cultivado em cupons de aço inoxidável a 30°C por 7 dias	Solução enzimática-detergente (3 mL) foi adicionada aos biofilmes e mantida a 50ºC por 15 min	Redução máxima de 6,9 log UFC/cm^2 nas células do biofilme, correspondendo a 85-99% da redução de biomassa	Mazaheri et al., 2020
Mananase, savinase e α-amilase em combinação com timol e cinamaldeído	L. monocytogenes cultivado em cupons de aço inoxidável a 30ºC por 7 dias	Três tratamentos consecutivos de biofilmes com a preparação à base de enzimas a 50ºC por 20 min.	Redução de 75-98% na biomassa do biofilme	Ripolles-Avila et al., 2020
Papaína (de *C. papaya*)	*S. aureus* e *C. jejuni* (NCTC 11168 e Y23-5) cultivados em placas de microtitulação de poliestireno por 24 he 72 h a 37ºC, respectivamente.	Papaína (0,31–5,0 µg/mL) adicionada aos biofilmes e incubada a 37ºC por 24 h (*S. aureus*) e 72 h (*C. jejuni*).	Degradação de biofilmes maduros por papaína a 5,0 µg / mL com redução de 22–26% e 22–51% na biomassa do biofilme de *S. aureus* e *C. jejuni*, respectivamente	Song et al., 2020
Protease, lipase, amilase, CMCase e DNAse	*M. caseolyticus* cultivado em microplacas de poliestireno e superfícies de aço inoxidável a 30ºC por 24 h	Pronase, CMCase, amilase e lipase a 62,5-500 mg /mL e DNAse a 7,8-62,5 mg /mL, incubados com biofilmes a 45ºC por 1,5 h	DNAse, protease e lipase em suas concentrações mais altas eliminaram os biofilmes. CMCase e amilase não afetaram biofilmes	Mnif et al., 2020

Fonte: Autor (2021)

Outra protease frequentemente testada contra biofilmes é a papaína obtida de mamão (*Carica papaya*), o que pode ser atribuído à sua alta capacidade proteolítica, amplo espectro contra substratos protéicos e a capacidade de hidrogenar essas proteínas

em pequenos peptídeos e aminoácidos (BORRAJO et al., 2020; SÁRINGER et al., 2019). Songet al. (2020) observaram que a papaína a 5,0 μg/mL resultou em reduções de 26,1, 21,6 e 50,9% na massa do biofilme formada por *S. aureus*, *C. jejuni* NCTC 11168 e *C. jejuni* Y23-5, respectivamente. Assim, Mohamed et al. (2018) demonstraram que 100 mg/mL de papaína removeram 59% dos biofilmes formados por *Klebsiella pneumoniae*, emboranenhum efeito nas células planctônicas tenha sido observado.

As amilases representam um expressivo grupo testado em procedimentos de limpeza enzimática, dentre os quais os principais tipos estudados são α-amilase e glicosídeo amilase, representando cerca de 25% do mercado mundial de comercialização de enzimas (SUNDARRAM, MURTHY, 2014). Essas enzimas catalisam reações de hidrólise nas ligações α-1,4-glicosídicas do amido, produzindo glicose e malte (SUNDARRAM, MURTHY, 2014). Araújo et al. (2017) observaram que a α-amilase reduziu as contagens nos biofilmes de *P. fluorescensin* em quase 1,1 log UFC/cm^2. Evidências recentes indicaram que as combinações de α-amilase com timol, cinamaldeído e outras enzimas, como mananase e savinase, foram altamente significativas (reduções de 75-98% na biomassa) contra os biofilmes formados por *L. monocytogenes* (RIPOLLES-AVILA et al., 2020). No entanto, amilases em níveis tão elevados quanto 500 mg/mL não foram eficazes contra os biofilmes formados por *Macrococcus caseolyticus* (MNIF et al., 2020).

Recentemente, celulases e lipases têm sido estudadas isoladamente ou em associação contra biofilmes e remoção de materiais alimentares residuais de superfícies. Guerrero-Navarro et al. (2019) descobriram que a associação de lipase, amilase e protease removeu 78% das incrustações de leite das superfícies de aço inoxidável após o tratamento enzimático. Em relação à remoção de biofilmes por lipases, Araújo et al. (2017) relataram uma redução de 1,34 log UFC/cm^2 de biofilmes de *P. fluorescens*, enquanto a eliminação completa de biofilmes de *M. caseolyticus* foi descrita por Mnif et al. (2020). A celulase em uma concentração de 1–20 mg/mL levou a reduções de 5,0 log UFC/cm^2 de células de biofilme de vários sorotipos de *Salmonella enterica* (*S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Infantis, *S.* Stanley, *S.* Agona, *S.* Derby e *S.* Indiana) (WANG et al., 2016). Resultados semelhantes foram relatados por Lim et al. (2019), que descobriram que a celulase a 20 mg /mL reduziu 65–98% da massa do biofilme formada por *E. coli* O157: H7, confirmando assim a aplicação potencial desta enzima contra biofilmes.

CONCLUSÃO

Como comunidades de microrganismos, os biofilmes aderem a diversos tipos de superfícies para garantir sua sobrevivência sob condições de estresse no meio ambiente. Entre os principais microrganismos patogênicos listados como problemas para a indústria de laticínios estão *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella* spp. e *E.coli*. Como os biofilmes maduros têm maior resistência aos biocidas, preparações baseadas em enzimas têm sido estudadas visando seu uso potencial como agentes auxiliares na remoção de biofilmes. Dentre os principais grupos de enzimas estudados, proteases, amilases, celulases e DNAses apresentam perspectivas de degradação dos componentes da matriz do biofilme, reduzindo 1,0-6,9 log UFC/cm^2 dos patógenos citados em biofilmes maduros e até 99% de sua biomassa. Essas características aumentam as perspectivas de aplicação de preparações à base de enzimas isoladamente ou associadas a biocidas para limpeza de equipamentos, utensílios e outras superfícies em ambientes de processamento de laticínios.

REFERÊNCIAS

AHMED, A.M. et al. **Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica, Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt**. International Journal of Food Microbiology, v.168, p.57–62, 2014.

AKRAMI-MOHAJERI, F. et al. **The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016)**. Food and Chemical Toxicology, v.114, p.141–144, 2018.

ALONSO, V.P.P.; KABUKI, D.Y. **Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates.** International Journal of Dairy Technology, v.70, p.1–6, 2019.

ARAÚJO, P.A. et al. **Combination of selected enzymes with cetyltrimethylammonium bromide in biofilm inactivation, removal and regrowth**. Food Research International, v.95, p.101– 107, 2017.

ASSAF, J.C. et al. **A novel method for elimination of aflatoxin M1 in milk using *Lactobacillus rhamnosus* GG biofilm**. International Journal of Dairy Technology, v.72, p.248–256, 2019.

AUGUSTIN, M. et al. 2004. **Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms.** Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.7, p.55–64, 2004.

BORRAJO, P. et al. **Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of porcine liver protein hydrolysates obtained using alcalase, bromelain, and papain**. Applied Sciences, v.10, p.2290, 2020.

BOTTONE, E.J. **Bacillus cereus, a volatile human pathogen**. Clinical Microbiology Review, v.23, p.382–398, 2010.

BRIDIER, A. et al. **Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review**. Biofouling, v.27, p.1017–1032, 2011.

CHA, Y. et al. **Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13**. Food Microbiology, v.84, p.103245, 2019.

CHEN, Y. et al.**Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ice cream linked to a listeriosis outbreak in the United States**. Journal of Food Protection, v.79, p.1828–1832, 2016.

CHERIF-ANTAR, A. et al. **Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant**. Dairy Science and Technology, v.96, p.27–38, 2016.

COLAGIORGI, A. et al. ***Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry**. Pathogens, v.6, p.41, 2017.

COMBROUSE, T. et al. **Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenic lineages with optimization of culture conditions**. Journal of Applied Microbiology, v.114, p.1120–1131, 2013.

COUGHLAN, L.M. et al. **New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry**. Frontiers in Microbiology, v.7, p.1641, 2016.

CRAIGEN, B. et al. **The use of commercially available alpha- amylase compounds to inhibit and remove *Staphylococcus aureus* biofilms**. The Open Microbiology Journal, v.5, p.21–31, 2011.

CUSATO, S., **Assessing the costs involved in the implementation of GMP and HACCP in a small dairy factory**. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, v.6, p.135– 139, 2014.

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

DOMINCIANO, L.C.C. et al. **Effects of oleuropein and peracetic acid as sanitizing agents for inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms**. The Open Conference Proceedings Journal, v.7, p.1–6, 2016.

EHLING-SCHULZ, M. et al. **The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential.** Microbiology Spectrum, v.7, p.875–902, 2019.

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

GOPAL, N. et al. **The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry**. Frontiers in Microbiology, v.6, p.1418, 2015.

GRANDE, R. et al. **Extracellular DNA in Helicobacter pylori biofilm: a backstairs rumor.** Journal of Applied Microbiology, v.110, p.490–498, 2011.

GUERRERO-NAVARRO, A.E. et al. **Development of a dairy fouling model to assess the efficacyof cleaning procedures using alkaline and enzymatic products**. Food Science and Technology.106,p.44-49.2019.

GUTIÉRREZ, D. et al. **Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterialcommunities on food industry surfaces**. Applied and Environmental Microbiology, v.78, p.8547–8554, 2012.

HØIBY, N. **A short history of microbial biofilms and biofilm infections**. Journal of Pathology, Microbiology and Immunology, v.125, p.272–275, 2017.

HOOSHDAR, P. et al. **A review on production of exopolysaccharide and biofilm in probiotics like *Lactobacilli* and methods of analysis**. Biointerface Research in Applied Chemistry, v.10, p.6058–6075, 2020.

JAKOBSEN, R.A. ***Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production**. Food Microbiology,v.3, p.492–496, 2011.

JAMALI, H. et al. **Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products**.Food Control, v.54, p.383–388, 2015.

JEONG, D. et al. **Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefiranofaciens* DD2 against oral pathogens**. Journal of Oral Microbiology, v.10, p.1472985, 2018.

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, p.259– 264, 2013.

KIM, N.-N. et al. **Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from Lactobacillus brevis DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium**. Food Control, v.98, p.274–280, 2019.

KOOHY, H. et al. **Chromatin accessibility data sets show bias due to sequence specificity of the DNAse I enzyme**. PLoS One, v.8, p.1–9, 2013.

KWON, M. et al. **Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions**. Food Science and Biotechnology, v.26, p.1103–1111, 2017.

LEE, S.H.I. et al.**Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants**. Food Research International, v.91, p.88–91, 2017a.

LEE, S.H.I. et al. **Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Listeria monocytogenes* strains isolated from a Brazilian cheese processing plant**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.53, p. 1–7, 2017b .

LEE, S.H.I. et al. **Effect ofperacetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants**. Journal of Dairy Science, v.99, p. 2384–2390, 2016.

LEE, S.H.I. et al. **Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms**. Journal of Dairy Science, v.97, p.1812–1816, 2014.

LIM, E.S. et al. **Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 bioflm and their synergistic effect with sodium hypochlorite**. Scientific Reports, v.9, p.9920, 2019.

MANSOURI-NAJAND, L. et al. **Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Kerman, Iran**. Veterinary Research Forum, v.6, p.223–226, 2015.

MARCHAND, S. et al. **Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 11: 133–147, 2012.

MAZAHERI, T. et al. **Effect of anenzymatic treatment on the removal of mature *Listeria monocytogenes* biofilms: a quantitative and qualitative study**. Food Control, v.114. p.107266, 2020.

MENG, L. et al. **Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures**. Frontiers in Microbiology, v.8, p.2158, 2017.

MNIF, S. et al. **Enzyme-based strategy to eradicate monospecies *Macrococcus caseolyticus* biofilm contamination in dairy industries**. International Dairy Journal, v.100, p.104560, 2020.

MOHAMED, S.H. et al. **Antibiofilm activity of papain enzyme against pathogenic *Klebsiella pneumoniae*.** Journal of Applied Pharmaceutical Science, v.8, p.163–168, 2018.

MULLAN, W.M.A. **Are we closer to understanding why viable cells of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are still being reported in pasteurized milk?** International Journal of Dairy Technology, v.72, p.332–344, 2019.

NAHAR, S. et al. **Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. v.17, p.1484–1502, 2018.

OWUSU-KWARTENG, J. et al. **Prevalence, virulence factor genes and anti- biotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products**. BMC Microbiology, v.17, p.65, 2017.

OXARAN, V. et al. **Behavior of foodborne pathogens, Listeria monocytogenes and *Staphylococcus aureus*, in mixed-species biofilm exposed to biocides**. Applied and Environmental Microbiology, v.84, e020038-18, 2018.

PUGA, C.H. et al. **Enzymatic dispersal of dual-species biofilms carrying *Listeria monocytogenes* and other associated food industry bacteria**. Food Control, v.94, p.222–228, 2018.

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.32, p.108595, 2020.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. et al. **Removal of *Listeria monocytogenes* dual-species biofilms using combined enzyme benzalkonium chloride treatments**. Biofouling, v.33, p.45–58, 2017.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. et al. **Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol**. Foods, v.7, p.85, 2018.

ROSSI, C. et al. **Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry**. Food Control, v.86, p.241–248, 2018.

RYSER, E.T. P**athogens in milk: *Listeria monocytogenes***. In: Fuquay, J.W. (ed.)Encyclopedia of dairy sciences, 2nd ed. Academic Press, London, pp. 1650–1655, 2011.

SADEKUZZAMAN, M. et al. **Current and recent advanced strategies for combating biofilms**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v.14, p.491–509, 2015.

SAGGU, S.K. et al. **Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from *Microbacterium* sp. Sks10**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v.7, p.192, 2019.

SÁRINGER, S. et al. **Papain adsorption on latex particles: charging, aggregation, and enzymatic activity**. The Journal of Physical Chemistry B,v.123, p.9984– 9991, 2019.

SHI, X.; ZHU, X. **Biofilm formation and food safety in food industries**. Trends inFood Science and Technology, v.20, p.407-413, 2009.

SILVA, E.P.; DE MARTINIS, E.C. **Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes***. Applied Microbiology and Biotechnology, v.97, p.957–968, 2013.

SONG, Y.J. et al.**The use of papain for the removal of biofilms formed by pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni***. Food Science and Technology, v.127, p.109383, 2020.

SREY, S. et al. **Biofilm formation in food industries: a food safety concern**. Food Control, v.31, p.572-585, 2013.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T.P.K. ***α*-Amylase production and applications: a review**. Journal of Applied and Environmental Microbiology, v.2, p.166–175, 2014.

THALLINGER, B. et al. **Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms**. Biotechnology Journal, v.8, p.97–109, 2013.

UNLU, A. et al. **Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains and their control by selected phytochemicals**. International Journal of Dairy Technology, v.71, p.637–646, 2018.

VIDIC, J. **Food sensing: detection of *Bacillus cereus* spores in dairy products**. Biosensors, v.10, p.15, 2020.

WANG, H. et al. **Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme**. Food Science and Technology, v.66, p.298–304, 2016.

WATTERS, C. et al. **Enzymatic degradation ofin vitro *Staphylococcus aureus* biofilms supplemented with human plasma**. Infection and Drug Resistance, v.9, p.71–78, 2016.

YEGANEH, M. et al. **Antibiofilm effects of *Lactobacilli* against ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strainsin pasteurized milk**. Applied Food Biotechnology, v.4, p.241–250, 2017.

3. EFEITOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DE ALFA-AMILASE E SANITIZANTES SOBRE BIOFILMES DE *STAPHYLOCCOCUS AUREUS* ISOLADOS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS BRASILEIRAS

(Artigo submetido na revista *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da alfa-amilase (AA, 100 mg / mL), hipoclorito de sódio (HS, 0,5%), ácido peracético (APA, 0,3%) e combinações enzimabiocida (HS ou APA e AA) em biofilmes de monoespécies formados por quatro cepas de *Staphylococcus aureus* (P01F2T1, P01F5T2, P16 e P24) previamente isoladas de fazendas leiteiras no estado de São Paulo, Brasil. O índice de formação de biofilme (BFI) e a contagem de células cultiváveis foram avaliados para biofilmes formados em microplacas de poliestireno por 72 h a 25ºC. O IFB dos isolados P16 e P24 diminuiu significativamente diminuiu significativamente (P <0,05) após o tratamento com APA ou HS combinado com AA, em comparação com os biocidas isolados. Os biofilmes formados pelos isolados P01F2T1 e P01F5T2 apresentaram menores valores de IFB (P <0,05) após o tratamento com as combinações de APA+ AA e HS + AA, respectivamente. No entanto, reduções significativas nas contagens de biofilme cultiváveis foram observadas apenas para os isolados P01F2T1 tratados com HS + AA e APA + AA, P01F5T2 tratado com HS + AA e P24 tratado com APA + AA. Mais estudos são necessários para definir as melhores combinações de AA e HS ou APA para remover completamente os biofilmes de *S. aureu*s formados em superfícies de plástico em ambientes de processamento de laticínios.

Palavras-chave: Alfa-amilase; Adesão Bacteriana; Ácido Peracético; Hipoclorito de Sódio; Segurança alimentar; S. aureus.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effect of alpha-amylase(AA, 100 mg/mL),sodium hypochlorite (SH, 0.5%), peracetic acid (PAA, 0.3%), and enzyme-biocide combinations (SH or PAA and AA) on mono-species biofilms formed by four *Staphylococcus aureus* strains (P01F2T1, P01F5T2, P16 and P24) previously isolated from dairy farms in São Paulo state, Brazil. Biofilm formation index (BFI) and culturable cell counts were evaluated for biofilms formed on polystyrene microplates for 72 h at 25ºC. The BFI of isolates P16 and P24 significantly decreased (P <0.05) after treatment with PAA or SH combined with AA, compared with the biocides alone.The biofilms formed by isolates P01F2T1 and P01F5T2 had lower BFI values (P < 0.05) after treatment with combinations of PAA + AA and SH + AA, respectively. However, significant reductions in the biofilm culturable counts were observed only for isolates P01F2T1 treated with SH + AA and PAA + AA, P01F5T2 treated with HS + AA, and P24 treated with PAA + AA. Further studies are required to define the best combinations of AA and SH or PAA to completely remove *S. aureus* biofilms formed on plastic surfaces in processing dairy environments.

Keywords: Alpha-amylase; Bacterial adhesion; Food safety; Peracetic acid; S. aureus; Sodium hypochlorite.

3.1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria de forma esférica, coagulase e catalase-positiva com comportamento anaeróbio facultativo (GUTIÉRREZ et al., 2012). *S. aureus* tem sido reconhecido como um dos principais agentes bacterianos causadores de doenças transmitidas por alimentos, devido à ingestão de suas enterotoxinas produzidas durante o crescimento nos alimentos (GONZALEZ et al., 2017). As doenças causadas pelas enterotoxinas de *S. aureus* são caracterizadas por sintomas desagradáveis como náuseas,vômitos, cólicas e diarreia (PREZZI et al., 2020). Em sistemas de produção de leite, *S. aureus* está entre os microrganismos mais importantes que requerem atenção (MEESILP, MESIL, 2019). A contaminação do leite pode ocorrer em fazendas leiteiras, de animais infectados com mastite clínica ou subclínica (MELO et al., 2014), e em nível industrial durante o processamento em laticínios. Tanto em fazendas quanto em laticínios, as superfícies dos equipamentos, utensílios e outras superfícies de contato com o leite, tais como as mãos, são consideradas as principais fontes de contaminação do leite e produtos lácteos (AVILA-NAVOA et al., 2018).

Diversas espécies bacterianas incluindo *S. aureus* são capazes de aderir a superfícies para garantir a sobrevivência em um ambiente inóspito, formando comunidades complexas que são chamadas de biofilmes (FLEMING et al., 2016). Biofilmes são definidos como comunidades de vida microbiana séssil, que aderem a suportes sólidos e produzem substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (YUAN et al., 2020) que podem conter polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios e DNA extracelular (eDNA) (FULAZ et al., 2019). Após a adesão inicial nas superfícies, a formação de biofilmes maduros ocorre de três a seis dias, por meio do aumento da densidade populacional e do conteúdo de SPE do biofilme (WEBER et al., 2019). Este processo aumenta a espessura do biofilme aderido, proporcionando assim uma fonte potencial de contaminação por patógenos de origem alimentar durante o processamento de alimentos (GALIÉ et al., 2018).

O controle ou erradicação de biofilmes na indústria de alimentos tem sido explorado com a aplicação de biocidas como hipoclorito de sódio (HS) e ácido peracético (APA) (PAGEDAR, SINGH, 2015; POIMENIDOU et al., 2016; CASTRO et al., 2017).O HS é um biocida comum utilizado em fazendas leiteiras, pois possui ação rápida, fácil aplicação e controle microbiológico eficaz (BYUN et al., 2021). Além disso

o HS também tem um potencial antimicrobiano contra biofilmes de *S. aureus* (SREY et al., 2013). O APA é um biocida de amplo espectro amplamente utilizado na indústria de laticínios, pois não produz resíduos tóxicos e é considerado ecologicamente correto, quando comparado a outros biocidas (LEE et al., 2017). No entanto, os microrganismos aderidos às superfícies após a formação do biofilme são mais resistentes aos biocidas, como HS e APA, do que os microrganismos não aderentes (LEE et al., 2016; 2017).

As enzimas são frequentemente utilizadas como agentes de limpeza complementares para biocidas (BOELS et al., 2011), sendo catalisadores naturais capazes de acelerar reações químicas (MEIRELES et al., 2016). A alfa-amilase (AA, α-1,4-glucan- 4-glucan-hidrolase) é uma enzima encontrada em humanos, plantas e microrganismos, sendo capaz de catalisar as reações de hidrólise nas ligações α-1,4-glicosídicas do amido à produção de glicose e maltose (SUNDARRAM, MURTHY, 2014), tendo ação contra biofilmes de *S. aureus* na inibição de sua formação (THALLINGER et al., 2013). Fleming et al. (2017) observaram que o uso de AA e solução de celulase contra biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* reduziu significativamente a biomassa dos biofilmes. Nesse contexto, pode-se hipotetizar que combinações de enzima-biocida podem aumentar a eficácia na remoção de biofilmes formados por bactérias patogênicas em superfícies. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de HS, APA, AA ecombinações enzima-biocida (HS ou APA e AA) em biofilmes monoespécies produzidos em microplacas de poliestireno por cepas de *S. aureus* previamente isoladas de fazendas leiteiras no estado de São Paulo, Brasil.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Isolados de *S. aureus*

Quatro cepas de *S. aureus* (P01F2T1, P01F5T2, P16 e P24) foram utilizadas neste trabalho. As cepas isoladas P01F2T1 e P01F5T2 foram obtidas de leite cru de uma fazenda leiteira localizada na cidade de Franca, São Paulo, enquanto as cepas P16 e P24 foram isoladas do leite de vaca e do sistema de ordenha respectivamente, ambas de fazendas localizadas em Pirassununga, São Paulo, Brasil, conformeidentificado por Lee et al. (2016). Todas as cepas foram preservadas em Trypticase Soy Broth (TSB, Oxoid) com 15% de glicerol (v/v) e armazenadas a -80 ºC até a formação do biofilme e tratamentos posteriores.

3.2.2 Efeito de biocidas e alfa-amilase em biofilmes formados em microplacas de poliestireno

Cada cepa de *S. aureus* foi inoculada em 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) e incubada a 37 ºC por 24 h. Posteriormente, a cultura foi ajustada na escala de McFarland para 0,5 (10^8 UFC/mL) usando caldo BHI não cultivado como branco. A produção dos biofilmes seguiu a metodologia descrita por Stepanovíc et al. (2004). Os isolados bacterianos foram transferidos para microplacas de poliestireno de 96 poços em volumes triplicados de 200 µL para cada poço e incubados a 25 ºC por 72 h. Após o período de incubação, a densidade óptica (DO) do total de bactérias na placa de microtitulação foi medida a 600 nm (OD_{600nm}) em um leitor de microplaca (Labsystems, MultiSkan, EUA). O caldo e as células planctônicas fracamente aderidas foram removidos e cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de solução salina tampão de fosfato (PBS) (pH 7,2). A seguir, 200 µL de HS (Dinâmica, Diadema, Brasil) a 0,5% (v/v), ou APA (Dinâmica, Diadema, Brasil) a 0,3% (v/v), ou AA (SigmaAldrich, Saint Luis, MO) a 100 mg/mL foram transferidos para os poços e mantidos por 15 min para a remoção de biofilmes. O tratamento combinado de biocida-enzima (HS e AA, APA e AA) foi realizado com a introdução de AA (200 µL) nos poços por 5 min, a seguir descarregando a enzima e finalmente tratando com 200 µL de solução de HS ou APA por 10 min. Após o tratamento, os poços foram lavados novamente com 200 µL de PBS para inserir metanol (200 µL) por 15 min. O solvente foi descarregado e os poços foram secos à temperatura ambiente. Duzentos µL de solução de cristal violeta (0,1%, m/v) foram inseridos em cada poço para coloração dos biofilmes aderidos por 15 min, seguido por três lavagens subsequentes com água destilada estéril. As microplacas foram secas à temperatura ambiente por 15 min, e os biofilmes corados aderidos aos poços foram ressolubilizados pela adição de 200 µL de ácido acético glacial. Após 15 min. incubação, os volumes foram transferidos para uma nova microplaca e lidos em um leitor de microplaca (Labsystems, MultiSkan, EUA) a 570 nm (OD_{570nm}). O cálculo do índice de formação de biofilme (IFB) foi realizado utilizando a fórmula de Niu, Gilbert (2004):

$$\mathrm{IFB} = \frac{(\mathrm{OD}_{570\mathrm{nm}} - \mathrm{OD}_{\mathrm{C}570\mathrm{nm}})}{(\mathrm{OD}_{600\mathrm{nm}} - \mathrm{OD}_{\mathrm{C}600\mathrm{nm}})}$$

onde OD_{570nm} é obtido a partir de poços desinfetados (tratados) ou de controle positivo (biofilme tratado com PBS) após a coloração; OD_{C570nm} é obtido a partir de poços de controle negativo (tratados com PBS) após a coloração; OD_{600nm} é obtido a partir de poços de controle positivo ou desinfetados; e OD_{C600nm} é obtido a partir de poços de controle negativo após 72 h de formação de biofilme.

A eficiência do HS, APA e AA e do tratamento enzimático-biocida também foi avaliada pela contagem de células cultiváveis em cada poço das microplacas de poliestireno, seguindo a metodologia descrita por Srey et al. (2014). Cada isolado de *S. aureus* em caldo BHI foi transferido em triplicatas de 200 µL para microplacas de poliestireno de 96 poços e incubadas por 72 h. Após esse período, todas as células planctônicas e o caldo foram removidos, e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS (pH 7,2). Cada poço foi tratado com a adição de 200 µL de HS (0,5%, v/v), APA (0,3%, v/v) e AA (100 mg /mL) por 15 min, enquanto os tratamentos combinados HS e AA, APA e AA foram realizados com a inserção de AA nos poços por 5 min, seguido de tratamento com HS ou APA (200 µL) por 10 min. Após os tempos de contato com os biocidas, enzima ou enzima-biocida, os poços foram esvaziados e, logo em seguida, um cotonete estéril foi pressionado no fundo do poço e girado 50 vezes no sentido horário e outras 50 vezes no sentido anti-horário. Os swabs foram colocados em tubos de ensaio contendo PBS estéril e deixados em repouso por 5 min, sendo cada tubo agitado por 30 s. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi submetido a diluições seriadas para inocular em ágar Baird-Parker (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) suplementado com emulsão de gema de ovo e telurito (óxido), cerca de 0,1 mL de cada diluição foi incubado a 37 ºC por 48 h antes da contagem. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias por poço (UFC/poço).

3.2.3 Análise Estatística

Os valores de IFB e contagens de colônias obtidos nos testes em microplacas de poliestireno com HS, APA, AA, HS + AA e APA + AA foram analisados por análise de variância unilateral (Witte, Witte, 2017). As médias dos tratamentos que apresentaram diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela I apresenta os valores de IFB e suas respectivas reduções percentuais de isolados de *S. aureus* produtores de biofilme em microplacas de poliestireno após o tratamento com HS (0,5%), APA (0,3%) e AA (100 mg/mL) e combinações de biocidas enzimáticos (HS + AA, APA+ AA). Em comparação com os controles, os biofilmes formados por todos os isolados de *S. aureus* apresentaram IFB inferior (P <0,05), com valores de 0,33 ± 0,05 a 0,48 ± 0,09 e reduções percentuais variando de 31,7 ± 5,2 a 52,9 ± 3,4%.

Tabela 1. Índice de formação de biofilmes (IFB) e porcentagem de redução de biofilmes monoéspecies de *S. aureus* em microplacas de poliestireno, após o tratamento com hipoclorito de sódio (HS, 0,5%, v/v), ácido peracético (APA, 0,3%, v/v) e alfa-amilase (AA, 100 mg/mL, v/v), individualmente ou em combinação.

	P01F2T1		P01F5T2		P16		P24	
Tratamento	IFB[1]	Redução[2] (%)	IFB[1]	Redução[2] (%)	IFB[1]	Redução[2] (%)	IFB[1]	Redução[2] (%)
Controle	0,70 ± 0,09 [a]	-	0,65 ± 0,02 [a]	-	0,63 ± 0,04 [a]	-	0,70 ± 0,01 [a]	-
HS	0,35 ± 0,06 [b]	50,4 ± 5,5 [b]	0,39 ± 0,12 [b]	44,8 ± 6,1 [c]	0,33 ± 0,17 [b]	52,4 ± 9,6 [b]	0,48 ± 0,09 [b]	31,7 ± 5,2 [b]
APA	0,37 ± 0,06 [b]	46,7 ± 4,7 [b]	0,37 ± 0,16 [b]	46,5 ± 7,3 [c]	0,33 ± 0,05 [b]	52,9 ± 3,4 [b]	0,39 ± 0,05 [c]	44,4 ± 5,4 [b]
AA	0,70 ± 0,09 [a]	0	0,63 ± 0,03 [a]	10,0 ± 1,2 [d]	0,73 ± 0,14 [a]	0	0,68 ± 0,02 [a]	3,1 ± 0,1 [c]
AA + HS	0,35 ± 0,07 [b]	50,5 ± 4,9 [b]	0,21 ± 0,13 [c]	70,7 ± 9,1 [a]	0,24 ± 0,12[bc]	65,9 ± 8,5 [a]	0,31 ± 0,14 [bc]	55,1 ± 8,9 [a]
AA + APA	0,14 ± 0,08 [c]	79,8 ± 8,4 [a]	0,31 ± 0,08 [bc]	55,9 ± 3,4 [b]	0,22 ± 0,05 [c]	68,3 ± 6,6 [a]	0,24 ± 0,11 [c]	66,3 ± 9,0 [a]

[1]Os resultados são relatados como média ± desvio padrão de ensaios em triplicado.

[2] Porcentagem calculada em relação ao controle (biofilme tratado com solução tampão de fosfato).

[a-d] Na mesma coluna, as médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente (P <0,05).

Não foram observadas diferenças (*P*> 0,05) entre os valores de IFB ou reduções percentuais de biofilmes produzidos pelos quatro isolados de *S. aureus* tratados com HS e APA individuais, exceto para o isolado P24, cujo IFB para HS foi maior que APA. Esses resultados são consistentes com os relatados por Lee et al. (2016), que descreveram que o uso de APA na concentração de 0,5% removeu com eficiência as células aderidas de *S. aureus* de materiais plásticos. Em outro estudo, Chino et al. (2017) relataram que o APA a 0,3% foi eficiente contra cepas de *S. aureus*, embora os autores tenham observado que os biofilmes de *S. aureus* foram resistentes ao tratamento com HS na concentração de 0,1%.

Em nosso estudo, o tratamento com AA apenas apresentou valores de IFB semelhantes aos controles (*P*> 0,05) e leves reduções (até 10,0 ± 1,2%) nos biofilmes, quando comparado aos demais tratamentos individuais (HS e APA). Porém, a combinação de AA com HS ou APA resultou em maiores reduções (*P* <0,05) do IFB para os biofilmes formados pelos isolados P16 e P24, cujos valores foram 68,3 ± 6,6 e 66,3 ± 9,0%, respectivamente. A maior (*P* <0,05) redução de IFB (79,8 ± 8,4%) foi alcançada com a combinação de APA e AA em biofilmes formados pelo isolado P01F2T1, enquanto o isolado P01F5T2 teve maior redução de IFB (*P* <0,05) após o tratamento com HS e AA (70,7 ± 9,1%). É importante ressaltar que nenhum tratamento foi capaz de reduzir completamente o IFB dos biofilmes formados pelos isolados de *S. aureus* avaliados neste trabalho.

Biofilmes de *S. aureus* apresentam maior resistência ao processo de sanitização, resultando em menor inibição e remoção em superfícies como aço inoxidável e vidro (LEE et al., 2015), mas principalmente em poliestireno e polipropileno (KIM et al., 2017). Souza et al. (2014) observaram que APA (30 mg /L) e HS (250 mg/L) não foram eficientes na remoção de células de *S. aureus* aderidas em superfícies de polipropileno e aço inoxidável incubadas por 72 h, condições semelhantes ao presente estudo na produção de biofilmes maduros, onde os biocidas não foram capazes de remover completamente os biofilmes aderidos. Nesse contexto, a inserção de enzimas em combinação com biocidas oferece uma alternativa para a remoção de biofilmes em superfícies, por meio de mecanismos como a degradação dos componentes da matriz do biofilme, o que facilita a inativação e remoção de células durante os procedimentos de limpeza (THALLINGER et al., 2013; GONÇALVES et al., 2020).

O maior efeito dos tratamentos combinados com enzima e biocida em comparação com os tratamentos individuais em biofilmes de *S. aureus* em microplacas

de poliestireno cultivadas por 72 h foi confirmado por contagem de célulascultiváveis, conforme ilustrado na Tabela II.

Tabela 2. Contagem de células cultiváveis e respectivas reduções de biofilmes monoéspecies de *S. aureus* em microplacas de poliestireno, após o tratamento com hipoclorito de sódio (HS, 0,5%, v/v), ácido peracético (APA, 0,3%, v/v) e alfa-amilase (AA, 100 mg/mL, v/v), individualmente ou em combinação.

Tratamento	P01F2T1		P01F5T2		P16		P24	
	Contagem (Log UFC/poço)[1]	Redução[2] (%)	Contagem (Log UFC/poço)[1]	Redução[2] (%)	Contagem (Log UFC/poço)[1]	Redução[2] (%)	Contagem (Log UFC/poço)[1]	Redução[2] (%)
Controle	4,46 ± 0,3 [a]	-	4,37 ± 0,6 [a]	-	5,74 ± 0,7 [a]	-	4,99 ± 0,8 [a]	-
HS	2,70 ± 0,1 [b]	39,5 ± 2,0 [b]	3,60 ± 0,4 [b]	19,2 ± 1,8 [d]	2,00 ± 0,4 [b]	65,2 ± 1,3 [a]	2,32 ± 0,2 [c]	53,5 ± 4,8 [b]
APA	2,45 ± 0,2 [b]	45,2 ± 2,4 [c]	2,65 ± 0,5 [bc]	40,6 ± 1,6 [c]	2,95 ± 0,6 [b]	48,6 ± 1,6 [c]	2,97 ± 0,1 [b]	40,45 ± 2,5 [c]
AA	4,00 ± 0,5 [a]	10,3 ± 0,7 [d]	4,36 ± 0,7 [a]	2,1 ± 0,2 [e]	5,03 ± 0,5 [a]	12,4 ± 2,0 [d]	4,52 ± 0,3 [a]	9,4 ± 1,0 [d]
AA + HS	2,00 ± 0,8 [bc]	55,2 ± 1,7 [a]	1,95 ± 0,2 [d]	56,2 ± 1,3 [a]	2,51 ± 0,7 [b]	56,3 ± 1,9 [b]	2,00 ± 0,6 [cd]	59,9 ± 6,7 [b]
AA + APA	2,00 ± 0,2 [c]	55,2 ± 1,3 [a]	2,41 ± 0,3 [c]	45,9 ± 1,7 [b]	2,41 ± 0,4 [b]	56,4 ± 1,8 [b]	1,30 ± 0,4 [d]	73,9 ± 4,1 [a]

[1]Os resultados são relatados como média ± desvio padrão de ensaios em triplicado. [2] Porcentagem calculada em relação ao controle (biofilme tratado com solução tampão de fosfato) [a-d] Na mesma coluna, as médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente (P <0,05).

Tratamentos individuais de HS ou APA de todos os isolados de *S. aureus* testados resultaram em contagens mais baixas (P <0,05) de suas respectivas células planctônicas (intervalo: 2,00 ± 0,4 a 3,60 ± 0,4 UFC /poço), quando comparados com os controles (intervalo: 4,37 ± 0,6 a 5,74 ± 0,7 UFC/poço). No entanto, contagens mais baixas (P <0,05) foram observadas para os tratamentos combinados (HS+ AA, APA + AA). As contagens para o tratamento de HS e AA combinados variaram de 1,95 ± 0,2 a 2,51 ± 0,7 log UFC/ poço, enquanto os valores para biofilmes tratados com APA e AA variaram de 1,30 ± 0,4 a 2,41 ± 0,4 log UFC / poço. Esses resultados são coerentes com o IFB obtido para os biofilmes tratados (Tabela I), em que o tratamento com APA e AA demonstrou maiores reduções nos biofilmes. Araújo et al. (2017) também observaram que o uso associado de protease e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) contra biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* aumentou a redução em cerca de 1,93 log UFC/ cm^2, corroborando assim sobre o uso de enzimas como potenciais agentes complementadores de produtos comerciais biocidas para reduzir biofilmes em superfícies.

Em comparação com os controles, o AA (100 mg/mL) sozinho teve efeitos não significativos nas contagens de células cultiváveis de *S. aureus*, resultando em reduções menores de biofilmes variando de 2,41 ± 0,4 a 12,4 ± 2,0%. Assim, Mnif et al. (2020) descobriram que em altas concentrações (500 mg /mL) de amilases não foram eficazes contra biofilmes de *Macrococcus caseolyticus*. Em contraste, Craigen et al. (2011) observaram que o uso de AA em biofilmes de *S. aureus* formados durante 18 h levou a uma redução de 79%. No presente estudo, o leve efeito do AA nos biofilmes maduros após 72 h pode ser explicado pelo maior grau de formação do biofilme, que confere maior proteção ao biofilme e dificulta sua remoção das superfícies devido à matriz polimérica composta por polissacarídeos, eDNA e proteínas (COMBROUSE et al., 2013; WEBER et al., 2019). Oliveira et al. (2010) observaram que a maturação dos biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 19111 foi concluída 72 a 144 horas após a adesão inicial às superfícies, durante as quais o crescimento da densidade da população celular resultou em aumento da espessura do biofilme. Consequentemente, biofilmes maduros são mais resistentes a tratamentos individuais com HS ou APA, quando comparados com células microbianas planctônicas (LEE et al., 2016; 2017).

A formação e sobrevivência de biofilmes de *S. aureus* em ambientes leiteiros estão diretamente relacionadas às características físico-químicas do leite, uma vez que compostos como vitaminas, minerais e cálcio participam diretamente na formação de

resíduos em superfícies e tubulações, contribuindo para o crescimento microbiano em o local (MIGUEL et al.,2014). Nesse contexto, para evitar que os biofilmes atinjam o estágio de maturidade, operações unitárias como limpeza no local (CIP) sãoconsideradas a melhor estratégia de controle na indústria de alimentos (SREY et al., 2013). As células de *S. aureus* têm grande capacidade de formar biofilmes em superfícies de poliestireno e aço inoxidável, devido a fatores cruciais na adesão microbiana como a hidrofobicidade na superfície (LEE et al., 2017). Essa adesão e subsequente formação de biofilme fornecem as condições para a sobrevivência das células bacterianas no meio ambiente, diminuindo também a eficácia dos procedimentosde CIP no ambiente de processamento de alimentos (LIU et al., 2019). No presente estudo, foi observada redução parcial dos biofilmes maduros de isolados de *S. aureus* após tratamentos com HS (0,5%) ou APA (0,3%). O fato de que esses biocidas comerciais amplamente usados nas indústrias de alimentos não foram eficazes contra cepas de *S. aureus* isoladas de fazendas leiteiras, justifica a sua persistência nas indústrias de laticínios. Embora os tratamentos combinados (enzima-biocida) não tenham atingido a redução completa dos biofilmes maduros de *S. aureus*, o aumento da redução proporcionado por HS + AA ou APA + AA indicou uma estratégia promissora que pode ser útil para limpar equipamentos, utensílios e outras superfícies no processamento de laticínios.

CONCLUSÃO

Biofilmes maduros formados em placas de poliestireno por quatro *S. aureus* isolados de fazendas leiteiras foram parcialmente reduzidos após tratamentos com HS (0,5%, v/v) ou APA (0,3%, v/v), enquanto AA (100 mg /mL) não foi eficaz para a redução do biofilme. No entanto, maiores reduções no IFB e nas contagens de biofilme cultiváveis foram observadas em biofilmes tratados com HS + AA ou APA + AA. Embora qualquer tratamento estudado tenha sido capaz de remover completamente os biofilmes de *S. aureus* no poliestireno, as combinações biocida-enzima avaliadas neste estudo oferecem uma estratégia promissora para aumentar a eficiência dos procedimentos CIP, especialmente quando aplicados em superfícies que entram em contato direto com alimentos. Mais estudos sobre a combinação enzima-biocida em biofilmes maduros são necessários para definir tratamentos eficientes para a remoção completa de patógenos como *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P.A. et al. **Combination of selected enzymes with cetyltrimethylammonium bromide in biofilm inactivation, removal and regrowth**. Food Research International, v.95, p.101-107, 2017.

AVILA-NOVOA, M.G. et al. **Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico**. Journal of Food Quality, 2018.

BOELS, G. **Enzymatic removal of biofilms: a report**. Virulence, v.2, p.476-478, 2011.

BYUN, K-H. et al. **Efficacy of chlorine-based disinfectants (sodium hypochlorite and chlorine dioxide) on *Salmonella enteritidis* planktonic cells, biofilms on food contact surfaces and chicken skin**. Food Control, v.123, p.1-8, 2021.

CASTRO, M.R. et al. **Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers**. International Dairy Journal, v.68, p.9-16, 2017.

CHINO, T. et al. **Morphological bactericidal fast-actingeffects of peracetic acid, a high-level disinfectant, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing**. Antimicrobial Resistance & Infection Control, v.6, p.1-7, 2017.

COMBROUSE, T. et al. **Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenic lineages with optimization of culture conditions**. Journal of Applied Microbiology, v.114, p.1120-1131, 2013.

CRAIGEN, B. et al. **The use of commercially available alpha-amylase compounds to inhibit and remove *Staphylococcus aureus* biofilms**. The Open Microbiology Journal, v.5, p.21-31, 2011.

FLEMING, D. et al. **Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.61, p.1-9, 2017.

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

FULAZ, S. et al. **Nanoparticle-biofilm interactions: The role of the EPS matrix**. Trends in Microbiology, v.27, p.915-926, 2019.

GALIÉ, S. et al. **Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods**. Frontiers in Microbiology, v.9, p.898, 2018.

GONÇALVES, S.F. et al. **Enzyme-based approaches to control microbial biofilms in dairy processing environments: A review**. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, v.12, p.50-58, 2020.

GONZALEZ, A.G.M. et al. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity**. FEMS Microbiology, v.364, fnx232, 2017.

GUTIÉRREZ, D. etal. **Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces**. Applied and Environmental Microbiology, v.78, p.8547-8554, 2012.

KIM, C.Y. et al. **Resistance of *Staphylococcus aureus* on food contact surfaceswith different surface characteristics to chemical sanitizers**. Journal of Food Safety, v.37, p.1-9, 2017.

KIM, C.Y. et al. **Resistance of *Staphylococcus aureus* on food contact surfaceswith different surface characteristics to chemical sanitizers**. Journal of Food Safety, v.37, p.1-9, 2017.

LEE, S.H.I. et al. **Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Listeria monocytogenes* strains isolated from a Brazilian cheese processing plant**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 53, e00071, 2017.

LEE, S.H.I. et al. **Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants**. Journal of Dairy Science, v.99, p.2384–2390, 2016.

LIU, J. et al. **Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.103, p.4565–4574, 2019.

MEESILP, N.; MESIL, N. **Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk**. Food Science and Biotechnology, v.28, p.289–296, 2019.

MEIRELES, A. et al. **The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry**. Food Research International, v.86, p.140-146, 2016.

MELO, P.C. et al. **NaOCl effect on biofilm produced by *Staphylococcus aureus* isolated from the milking environment and mastitis infected cows**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.34, p.109-113, 2014.

MIGUEL, E.M. et al. **Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.69, p.53-63, 2014.

MNIF, S. **Enzyme-based strategy to eradicate monospecies *Macrococcus caseolyticus* biofilm contamination in dairy industries**. International Dairy Journal, v.100, p.1-10, 2020.

NIU, C.; GILBERT, E.S. **Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure**. Applied and Environmental Microbiology, v.70, p.6951-6956, 2004.

OLIVEIRA, M.M.M. **Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential**. Brazilian Journal of Microbiology, v.41, p.97-106, 2010.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. **Evaluation of antibiofilm effect of benzalkonium chloride, iodophore and sodium hypochlorite against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin**. Journal of Food Science and Technology, v.52, p.5317–5322, 2015.

POIMENIDOU S.V. et al. **Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds**. International Journal of Food Microbiology, v.237, p.164-171, 2016.

PREZZI, L.E. et al. **Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a probiotic Minas Frescal cheese**. Food Microbiology, v.92,103557, 2020.

SOUZA, E.L. et al. **Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers**. Brazilian Journal of Microbiology, v.45, p.67-75, 2014.

SREY, S. et al. **Biofilm formation in food industries: A food safety concern**. Food Control. v.31, p.572-585, 2013.

SREY, S. et al. **Evaluation of the removal and destruction effect of a chlorine and thiamine dilaurylsulfate combined treatment on *L. monocytogenes* biofilm**. Foodborne Pathogens and Disease, v.11, p.658-663, 2014.

STEPANOVIĆ, S. et al. **Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface**. Letters in Applied Microbiology, v.38, p.428-432, 2004.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T.P.K. **α-Amylase production and applications: a review**. Journal of Applied & Environmental Microbiology, v.2, p.166–175, 2014.

THALLINGER, B. **Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms**. Biotechnology Journal, v.8, p.97– 109, 2013.

WEBER, M. et al. **Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and independent methods**. Plos One, v.14, 2019.

WITTE RS, WITTE JS. Statistics. Wiley: Hoboken NJ, 2017.

YUAN, L. et al. **Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.60, p.2277-2293, 2020.