UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAOPEBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

REMOÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS ADERIDOS EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL POR NOVOS PROCESSOS DE SANITIZAÇÃO

SAYMON MENEZES DE SOUZA

OURO BRANCO - MG
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
***CAMPUS* ALTO PARAOPEBA**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

SAYMON MENEZES DE SOUZA

Remoção de biofilmes bacterianos aderidos em superfícies de aço inoxidável por novos processos de sanitização

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del-Rei, para defesa como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre.

*Bolsista UFSJ

Orientador: Prof. Dr. Igor José Boggione Santos
Co-orientadora: Prof. Dr[a]. Patrícia da Luz Mesquita

Ouro Branco
Outubro/2021

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S275r

Souza, Saymon Menezes de Souza.
Remoção de biofilmes bacterianos aderidos em superfícies de aço inoxidável por novos processos de sanitização / Saymon Menezes de Souza Souza ; orientador Igor José Boggione Santos Santos; coorientadora Patrícia da Luz Mesquita Mesquita. -- Ouro Branco, 2021.
115 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2021.

1. Contaminação. 2. Laticínio. 3. Nanotecnologia. 4. Controle de biofilmes. 5. Nanosanitizantes. I. Santos, Igor José Boggione Santos, orient. II. Mesquita, Patrícia da Luz Mesquita, co-orient. III. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA Nº 27 / 2021 - PPGEQ (13.13)

Nº do Protocolo: 23122.033775/2021-13

Ouro Branco-MG, 14 de setembro de 2021.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **SAYMON MENEZES DE SOUZA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 14 DE SETEMBRO DE 2021.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 17/09/2021 11:37)
BOUTROS SARROUH
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQBIO (12.26)
Matrícula: 2028441

(Assinado digitalmente em 16/09/2021 08:26)
IGOR JOSE BOGGIONE SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CEBIO (12.50)
Matrícula: 2255060

(Assinado digitalmente em 16/09/2021 11:18)
HILARIO CUQUETTO MANTOVANI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 773.767.496-91

Para verificar a autenticidade deste documento entre em **https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **27**, ano: **2021**, tipo: **NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA**, data de emissão: **14/09/2021** e o código de verificação: **52c81b1f7e**

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, por me guiar para o caminho certo, em paz e segurança a todo momento.
À minha família pelo carinho e orações.
Aos meus amigos, em especial agradeço ao Jhonatan, à Brunna e à Letícia, por todo suporte na pesquisa e na vida.
Ao meu orientador, pela paciência e competência em ensinar, sendo sempre tão cuidadoso com a pesquisa. Sou muito grato também pelo laço afetivo que foi criado.
Ao grupo de pesquisa Nanotec, em especial à Patrícia, pela ajuda em todos os momentos.
A banca examinadora, em especial à Delaine, pelas contribuições e aos demais professor do PPGEQ que contribuíram de alguma forma com este trabalho.
Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG, UFOP e principalmente a UFSJ, pelo auxílio financeiro e apoio no desenvolvimento da ciência.

A todos aqueles que fazem parte da minha vida e torcem pelo meu sucesso e felicidade. Sem vocês, nada disso seria possível. Muito obrigado!

RESUMO

A presença de biofilmes bacterianos em superfícies de aço inoxidável dos equipamentos de indústrias de alimentos provoca diversos problemas na indústria, principalmente doenças veiculadas por alimentos. Existem limitações quanto ao uso de tratamentos sanitários industriais e com isso, a nanotecnologia pode ser inserida nesta área, como uma importante ferramenta capaz de revolucionar os processos e produtos, mitigando esta problemática. Portanto, este trabalho visa comparar a eficiência de produtos utilizados por indústrias de alimentos, como hipoclorito de sódio (HS), detergente alcalino LAT 300 PLUS, ácido nítrico (AN), soda cáustica (SC) e álcool em gel, em relação com nanoestruturas de prata (AgNP), de quitosana (NQ), de carbonato de cálcio (NC) e de óxido de zinco (ZnOnano), bem como de um nanocompósito de hidrogel com as nanoestruturas, em diferentes concentrações, no controle de biofilmes bacterianos em associação de *Listeria monocytogenes* com *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli* com *Salmonella typhimurium*. Análise antimicrobiana *in vitro* também foi realizada via leitura em placa de 96 poços. Em estágios mais avançados (após 12 dias), os sanitizantes comerciais (HS, LAT, AN e SC) apresentaram uma redução de no máximo 2,00 ciclos log, enquanto os nanosanitizantes (AgNP, NQ e ZnOnano) foram capazes de reduzir entre 3,00 a 7,59 ciclos log. Em relação a análise *in vitro*, o HS não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano até 5,0 $\mu g \cdot mL^{-1}$, enquanto AN e SC apresentaram valores para Concentração Mínima Inibitória abaixo de 2 $\mu g \cdot mL^{-1}$, e os nanosanitizantes (AgNP, ZnOnano, NQ, NC) até 6 $\mu g \cdot mL^{-1}$. A eficiência obtida pelo álcool em gel foi de ~1,47 ciclos log, enquanto os nanosanitizantes tiveram uma eficiência acima de 3 ciclos log. Estes resultados confirmam a superioridade da eficiência de nanoestruturas no controle de biofilmes formados em superfícies de aço inoxidável.

Palavras-chave: contaminação; laticínio; nanotecnologia; controle de biofilmes; nanosanitizantes.

ABSTRACT

The presence of bacterial biofilms in stainless steel surfaces of the equipment, such as tanks and pipes, cause many problems in industry, mainly foodborne diseases. There are some limitations on the use of sanitary treatments and nanotechnology can be insert in this area, as an important tool capable of revolutionize the process and products solving this problem. Therefore, this work aims to compare the efficiency of products used by food industries, as sodium hypochlorite (SH), alkaline detergent LAT 300 PLUS, nitric acid (NA), caustic soda (CS), and alcohol in gel, with nanostructures of silver (AgNP), of chitosan (NC), calcium carbonate (NCC) and of zinc oxide (ZnOnano), alcohol in gel, and also a nanocomposite of hydrogel with nanostructures, in different concentrations, to control bacterial biofilms, from a simulation of biofilm formation of *Listeria monocytogenes* with *Pseudomonas fluorescens*, and *Escherichia coli* with *Salmonella typhimurium* in coupons of stainless steel. *In vitro* analysis was also developed. In advanced stages (after 12 days), the commercial sanitizers (SH, LAT, NA e CS) showed a reduction of a maximum of 2.00 log cycles, while the nanosanitizers (AgNP, NC e ZnOnano) were capable of reducing between 3.00 and 7.59 log cycles. SH at 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ was not capable to inhibit the bacterial growth, while NA and CS showed values of Minimum Inhibitory Concentration below 2 $\mu g \cdot mL^{-1}$, and nanosanitizers (AgNP, ZnOnano, NC, NCC) until 6 $\mu g \cdot mL^{-1}$. The efficiency of alcohol in gel was ~1.47 log cycles, while nanosanitizers had an efficiency higher than 3 log cycles. This result confirms the superiority in the efficiency of nanostructures in dairy-biofilm control.

Keywords: contamination; dairy; nanotechnology; biofilm control; nanosanitizers.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **x**
LISTA DE TABELAS ..... **xi**
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **xii**
1. INTRODUÇÃO **11**
2 OBJETIVOS **13**
2.1 GERAL 13
2.2 ESPECÍFICOS 13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **14**
3.1 DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES BACTERIANOS 14
3.1.1 Estágios dos biofilmes 15
3.1.2 Mecanismos de resistência 19
3.2 CONTAMINAÇÃO EM INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS 20
3.3 INDÚSTRIA DE ALIMENTOS 23
3.3.1 Garantia da segurança de alimentos 23
3.3.2 Laticínios 24
3.4 ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DE BIOFILMES 26
3.4.1 Métodos químicos e alternativos de remoção de biofilmes 28
3.4.2 Nanotecnologia 35
4 MATERIAL E MÉTODOS **38**
4.1 MATERIAL E CONDIÇÃO DE CULTIVO 38
4.2 PREPARAÇÃO DOS SANITIZANTES 38
4.2.1 Obtenção da nanoestrutura de ZnO 38
4.2.2 Obtenção de nanoestruturas de prata 39
4.2.3 Obtenção de nanoestrutura de quitosana 39
4.2.4 Obtenção de nanoestrutura $CaCO_3$ 40
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* 40
4.4 BIOFILME BACTERIANO EM LEITE 41
4.4.1 Formação de biofilme bacteriano 41
4.4.2 Sanitização do biofilme formado 43
4.4.3 Contagem das células aderidas 43
4.4.3.1 Cálculo da eficiência de sanitização 44
4.5 APLICAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO (HIDROGEL PPG/HMC/NANO) 45
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* 46
5.2 CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS 58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 82
7 CONCLUSÃO..... 82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85
APÊNDICE 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de eventos na formação de um biofilme em superfícies e sua complexidade. 16
Figura 2. Produção de fímbria curli (material fibroso extracelular para promover adesão) por E. coli. 18
Figura 3. Biofilme de E. coli em desenvolvimento. 18
Figura 4. Biofilme desenvolvido de *E. coli* com muito material extracelular. 18
Figura 5. Desprendimento da *P. aeruginosa* pela ação de fagos. 18
Figura 6. Perfil epidemiológico dos surtos e doentes por DVA no Brasil de 2000 a 2017. 21
Figura 7. Sistema representativo da formação do biofilme bacteriano. 42
Figura 8. Sistema para sanitização. 43
Figura 9. Atividade antimicrobiana de sanitizantes e nanoestruturas contra *Listeria monocytogenes* avaliado via densidade óptica. 52
Figura 10. Atividade antimicrobiana de sanitizantes e nanoestruturas contra *Pseudomonas fluorescens* avaliado via densidade óptica. 54
Figura 11. Atividade antimicrobiana de macroestruturas contra *Listeria monocytogenes* avaliado em microplaca via densidade óptica. 56
Figura 12. Atividade antimicrobiana de macroestruturas contra *Pseudomonas fluorescens* avaliado em microplaca via densidade óptica. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes características entre as bactérias em vida planctônica e sésseis..... 14
Tabela 2. Sequência de eventos gerais no desenvolvimento de biofilmes bacterianos, suas características e estruturas (informações variam para cada espécie bacteriana). 18
Tabela 3. Métodos de detecção da presença e concentração de biofilmes formados em indústrias..... 28
Tabela 4. Diferentes sanitizantes químicos empregados para remoção de biofilmes formados em indústrias..... 30
Tabela 5. Tecnologias aplicadas em indústrias para remoção de biofilmes. 33
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu g \cdot mL^{-1}$) dos sanitizantes aplicados contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*. 47
Tabela 7. Valores de $UFC \cdot mL^{-1}$, referentes a *Listeria monocytogenes*, antes (controle) e após diferentes tratamentos (sanitizantes comerciais e nanoestruturas de prata, quitosana e óxido de zinco..... 60
Tabela 8. Valores de $UFC \cdot mL^{-1}$, referentes a *Pseudomonas fluorescens*, antes (controle) e após diferentes tratamentos (sanitizantes comerciais e nanoestruturas de prata, quitosana e óxido de zinco..... 62
Tabela 9. Valores de log $UFC \cdot mL^{-1}$ de *Listeria monocytogenes* após diferentes tratamentos com produtos comerciais e nanosanitizantes. 69
Tabela 10. Valores de log $UFC \cdot mL^{-1}$ de *Pseudomonas monocytogenes* após diferentes tratamentos com produtos comerciais e nanosanitizantes. 70
Tabela 11. Avaliação da eficiência de remoção de biofilmes bacterianos de *E. coli* e *S. typhimurium*, aderidos em superfícies de aço inoxidável, com diferentes tratamentos (álcool, hidrogel puro e hidrogel (HG) com nanoestruturas de prata, quitosana e óxido de zinco). 78
Tabela 12. Resumo do potencial de aplicação das nanoestruturas para controle microbiológico em relação a sanitizantes convencionais 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AgNP: Nanopartícula de prata;

AHL: Acil-Homoserina Lactonas;

AN: Ácido nítrico;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

APHA: *American Public Health Association*;

CCD: Centro de Controle e Prevenção de Doenças;

CGMP: Monofosfato Cíclico de Guanosina;

CIM: Concentração Inibitória Mínima;

CIP: *Clean in Place*;

DVA: Doenças Veiculadas por Alimentos;

eDNA: Ácido Desoxirribonucléico extracelular;

EPS: Substâncias Poliméricas Extracelulares;

EUA: Estados Unidos da América;

FAO: *Food and Agriculture Organization*;

FSSC: *Food Safety System Certification*;

GFSI: *Global Food Safety Initiative*;

GRAS: *Generally Regarded as Safe for consumption*;

HACCP: *Hazard Analysis and Critical Control Point*;

HS: Hipoclorito de sódio;

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura;

NC: Nanoestruturas de carbonato de cálcio;

NQ: Nanoestruturas de quitosana;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

P&D: Pesquisa e Desenvolvimento;

PCR: Reação de Cadeia em Polimerase;

pH: Potencial Hidrogeniônico;

PIA: *Polysaccharide Intercellular Adhesin*;

QS: *Quorum Sensing*;

RBQL: Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite;

RNA: Ácido Ribonucléico;

SC: Soda cáustica;

SIMQL: Sistema Inteligente de Monitoramento da Qualidade o Leite Brasileiro;

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

TACCP: *Threat Analysis and Critical Control Point*;

UE: União Europeia;

UFC: Unidade Formadora de Colônias;

UHT: *Ultra High Temperature*;

WGS: *Whole Genome Sequencing*;

ZnOnano: Nanoestruturas de óxido de zinco;

1. INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes bacterianos é um processo natural e frequente há mais de 70 anos na indústria de alimentos e ocasiona prejuízos sociais e econômicos. A principal preocupação está na contaminação de alimentos, a qual atinge cerca de 600 milhões de pessoas (quase 1 a cada 10), provocando sintomas e levando a morte de 420 mil pessoas todo ano de acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde). A realidade do Brasil também é crítica, acometendo 37,2 mil pessoas por ano. Estes números aumentam todo ano o que sugerem a dificuldade em garantir a segurança de alimentos. Portanto, a remoção do biofilme, potencial contaminador dos alimentos processados, é estratégica e essencial para a indústria e o consumidor (Simões *et al.*, 2010; Who, 2015; Saúde, 2020). As principais fontes de contaminação na indústria de alimentos são água, ar, equipamentos, bancada, esgoto, animais, e principalmente os funcionários. Uma vez que estas fontes trazem os microrganismos para a indústria, estes podem aderir e criar uma comunidade na instalação industrial (Marriott *et al.*, 2018).

Os biofilmes são estruturas porosas e complexas compostas por microrganismos mais resistentes aos agentes antimicrobianos quando comparado aos microrganismos de vida planctônica. A sobrevivência e resistência destas células sésseis, presentes nos biofilmes, são acometidas por respostas adaptativas às condições do meio, comunicação entre as células, heterogeneidade e formação de uma matriz extracelular, composta por proteínas, carboidratos, DNA e principalmente substâncias poliméricas extracelulares. (Boari *et al.*, 2009; Martin, 2015).

O controle de biofilmes pode ser realizado com tratamento químico (ácidos, detergentes), físico (ultrassom, altas pressões) e/ou biológico (enzimas, antibióticos). Porém, essas estratégias possuem limitações e os sanitizantes convencionais, utilizados em indústrias, têm maior dificuldade para eliminar os biofilmes por selecionarem microrganismos resistentes (Srey *et al.*, 2013). Portanto, o uso da nanotecnologia se mostra extremamente necessário para mitigar estes problemas.

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem se tornado uma alternativa para revolucionar o setor de alimentos. A nanotecnologia é capaz de manipular materiais obtendo tamanho entre 1 a 100 nm, em pelo menos uma das dimensões e, principalmente, apresentam propriedades novas e/ou otimizadas quando comparado ao material não nanoestruturado. Dentre os benefícios da nanotecnologia, sua aplicação em sanitizantes, apesar de recente, já é comprovada com ensaios antimicrobianos destacando sua

superioridade em relação a outros materiais na segurança de alimentos. A superioridade das nanoestruturas pode ser comprovada pela capacidade de serem utilizadas em baixas concentrações, e apresentam mecanismos antimicrobianos como causar danos à parede celular bacteriana, às proteínas, ao DNA e à componentes internos, liberação de íons, e causar estresse oxidativo. Essa diversidade de mecanismos exibidos pelas nanoestruturas sugere que as bactérias são improváveis de apresentar resistência (Adeyeye e Fayemi, 2019; Niño-Martínez *et al.*, 2019).

De acordo com o Web of Science, de 1945 até 30 de março de 2021, foram publicados 16.835 trabalhos sobre "biofilm control", sendo apenas 176 relacionados à laticínios ("dairy") e 113 relacionados à nanotecnologia ("nanotechnology"). Os resultados de nanotecnologia em sanitizantes ("nanotechnology in sanitizers") são ainda mais reduzidos, apresentando somente 5 trabalhos publicados. A plataforma Scopus (Elsevier) confirma este resultado, com 7 trabalhos publicados neste tema. Ou seja, a literatura ainda é incipiente em relação a nanotecnologia para controle de biofilmes em laticínios e esses números tão baixos justificam a relevância e potencial de inovação deste trabalho, considerando ainda que os nanosanitizantes apresentam efeito superior aos sanitizantes convencionais. Em ambas plataformas também é possível notar um aumento no número total de publicações sobre biofilmes ao longo dos últimos anos, confirmando que ainda há uma necessidade de melhores alternativas para solucionar este problema industrial.

Considerando o número de indústrias que são prejudicadas pela formação de biofilmes bacterianos e pelas restrições quanto ao uso de sanitizantes, o estudo da remoção desses biofilmes utilizando nanomateriais é de alta relevância para a indústria, a ciência e a sociedade. Portanto, este trabalho visa simular a formação de biofilmes bacterianos em superfície de aço inoxidável de laticínios, verificar a eficiência de diferentes nanosanitizantes e nanocompósitos na remoção destes biofilmes.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de sanitizantes convencionais e nanoestruturas e sua eficiência na remoção do biofilme bacterianos formados em superfície de aço inoxidável usado na indústria de alimentos.

2.2 ESPECÍFICOS

i. Simular a formação e desenvolvimento de biofilmes em associação de *Listeria monocytogenes* (ACTC 15313) com *Pseudomonas fluorescens* (NCTC 10059) em placas de aço inoxidável com o tempo, tendo o leite como substrato.

ii. Simular processo de sanitização industrial com hipoclorito de sódio, ácido nítrico, soda cáustica, LAT 300 Plus e nanoestruturas de: prata, óxido de zinco, e quitosana.

iii. Avaliar a eficiência dos sanitizantes utilizados a partir da quantificação das células aderidas nas placas antes e depois do tratamento de sanitização via técnica de *swab* e *spread plate*.

iv. Avaliar a Concentração Mínima Inibitória dos sanitizantes utilizados a partir de atividade antimicrobiana *in vitro*.

v. Avaliar a eficiência de um hidrogel de hidroximetil celulose contendo nanoestruturas, a partir da quantificação das células aderidas em placas de aço inoxidável antes e depois do tratamento via técnica de *swab* e *spread plate*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES BACTERIANOS

Em 1684, a partir de um simples microscópio ótico, Leeuwenhoek descobriu uma comunidade de microrganismos aderida na superfície do dente. Esse evento foi considerado como a primeira observação de um biofilme bacteriano (Shi e Zhu, 2009), que pode ser definido como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície, sendo formado por apenas uma espécie ou em associação, gram-positivas ou gram-negativas e embebidos em uma matriz extracelular composta por proteínas, DNA extracelular (eDNA), lipopeptídeos e/ou exopolissacarídeos (Cherif-Antar *et al.*, 2016; Ghatak *et al.*, 2018).

As bactérias em sua forma planctônica, células unitárias de vida livre, apresentam maior taxa de crescimento e reprodução. Porém, cerca de 99 % da população de bactérias são encontradas de forma sésseis, vivendo em biofilmes, devido a diversos fatores (Tabela 1). Primeiramente, o biofilme pode aumentar a tolerância da bactéria em condições ambientais severas. Devido a sua forte adesão à superfície a bactéria pode evitar de ser removida. E por isso, células sésseis são 1000 vezes mais resistentes que em sua forma planctônica. Ainda, a matriz extracelular garante proteção contra agentes químicos por limitar a difusão destes compostos. O biofilme reduz a mobilidade e aumenta a densidade celular, promovendo excelentes condições para a troca de DNA (plasmídeo), via conjugação, o que leva a resistência à antibióticos (Vu *et al.*, 2009; Rabin *et al.*, 2015).

Tabela 1. Diferentes características entre as bactérias em vida planctônica e sésseis.

Planctônicas	Sésseis
Células suspensas e isoladas	Células numerosas e agregadas
Pequena matriz capsular	Suportada por matriz de EPS
Fisiologia homogênea e ativa	Fisiologia heterogênea
Sinalização intracelular não crítica para divisão celular	Sinalização intracelular crítica para crescimento
Células suscetíveis a antibióticos	Maior resistência a antibióticos
Células reconhecidas e alcançadas por respostas imunes	Células inacessíveis

Adaptado de Behlau e Gilmore (2008).

3.1.1 Estágios dos biofilmes

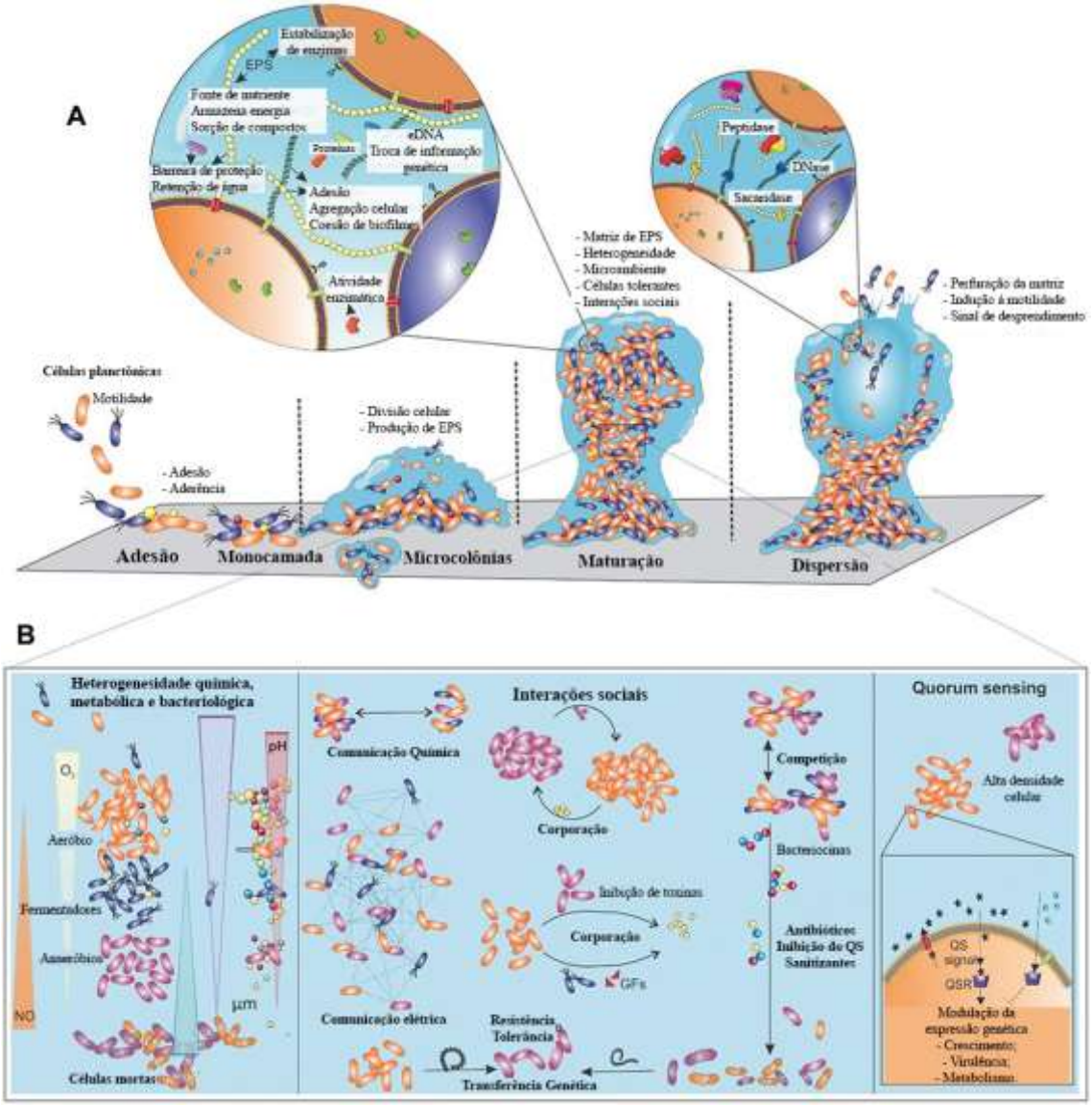
A formação e desenvolvimento dos biofilmes é afetado por diversas variáveis: espécie microbiana, velocidade do fluxo, características físicas e químicas do substrato, carga orgânica (Murthy e Venkatesan, 2008), propriedades do material, concentração de nutrientes (Srey *et al.*, 2013), capacidade de mobilidade celular, comunicação intracelular (Flemming e Wingender, 2010), osmolaridade, ferro, oxigênio, temperatura (O'toole *et al.*, 2000), energia disponível, orientação da bactéria, condições de pressão e pH (Garrett *et al.*, 2008). Portanto, é difícil definir características para os biofilmes e a literatura apresenta informações generalizadas (Murthy e Venkatesan, 2008). Além do tipo da bactéria e do substrato, o tempo de formação do biofilme irá depender da frequência e eficiência da limpeza e desinfecção, uma vez que as superfícies em contato com o alimento recebem tratamento várias vezes ao dia, enquanto outras superfícies como paredes tem limpeza geralmente uma vez ao dia (Simões *et al.*, 2010).

A temperatura é um dos fatores mais influentes no crescimento bacteriano, uma vez que cada bactéria apresenta uma temperatura ótima na qual terá máxima replicação. Outro fator de grande importância é a disponibilidade de nutrientes, uma vez que o mecanismo básico de um biofilme envolve a conversão de nutrientes dissolvidos em biomassa. Com isso, limitar os nutrientes pode ser uma estratégia para controlar o desenvolvimento de biofilmes (Murthy e Venkatesan, 2008).

Além disso, Vu *et al.* (2009) descrevem que o grau de adesão é influenciado pela presença de flagelos, nível de produção de EPS e a hidrofobicidade celular, uma vez que a velocidade de adesão é maior em superfícies hidrofóbicas e apolares.

A formação de biofilmes é estabelecida por processos físicos, químicos e biológicos. Os mecanismos de adesão (ligação entre célula e substrato) e coesão (ligação entre células) determinam as propriedades dos biofilmes. Autores descrevem o processo de acumulação dos microrganismos em diversos estágios, mas basicamente são: (1) adesão inicial; (2) desenvolvimento inicial da estrutura do biofilme; (3) maturação; (4) dispersão. Este processo é representado pela Figura 1 e Tabela 2.

Figura 1. Sequência de eventos na formação de um biofilme em superfícies e sua complexidade. (A) Estágios (adesão inicial, formação de micro colônias, maturação e dispersão) de desenvolvimento de biofilmes. (B) A formação de EPS e modulação da comunidade a partir de interações sociais entre as células.



Adaptado de Barzegari *et al.* (2020).

Durante o primeiro estágio, as interações entre bactéria e superfície são dadas por forças eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals. Inicialmente, a adesão pode ser reversível, possibilitando o retorno das células à forma planctônica, mas com a evolução do biofilme se torna irreversível, devido a formação de anexos pela bactéria como flagelo, pili, fímbrias e, posteriormente, exopolissacarídeos. Com isso, supera a repulsão eletrostática inicial entre célula e substrato. A adsorção pode ser feita de forma passiva ou ativa e qualquer material pode ser vulnerável a formação de biofilme, como plástico,

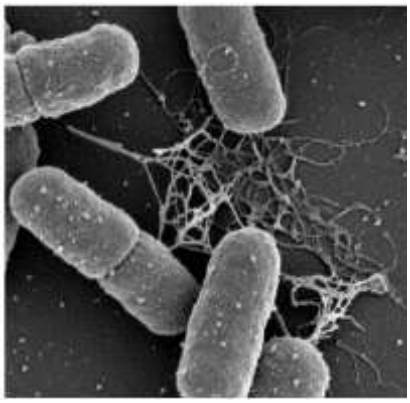
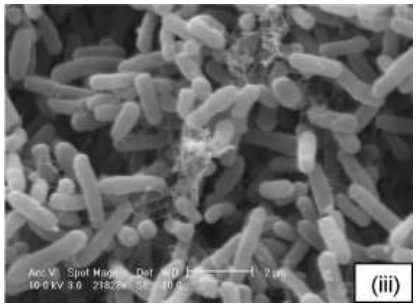
madeira, vidro, metal e alimentos. Proteínas específicas, as autolisinas, promovem a ligação em superfícies abióticas. Essas são associadas à superfície por interação iônica ou hidrofóbica e possui duas funções: enzimática, com a ação de hidrolases na camada de peptídeoglicano e adesiva (Simões *et al.*, 2010; Arciola *et al.*, 2012; Srey *et al.*, 2013; Cappitelli *et al.*, 2014).

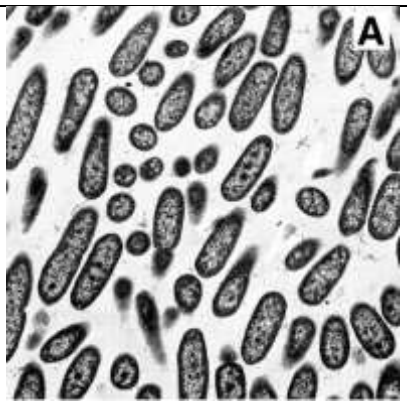
No segundo estágio, a formação de micro colônias é resultante da acumulação e crescimento de bactérias planctônicas graças a comunicação célula-célula (*Quorum-Sensing*). A produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS) aumenta a força de ligação entre a bactéria e o substrato e estabiliza a colônia contra qualquer estresse ambiental (Srey *et al.*, 2013).

No terceiro estágio é observado uma evolução do biofilme para uma estrutura organizada que pode ser plana ou na forma de um cogumelo, dependente da fonte de nutriente (Srey *et al.*, 2013). Uma importante contribuição para adesão célula-célula é devido a produção de PIA - adesina intercelular polissacarídica (do inglês, *Polysaccharide Intercellular Adhesin*). Apesar de ser muito presente em bactérias *Staphylococcus spp.*, o processo de síntese de PIA também é observado em bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *Escherichia coli* (Rohde *et al.*, 2010; Arciola *et al.*, 2012).

A dispersão do biofilme, último estágio, pode levar a disseminação da bactéria, podendo causar problemas de saúde. Esse processo de desprendimento é crucial para a propagação e auto renovação das bactérias. A dispersão pode ocorrer de forma ativa, por mecanismos iniciados pela bactéria quando o ambiente não está favorável para sua sobrevivência ou de forma passiva, proporcionada pelo aumento de perturbações externas, como degradação enzimática do EPS, inibição da produção da matriz e ação de moléculas surfactantes. A dispersão e expressão das enzimas efetoras são controladas por diversos fatores, como o óxido nítrico e di-CGMP (Monofosfato cíclico de guanosina). Existem basicamente três modos de dispersão: (a) erosão, o lançamento contínuo de células unitárias; (b) descamação, o desprendimento repentino de maiores porções de biofilmes, geralmente no último estágio de maturação; e (c) semeadura, o rápido lançamento de várias células unitárias de cavidades internas. Esses fenômenos podem acontecer de forma passiva ou ativa (exceto o modo de semeadura que só ocorre ativamente) (Cappitelli *et al.*, 2014; Gu e Ren, 2014; Arciola *et al.*, 2018).

Tabela 2. Sequência de eventos gerais no desenvolvimento de biofilmes bacterianos, suas características e estruturas (informações variam para cada espécie bacteriana).

Estágio	Características	Forma de vida	Tempo	Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV)
Adesão inicial	Organelas extracelular auxiliam no processo de adesão	Planctônica	Cerca de 8 h	**Figura 2.** Produção de fímbria curli (material fibroso extracelular para promover adesão) por *E. coli*. 
Formação de micro colônias	Secreção de EPS, *Quorum Sensing* e produção de PIA	Biofilme	2 a 4 dias	**Figura 3**. Biofilme de *E. coli* em desenvolvimento. 
Maturação	Estrutura organizada e extremamente protegida	Biofilme	6 a 10 dias	**Figura 4.** Biofilme desenvolvido de *E. coli* com muito material extracelular.
Dispersão	Renovação do biofilme	Planctônica	Acima de 10 dias	**Figura 5.** Desprendimento da *P. aeruginosa* pela ação de fagos.



Adaptado de Hunt *et al.* (2004); El Abed *et al.* (2012); Tsoligkas *et al.* (2012).

3.1.2 Mecanismos de resistência

A compreensão dos mecanismos de resistência contra produtos químicos e antibióticos é alvo de diversas pesquisas. Um dos principais mecanismos de defesa dos biofilmes são as Substâncias Poliméricas Extracelulares, EPS. Dependendo da colônia, a matriz extracelular pode ser composta de 10-25 % de células e 75-90 % de EPS. Este material atua como barreira física, adsorvendo cátions, metais, carboidratos, proteínas, ácido nucleico, lipídeos e toxinas, e protegendo contra radiação ultravioleta, mudança de pH, dessecação e choques osmóticos. E ainda, garante ao biofilme diferentes características fenotípicas, fisiológicas, metabólicas e de transcrição genética (Garrett *et al.*, 2008; Andrade Boari *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2009).

A estrutura, propriedades e componentes variam de um EPS para outro (Simões *et al.*, 2010; Rabin *et al.*, 2015). Em geral, EPS são compostas por polissacarídeos, DNA, proteínas (com massa molecular entre 10 kDa e 200 kDa) e lipídeos. As camadas externas contem carboidratos (majoritariamente hexose e em minoria pentose) e ácido urônico. Os principais substituintes de carboidratos são ésteres de acetato, piruvitos, metanoato e succinatos. A presença de polipeptídeos na matriz de EPS é característica de bactérias Gram-positivas (Czaczyk e Myszka, 2007; Gu e Ren, 2014).

A síntese de biopolímeros extracelulares é dependente da disponibilidade de carbono e nitrogênio no ambiente. Geralmente, o carboidrato é utilizado como fonte de carbono e energia e os sais de amônio e aminoácidos como fonte de nitrogênio. Uma alta concentração de glicose favorece a formação de EPS. Além dos nutrientes, a máxima produtividade de EPS é obtida em pH entre 5,5 e 6,5 e temperatura entre 26,0 e 31,0 ºC (mas estudos mostram a produção em temperaturas inferiores a 10,0 ºC) (Czaczyk e Myszka, 2007).

Os biofilmes podem ser considerados como uma estrutura não rígida e essa característica se deve essencialmente aos EPS. Esses também são chamados de "a matéria escura dos biofilmes", por causa da sua grandeza e dificuldade em analisá-los. Os métodos de isolamento de EPS ainda são um desafio e necessitam adaptação. Centrifugação, filtração, aquecimento, mistura, sonicação e tratamentos com resina de troca iônica têm sido aplicados, apesar de certamente levar a uma contaminação com componentes citoplasmáticos (Flemming e Wingender, 2010).

A resposta ao estresse metabólico também é considerada como um mecanismo de resistência que promove uma modificação genética das células bacterianas. Algumas dessas modificações são induzidas para garantir sua tolerância à sanitizantes (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). QS é conhecido como um dos caminhos regulatórios para modificação genética e produção de EPS. Em geral, o processo de QS envolve a produção, lançamento e detecção de moléculas sinalizadoras, que permitem a comunicação entre as células e regula a expressão gênica, formando a parte fundamental da matriz extracelular. Esses sinais podem se apresentar de diversas formas, como pequenos peptídeos, acil-homoserina lactonas (AHL) e quinolonas. As bactérias, geralmente Gram-negativas, utilizam AHL para coordenar a expressão de vários genes virulentos e induzir uma cascata de eventos regulatórios e por isso o QS aumenta a tolerância à antibióticos. Estratégias para manipular o QS podem ser aplicadas para prevenir a formação de biofilmes (Ding *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017; Passos Da Silva *et al.*, 2017).

Outro mecanismo de resistência pode ser atribuído à heterogeneidade da população do biofilme. A diferenciação celular pode ser uma consequência da redução de oxigênio e nutrientes ao longo das camadas do biofilme. Portanto, as células irão apresentar diferentes respostas aos antimicrobianos, sendo alguns agentes capazes de matar as células das camadas superiores e outros são capazes de matar células do interior, como mencionado por De La Fuente-Núñez *et al.* (2013). Ou seja, devido a excelente organização dos biofilmes os sanitizantes apresentam dificuldade para alcançar os sítios de ação. Os autores ainda descrevem que células resistentes são mais capazes de sobreviver em condições de estresse, como na ação de um antibacteriano.

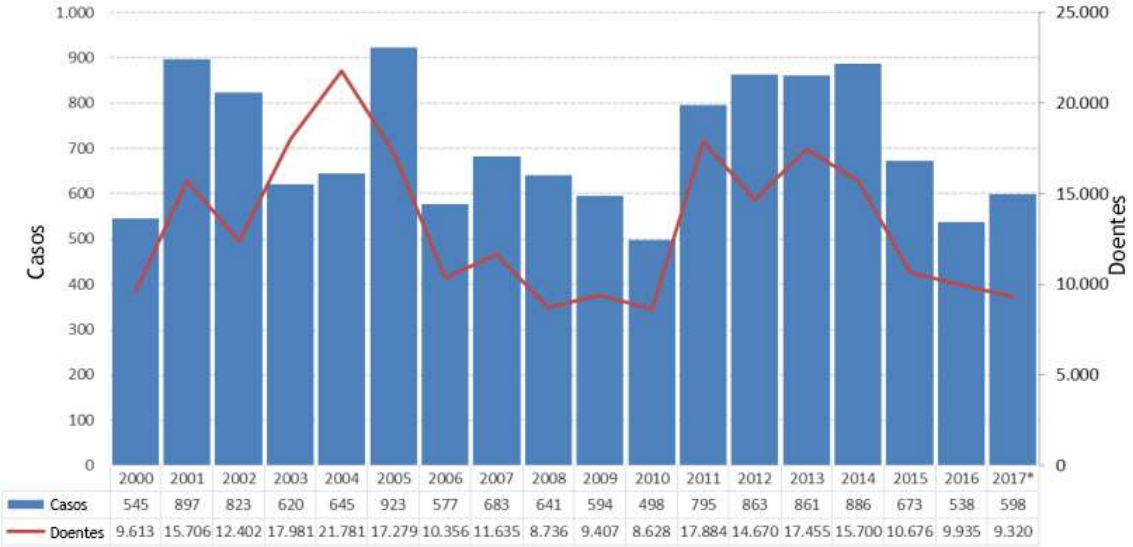
3.2 CONTAMINAÇÃO EM INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

A presença de biofilmes em indústrias de alimentos pode colocar a saúde humana em risco, dependendo das espécies bacterianas presentes. As principais superfícies para desenvolvimento de biofilmes variam de acordo com a indústria, podendo ser

pasteurizadores, membranas de osmose reversa, mesas, luvas, silos de armazenamento, tubos, embalagens, dentre outras (Galie *et al.*, 2018). Segundo Reynolds e Dolasinski (2019), o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CCD) relata que os surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) tem como principais causas: a compra de alimentos de fontes não seguras, higiene pessoal precária, abuso do tempo-temperatura, contaminação cruzada e limpeza e sanitização imprópria.

No Brasil, segundo Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), acontecem anualmente cerca de 700 surtos de DVA, abrangendo 13 mil doentes e 10 óbitos (Brasil, 2020a). Dados semelhantes foram divulgados pelo Ministérios da Saúde e de acordo com o perfil epidemiológico, demonstrado pela Figura 2, há uma série histórica de surtos de DVA no Brasil de 2000 a 2017, apresentando valores significativos de letalidade (Brasil, 2020b).

Figura 6. Perfil epidemiológico dos surtos e doentes por DVA no Brasil de 2000 a 2017.



	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*
Casos	545	897	823	620	645	923	577	683	641	594	498	795	863	861	886	673	538	598
Doentes	9.613	15.706	12.402	17.981	21.781	17.279	10.356	11.635	8.736	9.407	8.628	17.884	14.670	17.455	15.700	10.676	9.935	9.320

Adaptado de Brasil (2020b).

De acordo com o Banco Mundial, os países com economia baixa e média apresentam um alto impacto econômico anual causado por alimentos não seguros, tendo custo de aproximadamente US$ 110 bilhões, devido à perda de produtividade e despesas médicas. Relatam ainda que grande parte destes custos poderiam ser evitados pela adoção de medidas preventivas durante toda a cadeia produtiva (Bank, 2018).

De acordo com a OMS, alimentos contaminados veiculam mais de 200 doenças, desde diarreia até câncer, sendo *Salmonella*, *Campylobacter* e *Echerichia coli*

enterohemorrágica os patógenos mais comuns em todo o mundo, principalmente em produtos de origem animal (Who, 2015; 2019).

Dentre os alimentos, o leite é um produto muito perecível e vulnerável a contaminação por diversos microrganismos, devido a seu alto conteúdo nutricional, resultando na sua deterioração e seus derivados. As principais fontes de contaminação do leite cru são: na ordenha, a partir de agentes oriundos do campo (como contaminação fecal e infecções nas úberes das vacas); equipamentos e tanques; ausência de condições de refrigeração; meios de transporte insatisfatórios (Shojaei e Yadollahi, 2008); e água utilizada no maquinário (Simões *et al.*, 2010). Pesquisas também constatam a presença dos agentes *Listeria monocytogenes* (Barancelli *et al.*, 2011), *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* (Samaržija *et al.*, 2012), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Salmonella* (Furukawa *et al.*, 2010; Martin, 2015), *Bacilus cereus* e *Pseudomonas* (Lindsay *et al.*, 2002; Kumari e Sarkar, 2016) em produtos lácteos.

Pseudomonas fluorescens é considerado como um dos principais organismos causadores da deterioração do leite, por produzir enzimas lipolítica e proteolítica termotolerantes, reduzindo a qualidade e vida útil do leite. É uma bactéria gram-negativa, aeróbica, não fermentativa, apresenta aspecto psicrotrófico (pode crescer a 4 ºC) e mesófilo (crescimento entre 20 a 30 ºC) (Rossi *et al.*, 2016; Nishimura *et al.*, 2017). A primeira rota de ação da *Pseudomonas spp.* é dada com a produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas secretadas no leite cru durante o armazenamento. Estas enzimas se mantem ativas mesmo após a pasteurização e UHT. Sua segunda rota de ação acontece no processo de pós-pasteurização, causando deterioração do leite mesmo sob refrigeração (Simões *et al.*, 2010). Ainda, Dynes *et al.* (2009) relatam que para resistir a diferentes biocidas, *P. fluorescens* é capaz de alterar a morfologia celular, composição de EPS e viabilidade celular.

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, com formação de biofilmes entre 4 e 37 ºC, e a partir da ingestão de alimentos contaminados é a causadora de listeriose e, consequentemente, meningite, aborto espontâneo e natimorto. É capaz de persistir por vários anos nas indústrias de alimentos, podendo causar contaminação cruzada. Ainda, autores relatam que é improvável erradicar *L. monocytogenes* permanentemente, devido sua presença onipresente no meio ambiente e pelas diversas formas de sobrevivência (Buchanan *et al.*, 2017; Colagiorgi *et al.*, 2017).

Echerichia coli, bactéria gram-negativa, em forma de bastonetes, é bastante conhecida pela sua rápida replicação e crescimento em diversas condições. É responsável

por várias doenças gastrointestinais e, quando não tratado, causando a morte. Pode sobreviver em temperaturas amenas, como 4 ºC, ou em ambientes quentes, acima de 40 ºC, apresentando temperatura ótima de 36 a 40 ºC. *E. coli* é capaz de interagir com outros microrganismos em todos habitats (Jang *et al.*, 2017). A maioria das cepas de *E. coli* são inofensivas ao ser humano e até fazem parte da microbiota intestinal. Mas algumas cepas, como a *E. coli* Enterohemorrágica, podem levar a infecções e DVAs. Uma característica preocupante desta bactéria em laticínios é seu mecanismo de resistência em ambientes ácidos, envolvendo os ácidos acético, cítrico, propiônico e/ou lático. Esta propriedade garante sua sobrevivência em diversas indústrias de alimentos (Galie *et al.*, 2018).

Salmonella typhimurium é uma bactéria gram-negativa, flagelada, não fermentadora de lactose, apresenta forma de bastonetes e são bacilos anaeróbicos facultativos. Apresentam temperatura de crescimento entre 5 - 47 ºC, e temperatura ótima a 37 ºC e a partir de intoxicação alimentar, pode causar febre, diarreia e vômito. Estudos confirmaram, a partir da regulação gênica, que a persistência e sobrevivência a longo prazo de *Salmonella spp.* é propiciada pelos componentes da matriz extracelular, fímbrias e celulose (Wang *et al.*, 2016; Graziani *et al.*, 2017).

Outros malefícios causados pela existência de biofilmes bacterianos são: Corrosão Microbiologicamente Influenciada dos equipamentos, diminuição da transferência de calor entre superfícies, odores indesejáveis, a perda de qualidade das matérias-primas e dos produtos e, consequentemente, a redução na eficiência da produção. A deterioração das superfícies é intensificada com a evolução do biofilme (Murthy e Venkatesan, 2008).

Portanto, é fundamental conhecer a estrutura e sua fragilidade para criação de estratégias de controle mais econômicas, eficazes e sustentáveis, evitando assim, que certos microrganismos entrem na cadeia alimentar, causando DVAs. Por isso, diversas indústrias investem no desenvolvimento de novos materiais e metodologias que possam remover e prevenir a formação de biofilmes (Kumar e Anand, 1998; Garrett *et al.*, 2008; Andrade Boari *et al.*, 2009).

3.3 INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

3.3.1 Garantia da segurança de alimentos

A indústria alimentícia para tornar-se competitiva e produtiva deve implementar um controle de qualidade e segurança de alimentos para prevenir riscos físicos, químicos e biológicos durante o processamento e distribuição. Existem alguns certificados para as

indústrias de alimentos que exigem esses atributos, tais como a HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), ISO e FSSC 22000 (Food Safety System Certification) (Tutu e Anfu, 2019).

O HACCP (em português, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) é um sistema de gestão mundialmente conhecido como a melhor ferramenta para controlar os riscos de segurança de origem alimentar. Os agentes podem ser divididos entre biológicos (bactérias, vírus, fungos), químicos (produtos de limpeza) ou físicos (pedaços de embalagens, cabelo). Primeiramente, estes perigos e pontos críticos são identificados, avaliados e, então, medidas de controle são adotadas para evitá-los (Kafetzopoulos *et al.*, 2013).

O FSSC 22000 (em português, Certificação do Sistema de Segurança de Alimentos) trata-se de um programa baseado na ISO 22000 e foi reconhecido, desde 2010, como padrão de segurança de alimentos pela Iniciativa Global de Segurança dos Alimentos (GFSI - Global Food Safety Initiative). Alguns dos requerimentos para esta certificação são: adequação e acessibilidade dos equipamentos, incluindo limpeza e manutenção; programa de limpeza e desinfecção; proteção contra sabotagem; dentre outros. Ainda, o projeto FSSC abrange diversos setores, como produtos animais e vegetais (laticínios, carnes, sucos), aditivos alimentares (vitaminas) e embalagens alimentares (Street, 2015).

3.3.2 Laticínios

A qualidade e segurança do leite é fiscalizada pelo Sistema Inteligente de Monitoramento da Qualidade do Leite Brasileiro (SIMQL), em parceria com a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL) e com o corpo técnico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O SIMQL é responsável por inspecionar e caracterizar o perfil de qualidade do leite do país, detectando presença de fraudes, mastites e contaminações (Arbex *et al.*, 2019). Esses sistemas são extremamente importantes uma vez que o leite é altamente perecível e de fácil contaminação.

Todos os laticínios devem seguir normas restritas do MAPA e da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), sendo elas: Instrução Normativa - IN nº 60 (Anvisa, 2019a) e Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 255 (Anvisa, 2019b), para garantir que não haja contaminação bacteriana ou química (formol, ureia, antibióticos).

Todos os produtos devem estar, obrigatoriamente, dentro dos parâmetros descritos pelos órgãos, garantindo a integridade e segurança dos produtos. Portanto, todas matérias primas e produtos devem ser analisados com testes físicos, químicos e microbiológicos, em laboratório interno do laticínio (Camino Feltes *et al.*, 2017).

O leite é transportado das fazendas até o laticínio por caminhão contêiner. O recebimento do leite na indústria é feito com tubulações que direcionam o leite para tanques de armazenamento. Então, o leite segue para o processamento em tubulações. Geralmente, todas essas instalações são feitas de aço inoxidável e são ótimas superfícies para formação e desenvolvimento de biofilmes (Figueiredo *et al.*, 2016).

Para atender a essa demanda de qualidade, o leite passa na indústria por um processo de tratamento para aumentar sua vida útil em temperatura ambiente, podendo ser esterilizado em tanques de pasteurização ou em processo de fluxo contínuo (UHT - *Ultra High Temperature*) (Andrews, 1984). A pasteurização tem sido o método mais eficaz para reduzir os riscos de contaminação, submetendo o leite a cerca de 71 ºC por um curto intervalo de tempo (15 s), aumentando a vida útil do leite pasteurizado para 14 a 20 dias, dependendo das condições de armazenamento e da eficiência do processo de pasteurização. Neste processo é extremamente importante eliminar os microrganismos deteriorantes e patogênicos (Shojaei e Yadollahi, 2008; Garedew *et al.*, 2012). O UHT se trata de um processo bastante utilizado para eliminação de microrganismos presentes no leite, em que o leite é submetido a 135 a 150 ºC por 1 a 8 s, prolongando sua vida útil para 2 a 6 meses (Antunes, 2014). A limitação desta técnica se encontra na sobrevivência de alguns esporos, como de *Bacillus cereus*, que encontram um ambiente sem competição, perfeito para sua proliferação. Após o processo de tratamento do leite, um processo de sanitização é empregado nas instalações industriais visando reduzir a carga microbiana a um número aceitável evitando contaminação de alimentos. Alguns autores consideram que o máximo permitido é de 9×10^5 UFC·mL^{-1} para o leite cru refrigerado e 1×10^3 UFC·mL^{-1} para o leite pasteurizado (Abastecimento, 2002; Grutsch *et al.*, 2018). De acordo com a ANVISA, a *L. monocytogenes* deve estar ausente no laticínio e a P. fluorescens pode ser detectada até 10 UFC·mL^{-1}. Podemos considerar a *P. fluorescens* como um microrganismo indicador e portanto quando se detecta esta bactéria é indício de uma má higienização da indústria ou contaminação cruzada (Anvisa, 2019b; a).

3.4 ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DE BIOFILMES

Existem diversas estratégias para controle de biofilmes. A prevenção da contaminação bacteriana está ligada ao resfriamento imediatamente após a ordenha, armazenamento a baixas temperaturas e limitação do crescimento, com limpeza e sanitização da vaca antes da ordenha e dos equipamentos e instalações industriais, como tubos, válvulas, juntas e tanques. A remoção de resíduos sólidos é extremamente importante para o controle de bactérias psicrotróficas (crescem em temperaturas entre 0 a 7 ºC) (Garedew *et al.*, 2012).

Um tratamento de sanitização em superfícies em indústrias de alimentos deve reduzir a população bacteriana de no mínimo 99,99 % (5 logs), como definido pelo documento sobre ação de desinfetantes (*Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants*), da Associação dos Métodos de Análises Químicas (Richter *et al.*, 2002). Por outro lado, alguns autores consideram que um produto deve remover apenas 3 ciclos log para ser aplicado como sanitizante (Araujo *et al.*, 2012).

Em indústria de alimentos, as operações de limpeza e desinfecção são essenciais uma vez que a eficiência destas afetam a qualidade do produto. Apesar da ineficiência de destruir os biofilmes, a limpeza é fundamental na remoção de resíduos de alimentos. Uma limpeza eficiente deve quebrar ou dissolver a matriz de EPS para que os desinfetantes possam ter acesso às células. Uma vez que o processo de limpeza apenas remove as sujidades, e talvez desprender um pedaço do biofilme, as bactérias podem se aderir à outras superfícies. Portanto, desinfecção deve ser aplicada. A desinfecção é o uso de produtos antimicrobianos, como ácidos ou tecnologias alternativas (nanotecnologia e enzimas), para reduzir a população de células viáveis a um número aceitável para o consumidor. Os desinfetantes devem ser efetivos, seguros, e fáceis de aplicar e de remover, sem deixar nenhum resíduo tóxico (Simões *et al.*, 2010).

A técnica de limpeza de instalações mais utilizada é a CIP (do inglês, *Clean In Place*). Se trata de um sistema de limpeza no interior de equipamentos sem desmontagem, com a utilização de diferentes tipos de detergentes e desinfetantes, através de jatos e spray nas superfícies ou com a circulação de soluções de limpeza com alta turbulência. Tem como objetivo eliminar todos ou a grande maioria dos microrganismos ali presentes. O sistema automatizado garante segurança, economia e resultados reproduzíveis. As características da CIP, tais como ciclo único ou reuso, tempo de permanência,

concentração, temperatura, fluxo, dependem do processo, da carga de sujeira e do alimento (Van Asselt *et al.*, 2002; Thomas e Sathian, 2014).

Em laticínios, geralmente são aplicadas as seguintes etapas: (1) lavagem do sistema com água à temperatura ambiente por 5-20 min; (2) limpeza com solução alcalina, geralmente o hidróxido de sódio, a 1,0 – 1,5 % (m/v), a 75-80 ºC por 6-45 min; (3) lavagem com água à temperatura ambiente; (4) limpeza com um agente ácido, geralmente o ácido nítrico, a 0,5-2 % (m/v), a 60-90 ºC por 5-45 min; (5) lavagem com água à temperatura ambiente por 5-20 min. Porém, a ação do sistema CIP é limitada quando há adesão de alimentos ou bactérias na superfície, resultando na formação de biofilmes. Autores relatam que esta técnica é insuficiente para um total controle de biofilmes (Kumar e Anand, 1998; Reinemann *et al.*, 2003; Bremer *et al.*, 2006; Vlkova *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2010). Para remediar a adesão (reversível), as indústrias podem aplicar algumas estratégias, como (1) desinfecção *in time*, antes do desenvolvimento do biofilme; (2) desinfecção de biofilmes usando desinfetantes agressivos; (3) inibição pela seleção de materiais que não promovam a adesão; (4) recobrimento da superfície com agentes antimicrobianos; dentre outros (Srey *et al.*, 2013).

O controle de biofilmes pode acontecer em duas rotas (ou a combinação delas): pela inibição da adesão da bactéria à superfícies pela aplicação de um revestimento; e/ou pela remoção/morte do microrganismo aderido à superfície (Bata-Vidács *et al.*, 2013). As etapas que envolvem o controle de biofilmes podem ser: (1) detecção de biofilmes; (2) sanitização da superfície (aplicando tratamentos químicos, ou alternativos como nanotecnologia); (3) monitoramento da estratégia de controle (a partir de técnicas de contagem bacteriana, por exemplo).

Os biofilmes são detectados na indústria indiretamente a partir de sintomas nos parâmetros operacionais ou análises laboratoriais. Com o avanço das microscopias, filtrações e técnicas de coloração molecular, a identificação e quantificação de células bacterianas viáveis e mortas tornaram-se mais eficiente (Murthy e Venkatesan, 2008). A Tabela 3 mostra algumas técnicas de detecção de biofilmes, as quais podem ser utilizadas para inspeção da sanitização de superfícies de processamento de alimentos.

Tabela 3. Métodos que podem ser utilizados na detecção da presença e concentração de biofilmes formados em indústrias.

Técnica	Estágio do biofilme	Método de detecção	Limitação
Biosensores eletroquímicos - sensores de onda acústica e cantiléver (Tan *et al.*, 2014)	Adesão inicial	Quando a bactéria se liga ao biosensor, o qual é piezoelétrico, este gera uma corrente que será detectada por sistemas	Sensor entra em contato com a superfície
Imagem por fluorescência hiper espectral (Jun *et al.*, 2010)	Desenvolvimento inicial	Detecção não destrutiva e sem contato a partir da captura de imagens de fluorescência em bandas entre 421 e 700 nm	Superfícies com características uniformes podem causar detecção falso-positiva
Absorção no infravermelho e espectroscopia Raman (Lu *et al.*, 2011)	A partir do desenvolvimento inicial	Detecção de mudanças na polarização dos grupos funcionais conforme os átomos vibram	Não é possível detecção em pequenas quantidades de analitos

3.4.1 Métodos químicos e alternativos de remoção de biofilmes

Os produtos químicos são altamente empregados como controle de biofilmes e sua ação antimicrobiana varia conforme a concentração utilizada, o estágio de formação do biofilme e a quantidade de bactérias presentes, temperatura e propriedades do alimento. A Tabela 4 mostra os diferentes tipos de sanitizantes químicos convencionais aplicados pelas indústrias (Chatterjee e Abraham, 2018).

Estudos mostram que a partir de mutação genética, as bactérias podem facilmente apresentar resistência aos produtos químicos, permitindo sua sobrevivência e proliferação em altas concentrações de desinfetantes. Como descrito anteriormente, essa resistência é dependente da composição da matriz. Portanto, métodos alternativos para controlar a evolução de biofilmes devem ser considerados (Srey *et al.*, 2013; Kukhtyn *et al.*, 2017).

Para isso, esses métodos alternativos devem atuar na prevenção da formação e eliminação inicial dos biofilmes, ao invés de combatê-los em estágios mais avançados (Galie *et al.*, 2018).

Enzimas podem quebrar o EPS e degradar a matriz dos biofilmes, sendo necessário um conjunto de enzimas para alcançar os diferentes componentes da matriz. Ou ainda, uma mistura de enzimas com surfactantes, dispersantes e agentes quelantes, podem substituir o uso de produtos químicos (Cappitelli *et al.*, 2014). Lequette *et al.* (2010) mostram que serina proteases são mais eficientes na remoção de biofilmes de *Bacillus* formados em diferentes meios: leite desnatado, extrato de carne, e em caldo triptona de soja, do que polissacarídeos.

Tabela 4. Diferentes sanitizantes químicos empregados para remoção de biofilmes formados em indústrias.

Sanitizante	Concentração	Ação no microrganismo	Aplicação	Eficiência
Hipoclorito de sódio (Vianna *et al.*, 2004; Bremer *et al.*, 2006)	1 a 5 %	Inibição de enzimas bacterianas por oxidação nos grupos sulfidrila, prejudicando reações metabólicas.	Remoção de proteínas e carboidratos	1,75 ciclos log contra *L. monocytogenes*
Ácido nítrico (Bremer *et al.*, 2006; Garrett *et al.*, 2008)	1 %	Alteração do pH provoca uma alteração no mecanismo de liberação de prótons do citoplasma.	CIP	4 logs contra bactérias no leite
Peróxido de hidrogênio e ozônio (Robbins *et al.*, 2005; Dequeiroz e Day, 2007)	3 %	Rompe as ligações sulfidrila e de enxofre dentro das enzimas, levando à ruptura dos componentes da membrana celular	CIP	6 logs contra *L. monocytogenes*
Álcool (como o glicerol e glicol) (Larson *et al.*, 1986; Chatterjee e Abraham, 2018)	60 a 90 %	Desnaturação de proteínas, degradação da membrana celular pela dissolução dos lipídeos, e desidratação das bactérias	Sanitização de superfícies	2 logs contra bactérias presentes na mão

Apesar da sua atividade antimicrobiana, as enzimas ainda não são consideradas o melhor método para controle de biofilmes. Vickery *et al.* (2004) mostram que produtos de limpeza com enzimas não foram capazes de reduzir mais de 2 logs de concentração de biofilmes. Resultado semelhante foi obtido por Stiefel *et al.* (2016), em um estudo com diferentes sanitizantes comerciais, contendo enzimas (como protease, lipase, amilase e celulase), e observaram que nenhum deles foi totalmente eficaz na remoção e eliminação total de biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Outra limitação do uso das enzimas é sua dificuldade de implementação em escala industrial, devido ao alto custo desse tratamento, principalmente por causa de proteções de patentes (Galie *et al.*, 2018).

Os fagos também apresentam grande potencial na preservação de alimentos, porém, em geral, os trabalhos publicados são da aplicação na área médica e ainda precisam ser validados em biofilmes formados em indústrias de alimentos (Cappitelli *et al.*, 2014; Harper *et al.*, 2014). Lee *et al.* (2013) mostraram que o fago ECP4 foi capaz de reduzir biofilmes formados em caldo de vegetal e repolho de *E. coli* O157:H7. Sillankorva *et al.* (2008) demonstraram eficiência do fago ϕIBB-PF7A na remoção de biofilmes de *P. fluorescens,* desenvolvidos em cupons de aço inoxidável, em um curto intervalo de tempo. Apesar da estrutura do biofilme (presença de EPS) ser uma limitação para a ação dos fagos, atuando como obstáculo na difusão destes, alguns fagos possuem depolimerases de exopolissacarídeos, hidrolases de peptídeoglicano, etc., o que pode solucionar essa limitação (Galie *et al.*, 2018). Entretanto, os fagos podem induzir resposta imune, por serem relativamente maiores, podem ser facilmente detectados e inativados, e ainda são altamente específicos para cada cepa de bactéria. Além disso, os fagos podem promover adaptações à microbiota, a partir da transferência do material genético por transdução, codificando resistência e/ou virulência aos antibióticos (Royer *et al.*, 2021). Nilsson (2019) confirma que os fagos são hospedeiros específicos de cada cepa e que ainda é necessário estudos mais compreensivos para motivar a aplicação terapêutica.

Apesar de apresentarem atividade antimicrobiana, esses métodos também apresentam desvantagens e necessitam de mais estudos, principalmente em alternativas ambientalmente corretas. Algumas alternativas não apresentam um bom custo-benefício, podem promover persistência, sobrevivência e resistência das células viáveis restantes ou conseguem apenas atingir um número limitado de hospedeiros (Cappitelli *et al.*, 2014).

A Tabela 5 mostra algumas patentes depositadas na área de controle de biofilmes bacterianos em indústrias. Como pode-se observar, grande parte das pesquisas utilizam enzimas como aditivos de detergentes para promover uma melhor remoção bacteriana. A

nanotecnologia, ainda recente, tem sido empregada como revestimento das superfícies e não como sanitizantes. Portanto, tem-se uma lacuna no processo de sanitização com nanoestruturas.

Tabela 5. Tecnologias aplicadas em indústrias para remoção de biofilmes.

Número da patente	Agente	Forma de aplicação	Microrganismos	Vantagem	Limitação	Referência
EP1444316B1	Ácido graxo + Ácido carboxílico + Ácido forte oxidante (ácido nítrico ou fosfórico)	Limpeza CIP	*S. aureus, E. coli*	Econômico e protege o metal	Possível resistência bacteriana	(Richter *et al.*, 2002)
US20110104141	Complexo enzimático: α-amylase, aminopeptidase, α-galactosidase, lacase, lipase, peroxidase, etc	Contato com a superfície (10-70 ºC)	*Pseudomonas spp, E. coli, Acetobacter, Salmonella, Staphylococcus, Streptococcus, etc*	Amplo espectro de ação	Preço e estabilidade	(Deinhammer e Andersen, 2008)
US20180346849A1	Detergente + Agente molhante + Dispersante + Enzima (protease, lacase e polissacaridase)	Limpeza de superfícies (CIP)	*Pseudomonas fluorescens, Bacilfus mycoides e Bacillus cereus*	Agilidade	Não é capaz de remover todos tipos de biofilmes	(Boels *et al.*, 2018)
US6100080A	Hidrolases + Lactase + Intensificador de oxidação	Limpeza e desinfecção de superfícies (CIP)	*Pseudomonas, Staphylococcus, Aeromonas, E. coli*	É amigo do meio ambiente e não é agressivo nem tóxico	Não se sabe se remove ou elimina os biofilmes	(Johansen, 2000)

US20050079594A1	Protease + Esterase + Amilase + Detergente alcalino	Lavagem ou circulação	*Pseudomonas e Flavimonas*	Eficiência de remoção	Estabilidade	(Marion, 2005)
US6027572A	Agente oxidante (peróxido de hidrogênio) + Surfactante	Limpeza de tubulações sob alta pressão	*Flavobactérias, Moraxella, Achromobacter, Pseudomonas, etc*	Seguro, não tóxico e promove menor corrosão do metal	Possível resistência bacteriana	(Labib e Lai, 2000)
EP2632613B1	Dispositivo base com nanoestruturas inorgânicas	Superfície projetada com propriedades anti-adesão bacterianas	*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*	Baixo custo de produção e alta qualidade	Não foram feitos testes de toxicidade	(Bommarito *et al.*, 2013)
AU2010288716B2	Nano prata + nano óxido de zinco	Superfície com propriedades antimicrobianas	Diversas bactérias, algas e leveduras	Baixa toxicidade a células mamárias	Não relatado	(Weiβ e Xalter, 2014)

3.4.2 Nanotecnologia

O primeiro conceito de nanotecnologia foi introduzido pelo ganhador do prêmio Nobel, Richard Feynman, em 1959 e mais tarde o conceito de nanomaterial foi definido como "Material insolúvel ou biopersistente fabricado intencionalmente com uma ou mais dimensões externas, ou uma estrutura interna, na escala de 1 a 100 nanômetros", os quais apresentam diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas (Peterson, 2004; Bata-Vidács *et al.*, 2013). Estas propriedades são afetadas pela morfologia, tamanho, superfície e concentração (Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020). Uma das nanoestruturas já comercializadas, produzidas em larga escala e que apresentam reconhecidamente propriedade antimicrobianas e que, portanto, possuem o potencial como agente sanitizante são as nanopartículas de prata (Fabrega *et al.*, 2009)

As nanopartículas de prata (AgNP) apresentam alta afinidade com grupos que contém os elementos enxofre e fósforo que são componentes da membrana celular e do interior da bactéria. Com isso, essas estruturas são capazes de alterar a morfologia da membrana celular a partir da degradação de lipopolissacarídeos e aumentar a permeabilidade da membrana. Ainda, podem penetrar a célula bacteriana e afetar o DNA a partir da liberação de íons Ag^+, afetando também o processo respiratório e divisão celular, consequentemente levando a morte da célula. Um dos fatores que garantem sua ação antimicrobiana contra uma ampla faixa de bactérias e fungos está associado a estrutura cristalina das nanopartículas. Estudos mostram que quanto maior o número de faces na estrutura, maior será sua reatividade (Morones *et al.*, 2005; Bata-Vidács *et al.*, 2013). De acordo com Franci *et al.* (2015), o mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado e varia conforme a estrutura do microrganismo, como por exemplo para a *L. monocytogenes*, AgNP é capaz modificar a morfologia celular, romper a membrana citoplasmática e causar plasmólise (retração do volume das células por perda de água); e para a *P. aeruginosa*, AgNP pode promover danos irreversíveis, prejudicando a permeabilidade da membrana e respiração celular.

Em relação aos perigos para o ser humano, ainda são necessários diversos estudos para garantir sua segurança ao uso, mas sabe-se que dentre os metais, a prata apresenta menor toxicidade para as células animais (Berni Neto *et al.*, 2008). Estudos também mostram que AgNP são menos tóxicas do que Ag dissolvido e este parâmetro varia de acordo com o tamanho, forma, grau de aglomeração, solubilidade, composição química e estabilidade da estrutura (Fabrega *et al.*, 2009).

Existem também as nanoestruturas de óxido de zinco (ZnOnano) que também apresentam propriedades antimicrobianas para bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sabe-se que sua atividade antimicrobiana depende da concentração, estrutura cristalina e formato da partícula, porém não se sabe ao certo o mecanismo de ação, tendo como hipóteses sua ligação à superfície das células, disfunção da membrana, geração de peróxido de hidrogênio, ou liberação de íons Zn^{2+}. Esses íons de zinco são liberados em condições ácidas (Equação 1 e 2) e se ligam com biomoléculas como proteínas e carboidratos, interrompendo todas funções vitais da bactéria. Bactérias gram-positivas são menos sensíveis ao dano destes íons, uma vez que estes causam menos toxicidade nas camadas espessas de peptídeoglicano carregadas negativamente. Os autores relatam também que não há estudos que demonstrem toxicidade em humanos (Mirzaei e Darroudi, 2017; Siddiqi *et al.*, 2018; Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020).

$$ZnO + 2HCl \rightarrow ZnCl_2 + H_2O \qquad \text{Eq. 1}$$

$$ZnCl_2 \leftrightarrow Zn^{2+} + 2Cl^- \qquad \text{Eq. 2}$$

Nanoestruturas de ZnO são estáveis em altas temperaturas e pressões e são recomendadas para sanitização de equipamentos e *containers* em indústrias de alimentos, por serem economicamente viáveis e seguras, por serem consideradas como GRAS (Generally Regarded as Safe for consumption) (Merino *et al.*, 2019).

A nanoquitosana também apresenta potencial de aplicação como sanitizantes. Quitosana é um biopolímero natural obtido com a desacetilação da quitina. As nanoestruturas de quitosana (NQ) apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, mas os exatos mecanismos de ação não são totalmente definidos. É possível que seja devido a carga positiva e policatiônica da quitosana em contraste com a carga negativa da membrana celular, provocando uma alteração na permeabilidade da célula e, consequentemente, promovendo um vazamento de proteínas e outros componentes intracelulares, eliminando as bactérias. Essas propriedades são influenciadas por fatores como o tipo da quitosana e o nível de polimerização. As bactérias gram-positivas são mais susceptíveis a ação antimicrobiana do que as gram-negativas (Qi *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006; Upadya *et al.*, 2011). A atividade antibacteriana é mais presente em meios ácidos, mas estudos de De Paz *et al.* (2011) mostram que biofilmes de *Staphylococcus mutans*, isolados da cavidade oral, foram removidos da superfície de sistemas de câmara de fluxo, mesmo em pH neutros.

As nanoestruturas de carbonato de cálcio (NC) podem ser aplicadas em diversos setores, como aditivo em plásticos, tintas, cosméticos, papéis e principalmente aplicações

biomédicas. Não há relatos que confirmem alguma propriedade tóxica para o ser humano ou meio ambiente. Sua propriedade antimicrobiana pode ser atribuída pela entrada nas células bacterianas por endocitose e consequente liberação de íons, induzindo estresse oxidativo, apoptose, inibição do crescimento celular e morte (Horie *et al.*, 2014).

Com o crescente uso da nanotecnologia em diversos produtos, a preocupação sobre os possíveis riscos que as nanoestruturas podem causar à saúde humana, animal e ao meio ambiente, tem se tornado cada vez mais constante no meio científico e industrial. Alguns aspectos da interação entre nanoestruturas e células vivas não são totalmente claros. Um dos testes mais comuns para detectar os danos causados pelas nanoestruturas é a genotoxicidade, um método sensitivo para mensurar o dano do DNA (Carrillo-Inungaray *et al.*, 2018).

Atualmente, diversos pesquisadores realizam ensaios antimicrobianos utilizando as mais variadas nanoestruturas. Porém, o uso de nanosanitizantes em instalações industriais em laticínios ainda é incipiente e necessita muitos estudos. Ou seja, não se encontra muitos resultados na literatura e provavelmente este produto não é comumente utilizado em indústrias.

Apesar desta realidade atual, este tema tem grande potencial para o futuro, uma vez que alguns estudos comprovam que nanoestruturas são capazes de aumentar a eficiência de sanitização, reduzir a persistência e resistência de microrganismos, limitar o uso de antimicrobianos químicos, aumentar o custo-efetividade dos sanitizantes convencionais (Huang *et al.*, 2019), aumentar a biodisponibilidade, aumentar a especificidade e reduzir toxicidade e degradação (Meireles e Simões, 2017). Existem alguns testes em desenvolvimento como descrito por Shekh *et al.* (2017), onde nanofibras dopadas com nanoprata foram utilizadas para descontaminação de água; por Araujo *et al.* (2012), o qual recomendam que AgNP sejam utilizadas como sanitizantes, uma vez que estas foram eficientes na remoção de biofilmes em aço inoxidável, removendo mais de 3-log (mínimo para um sanitizante ser considerado como efetivo); e ainda por Tayel *et al.* (2011), em seu estudo da eficiência da atividade antimicrobiana de ZnOnano contra 9 causadores de DVA, recomendando seu uso como potencial agente sanitizante em indústrias de alimentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E CONDIÇÃO DE CULTIVO

Os reagentes de grau analítico foram utilizados. As cepas bacterianas disponíveis na Universidade Federal de São João del-Rey, Campus Alto Paraopeba, foram: *Escherichia coli* (O157H7) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). As cepas de *Pseudomonas fluorescens* (NCTC 10059) e *Listeria monocytogenes* (ACTC 15313) foram adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Hídrica e Alimentar (Lampoah) da Universidade Federal de Viçosa.

As estirpes foram ativadas e repicadas a cada 48 h, separadamente, com 40,0 µL da cultura criopreservada, com auxílio de uma micropipeta monocanal (Olen), em 5,0 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia) estéril, sendo incubadas a 37 ºC em estufa bacteriana por 24 h (Estufa Bacteriológica, SL 101/81, Solab Equipamentos para Laboratórios LTDA- EPP, Piracicaba – SP, Brasil), exceto a *P. fluorescens* que foi incubada a 30 ºC por 24 h.

4.2 PREPARAÇÃO DOS SANITIZANTES

Foram aplicados sanitizantes de uso convencional em indústrias de alimentos, sendo eles: solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,8 % (v/v) com cloro ativo a 2,5 % (m/m) (Marina), hidróxido de sódio a 2,0 % (m/v) (soda caustica – NaOH, Escorpião), ácido nítrico (HNO_3) a 1,2 % (v/v) (Quimex) e detergente alcalino clorado comercial LAT 300 PLUS a 0,8 % (v/v) (Qualimilk, StartQuímica). As concentrações foram escolhidas conforme descrição dos fabricantes e por serem concentrações usadas em laticínios. Também foram aplicadas diferentes nanoestruturas, como nanoestruturas de prata (AgNP) a 0,005, 0,01, e 0,02 % (m/v), de óxido de zinco (ZnOnano) e de nanoquitosana (NQ) a 0,4, 1,2, e 2,8 % (m/v), que foram previamente sintetizadas conforme protocolo a seguir.

4.2.1 Obtenção da nanoestrutura de ZnO

A nanoestrutura de óxido de zinco foi obtida moendo $ZnCl_2$ (Dinâmica Ltda), NaCl (Dinâmica Ltda) e Na_2CO_3 (Dinâmica Ltda) na proporção 1:5,5:10, de acordo com Aghababazadeh *et al.* (2006) e Ao *et al.* (2006) com algumas modificações.

Os reagentes foram adicionados em um moinho de bolas (Retsch, Germany) por 40 min a 12 rps. O pó formado foi submetido a um tratamento térmico a 400 ºC em um forno mufla (Zezimaq) por 30 min em um cadinho de porcelana. Após o tratamento, o pó foi diluído em água destilada e seguiu para centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5920 R BioResearch do Brasil - Produzido na Alemanha) por 10 min a 2.561,06 x g, para purificação. Esta etapa foi repetida mais 2 vezes e o pellet formado foi seco a 50 ºC. O sólido foi macerado e armazenado.

A nanoestrutura de óxido de zinco foi caracterizada, por um Nano Zeta Sizer (Malvern Instruments Ltda, England), a 25 ± 0,5 ºC, com um PDI no valor de 0,601 e com tamanho de 173,15 ± 13,16 nm.

4.2.2 Obtenção de nanoestruturas de prata

A síntese seguiu a metodologia descrita por Jana *et al.* (2001) e adaptada por Antunes *et al.* (2013), a qual consiste na adição, com fluxo controlado de 2,5 $mL \cdot min^{-1}$, a partir de uma bomba peristáltica dosadora (MS Tecnopon Instrumentação, DMC-100) de citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$) 1,0 $mmol \cdot L^{-1}$ (Dinâmica Ltda.) em nitrato de prata ($AgNO_3$) 1,0 $mmol \cdot L^{-1}$ (Sigma-aldrich) sob agitação a 250 rpm (Agitador magnético IKA C-MAG HS10), a 25 °C. Imediatamente após gotejamento, borohidreto de sódio ($NaBH_4$) 4,0 $mmol \cdot L^{-1}$ (Vetec Química Fina Ltda.) foi adicionado na proporção 1:1:4, respectivamente. A dispersão continuou sob agitação por mais um minuto e, então, a dispersão foi armazenada.

O tamanho das partículas presentes na dispersão foi de 20,08 ± 0,17 nm com PDI de 0,321 ± 0,047.

4.2.3 Obtenção de nanoestrutura de quitosana

A quitosana foi cedida pela empresa PRIMEX, lote TM3425, viscosidade 463 cP, grau de acetilação 8 % e massa molar viscosimétrica 74.865,25 $g \cdot mol^{-1}$.

A nanoestrutura de quitosana (NQ) foi obtida de acordo com Calvo *et al.* (1997) e Vimal *et al.* (2012) com algumas modificações. 105,0 mg de quitosana (1,5 $mg \cdot mL^{-1}$) foi dissolvida em 315,0 mg de ácido acético (CRQ, Produtos Químicos Ltda.) (2,5 $mg \cdot mL^{-1}$), com volume completado para 70,0 mL com água destilada, sob agitação 500 rpm a 25,0 °C por 24 h. Então, 20,0 mL de uma solução de 2,0 $mg \cdot mL^{-1}$ de tripolifosfato de sódio (Synth) foi gotejada utilizando uma bomba peristáltica (MS Tecnopon Instrumentação, DMC-100), em uma vazão de 1,0 $mL \cdot min^{-1}$ sob agitação 2500 rpm a 25,0 °C. A dispersão seguiu para centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5920 R BioResearch

do Brasil- Produzido na Alemanha) por 30 min a 4568,87 x g e 20 ºC. O pellet foi seco em estufa (Nova Ética Ltda.) a 35 ºC. O sólido foi macerado e o pó foi armazenado.

O tamanho obtido por estas nanoestruturas foi de 25,95 ± 3,398 nm e com PDI de 0,975 ± 0,035.

4.2.4 Obtenção de nanoestrutura $CaCO_3$

Para a síntese da nanoestrutura de carbonato de cálcio foi utilizado a metodologia de Babou-Kammoe *et al.* (2012) com modificações. Primeiro foi preparada uma solução contendo 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ de carbonato de sódio, 0,18 $mol \cdot L^{-1}$ de nitrato de sódio e 0,2 $mol \cdot L^{-1}$ de hidróxido de sódio, e por gotejamento foi adicionado nesta solução 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ de nitrato de cálcio, a 17,5 °C por 60 min, sob constante agitação. Após isso, a solução foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5804;5804 R- BioResearch do Brasil- Made in Germany) por 10 min a 3500 rpm e o pellet obtido foi seco em estufa a 50 °C (Estufa Bacteriológica, Solab Equipamentos para Laboratórios LTDA- EPP, SL 101/81, Piracicaba – SP, Brasil) e por fim foi reservado (Paz *et al.*, 2017). A dispersão foi caracterizada com tamanho de 64,80 ± 7,77 nm e PDI de 0,937 ± 0,090.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

A avaliação antimicrobiana foi efetuada via análise da curva de crescimento das bactérias na presença de diferentes sanitizantes no leitor de microplaca (Synergy HT microplate reader, Highland Prk USA), com 51 leituras em intervalos de 1h e em um comprimento de onda de $\lambda = 625$ nm.

As bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes*, devidamente ativadas foram aplicadas na montagem da placa, onde cada poço receberá 10,0 µL.

As placas foram montadas para cada sanitizante: LAT 300 PLUS, hipoclorito de sódio, ácido nítrico, soda cáustica, nanoestruturas e macroestruturas de óxido de zinco, de prata, de carbonato de cálcio e quitosana. As placas foram montadas inserindo em cada poço um volume específico de cada solução/dispersão estéril, conforme Equação 3 tendo volume final por poço de 200,0 µL. Os volumes de água destilada e sanitizante foram diferentes, de acordo com o esquema demonstrado pela Figura I (Apêndice). A linha A representou o controle positivo (0 µL de sanitizante). O controle negativo foi obtido com a montagem das mesmas placas sem adição de bactéria, completando com 10,0 µL de caldo BHI. O total de placas foram 12, sendo 3 para os tratamentos e 3 para branco, para cada bactéria.

$V_{poço} = 115{,}0\ \mu L\ \text{caldo BHI} + 10{,}0\ \mu L\ \text{da bactéria} + \text{água destilada} + \text{sanitizante}$

Eq. 3

Após finalizado toda a montagem, a microplaca foi levada para o leitor de microplacas com uma temperatura de incubação de 37 ºC para a *L. monocytogenes* e à 30 ºC para a *P. fluorescens*. Os resultados foram tratados com a subtração dos dados pelo branco (sendo as mesmas placas sem a adição das bactérias, para verificar a turbidez provocada pelos sanitizantes) e estes foram inseridos em gráficos para obter curvas de crescimento bacteriano. Essas curvas foram normalizadas, portanto trata-se de valores arbitrários em função do tempo (h). A concentração mínima inibitória foi expressa em MIC $\mu g \cdot mL^{-1}$. Além disso, a partir do *slope* (inclinação) da fase log das curvas foi encontrado os valores de tempo de geração (g – tempo necessário para ocorrer a divisão celular) e taxa de crescimento (υ – medida do número de gerações por unidade de tempo), conforme Equações 4 e 5, respectivamente, conforme descrito pela metodologia de Brock. Esses parâmetros são comumente utilizados para verificar o efeito positivo ou negativo de algum tratamento em uma cultura (Madigan *et al.*, 2016).

$$g = \frac{0{,}301}{slope} \qquad Eq.4$$

$$\upsilon = \frac{1}{g} \qquad Eq.5$$

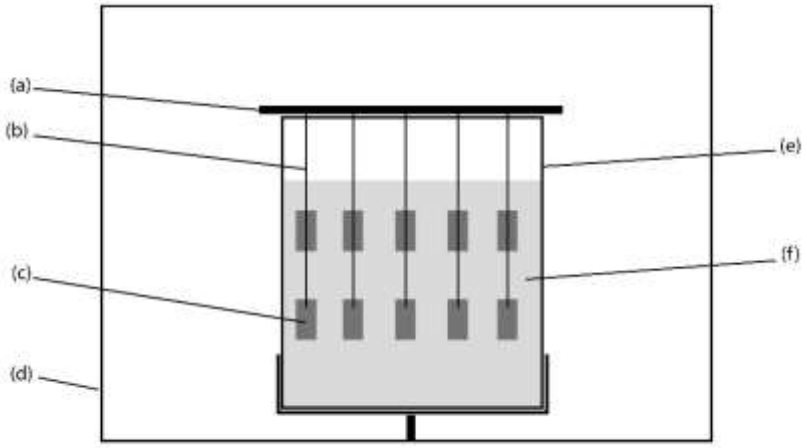
4.4 BIOFILME BACTERIANO EM LEITE

4.4.1 Formação de biofilme bacteriano

A formação dos biofilmes foi realizada seguindo Boari *et al.* (2009), com algumas modificações. Portanto, foram utilizados 252 cupons de aço inoxidável AISI 304 (1,00 x 2,00 x 0,39 cm), sendo 18 cupons por tratamento. Estes foram perfurados em um dos vértices, previamente lavados com detergente líquido diluído, enxaguados com água destilada e secos a temperatura ambiente. Este substrato para adesão dos microrganismos – aço inoxidável - foi utilizado visto que esta é a superfície mais empregada em indústrias de alimentos. Os cupons foram esterilizados em autoclave (Autoclave Vertical CS, Prismatec Autoclaves), a 121 a 134 ºC, por 15 min e, posteriormente submetidos à luz UV por 15 min.

A formação do biofilme se deu em um sistema, conforme Figura 7, simulando a formação em superfícies metálica tanques e tubulações em laticínios. Para isso, os cupons foram suspensos com fios de aço imersos em uma solução de 1000,0 mL de leite pasteurizado integral (Santa Edwiges, Conselheiro Lafaiete-MG) com a adição de 200,0 µL de cada inóculo previamente preparado (*L. monocytogenes* + *P. fluorescens*). Este sistema seguiu para armazenamento em uma Incubadora Shaker (Eppendorf, New Brunswick I26) a 6 ºC e em agitação a 60 rpm. O experimento foi executado ao longo de 12 dias e as análises foram feitas de forma estéril, no interior do fluxo laminar (Becner Comercial).

Figura 7. Sistema representativo da formação do biofilme bacteriano: (a) Suporte metálico; (b) fios de aço suspensos; (c) cupons de aço inoxidável; (d) shaker com agitação e temperatura controlada (60 rpm e 6 ºC); (e) béquer; (f) leite pasteurizado com inóculos.



Adaptado de Boari *et al.* (2009).

Os cupons foram coletados a cada 48 h, com a substituição do leite e inóculo, considerando a legislação vigente para a qualidade do leite cru, que estabelece este tempo como máximo entre a ordenha até o recebimento do leite onde será processado (Boari *et al.*, 2009).

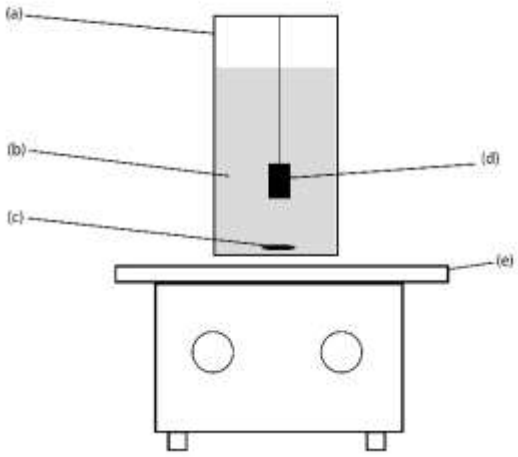
O experimento foi executado em triplicata, sendo 3 cupons por tratamento em cada dia. O controle negativo foi a remoção do biofilme com solução salina estéril a 1 % (m/v) mantendo o protocolo de sanitização (tempo e agitação) descrito na seção 4.4.2, porém sem tratamento com sanitizantes. Esse resultado permitirá a análise da ação surfactante dos sanitizantes aplicados, uma vez que a agitação também pode promover a

remoção de biofilmes. Como controle positivo, os cupons seguirão para tratamento com os sanitizantes comerciais mencionados na seção 4.2.

4.4.2 Sanitização do biofilme formado

Os cupons de aço inoxidável contendo o biofilme foram lavados cuidadosamente com solução salina 0,9 % (m/v) (NaCl, Dinâmica, Química Contemporânea Ltda.) estéril duas vezes para remoção das células não aderidas antes da aplicação do sanitizante. Um aparato foi montado conforme a Figura 8, para simular a sanitização industrial. O cupom foi imerso, suportado em um fio de aço, em 10 mL do agente sanitizante, com a substituição da solução a cada cupom, por 15 min, sem aquecimento, sob agitação a 1500 rpm (Agitador magnético IKA C-MAG HS10).

Figura 8. Sistema para sanitização: (a) béquer; (b) sanitizante; (c) barra magnética; (d) placa de aço inoxidável com biofilme formado; e (e) agitador magnético.



Adaptado de Furukawa *et al.* (2010).

4.4.3 Contagem das células aderidas

Os cupons, com o biofilme formado, foram coletados cuidadosamente do sistema sanitizante e, para a neutralização dos agentes sanitizantes, os cupons foram enxaguados com solução salina estéril contendo 1,0 % (m/v) de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$, Dinâmica, Química Contemporânea Ltda.). Feito isso, com o auxílio de um *swab* estéril, foi feito um esfregaço na superfície para coleta das células sobreviventes. Então, o *swab* foi transferido para um tubo de ensaio com 5,0 mL de solução salina estéril 0,9 % (m/v) com 0,1 % (m/v) de peptona bacteriológica (Biolog). Alíquotas de células oriundas da

solução foram diluídas seriadamente ($10^1 – 10^4$) e plaqueadas pela técnica de *spread plate* em ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Espanha). As placas de petri seguiram para incubação a 30 ºC por 24 h. Após isso, foi feito a contagem das bactérias com auxílio do aplicativo CFU.ai.

4.4.3.1 Cálculo da eficiência de sanitização

De acordo com as regras da Associação Americana de Saúde Pública (APHA - American Public Health Association, no documento contendo os Métodos para Examinação Microbiológica de Alimentos - "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods") (Speck, 1984),

- O número de células viáveis é 25 < UFC > 250 e resultados fora da faixa de contagem foram considerados como estimativa (estim.);
- Quando não foi possível quantificar as bactérias devido a uma grande quantidade, estas foram referidas por TNTC (muito numeroso para contar, do inglês *Too Numerous To Count*);
- Quando não houve crescimento bacteriano nenhum (zero colônias), o resultado foi expresso como < 1 UFC;
- Se na diluição seriada realizada existiu mais de uma contagem significativa a média dos resultados foi feita;
- Quando os resultados das contagens de colônias de uma sequência de diluições não foram aparentemente proporcionais, a Razão das Contagens (RC) foi feita. Se RC < 2,0 seguiu-se com a média dos resultados. Se RC > 2,0 descartou a maior contagem e considerou somente o menor resultado.

Para cálculo da concentração bacteriana, foi utilizada a Equação 6, com o inverso da diluição e fator de correção de volume (10,0 µL) para mL.

$$Nº\ UFC = Colônias \times \frac{1}{Diluição} \times \frac{1}{Vol\ (mL)} \qquad \text{Eq. 6}$$

Além disso, de acordo com Anvisa (2018), o número de UFC pode ser dividido pela área em que o *swab* foi aplicado (2 superfícies de 1 x 2 cm² = 4 cm²). Esses valores também foram tratados e inseridos nas Tabelas II e III, sendo considerados somente para possível submissão do trabalho conforme utilizado em certas revistas.

A redução log diz respeito a morte celular causada por cada sanitizante, em relação ao controle, e foi obtida pela Equação 7, em que N é a quantidade de células dos cupons sem tratamento (controle) e n é a contagem celular após sanitização (Kumari e Sarkar, 2016).

$$Redução\ log = \log N - \log n \qquad \text{Eq. 7}$$

4.5 APLICAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO (HIDROGEL PPG/HMC/NANO)

O biofilme foi formado com a adição de 60,0 µL de cada bactéria, previamente ativada, em um sistema (béquer) contendo 80,0 mL de caldo BHI estéril. Os cupons de aço inoxidável 347 com área 16 cm² (4x4 cm), previamente higienizados e esterilizados, foram imersos nesse sistema, contendo *Salmonella typhimurium* + *Escherichia coli* e incubados por 24 h, a 37 ºC.

O hidrogel foi produzido com a adição de 2 % (m/v) de hidroximetil celulose em água destilada sob agitação. Neste momento o aquecimento foi ligado e após a completa dissolução do hidroximetil celulose, foi adicionado 5 % (m/v) de propileno glicol, 0,1 % (m/v) de EDTA e 0,2 % (m/v) de metilparabeno, atuando como conservante. Ainda em agitação, quando a temperatura do meio alcançou 70 ºC, o aquecimento foi desligado. Ao atingir o resfriamento, 25 ºC, as nanoestruturas com diferentes concentrações foram adicionadas, sendo elas AgNP 0,05; 0,01; 0,02 % (m/v), ZnO 0,4; 1,2; 2,8 % ($mg \cdot mL^{-1}$) e NQ 0,05835; 0,1167; 0,2334 % ($mg \cdot mL^{-1}$). Como controle positivo foi aplicado o álcool em gel 70 % (JD Body Care), assim como o gel produzido sem adição das nanoestruturas.

A análise da eficiência antimicrobiana do gel foi realizada em 2 partes. Parte 1: Em um lado do cupom não foi aplicado nenhum sanitizante (controle negativo), o qual seguiu direto para a 2ª parte; no outro lado foi aplicado o tratamento. Após 20 min seguiu-se para a 2ª parte da análise. Parte 2: Foi feito um esfregaço nas superfícies de análises com auxílio de uma *swab* estéril, a qual foi imersa em tubos com 0,85 % (m/v) de solução salina. Os tubos foram homogeneizados e foi realizado diluição seriada. Alíquotas de 10,0 µL foram adicionadas em placas de *petri* contendo ágar EMB (Eosina azul de metileno) e incubadas por 24 h. Foram analisados 3 cupons para cada tratamento e os resultados foram expressos em $UFC \cdot mL^{-1}$ e redução log.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos resultados obtidos foram estatisticamente analisados utilizando *One-way* ANOVA, e as médias foram comparadas pela comparação múltipla pelo teste Tukey. Cada amostra foi replicada três vezes. Os dados foram considerados estatisticamente significantes se *p-valor* foi < 0,05.

O desvio padrão apresentado na redução log foi calculado a partir da variância (σ) das médias, conforme Equação 5. A aplicação desta equação resulta em altos valores.

$$dp = \sqrt{\sigma^2_{controle} + \sigma^2_{tratamento}} \qquad \text{Eq. 5}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) encontrada (Tabela 6) sugere a aplicação das nanoestruturas como nanosanitizantes, determinando a concentração necessária para apresentar atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (ACTC 15313) e *P. fluorescens* (NCTC 10059).

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu g \cdot mL^{-1}$) dos sanitizantes aplicados contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*.

Sanitizante		Hipoclorito de sódio	LAT 300 PLUS	Soda cáustica	Ácido nítrico	Ag		ZnO		Quitosana		$CaCO_3$	
						Macro	Nano	Macro	Nano	Macro	Nano	Macro	Nano
CIM ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	*L. monocytogenes*	*	5,00 ± 0,00 ^{aA}	1,99 ± 0,00 ^{aA}	1,20 ± 0,00 ^{aA}	*	6,00 ± 0,00 ^{aA}	*	3,04 ± 0,00 ^{aA}	*	3,04 ± 0,00 ^{aA}	*	4,00 ± 0,00 ^{aA}
	P. fluorescens	*	4,05 ± 0,00 ^{aA}	0,79 ± 0,00 ^{aA}	1,20 ± 0,00 ^{aA}	*	5,00 ± 0,00 ^{aA}	*	5,00 ± 0,00 ^{aA}	*	4,00 ± 0,00 ^{aA}	*	4,05 ± 0,00 ^{aA}

*: Não foi encontrado CIM para as concentrações aplicadas.
Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Teste Tukey determinando diferenças significativas ($p<0,05$).

Os sanitizantes que atingiram a inibição de *L. monocytogenes* em ordem decrescente de concentração foram: AN (1,20 $\mu g \cdot mL^{-1}$), SC (1,20 $\mu g \cdot mL^{-1}$), NQ (3,04 $\mu g \cdot mL^{-1}$), ZnOnano (3,40 $\mu g \cdot mL^{-1}L$), NC (4,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$), LAT (5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$) e AgNP (6,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$); de *P. fluorescens*: SC (0,79 $\mu g \cdot mL^{-1}$), AN (1,20 $\mu g \cdot mL^{-1}$), NQ (4,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$), LAT (4,05 $\mu g \cdot mL^{-1}$), ZnOnano (5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$), NC (5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$), e AgNP (5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$).

O sanitizante hipoclorito de sódio não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações aplicadas (até 5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$) para ambas bactérias. Apesar de Vianna *et al.* (2004) terem observado uma inibição bacteriana com uso de NaOCl a 5,25 % (m/v) contra bactérias como *S. aureus* e *E. faecalis*, Sassone *et al.* (2003) relatam que não há um padrão sobre a concentração deste agente antimicrobiano e sua ação depende da espécie bacteriana.

O LAT 300 PLUS teve atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* a 5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ e contra *P. fluorescens* a 4,05 $\mu g \cdot mL^{-1}$. É possível justificar sua atividade antimicrobiana pela presença de cloro ativo (até 5 % (m/v)) em maior concentração do que o HS (2,5 % (m/v)), uma vez que Cl_2 é capaz de interagir com a célula bacteriana séssil e provocar modificações estruturais (Pagedar e Singh, 2015). A literatura ainda é incipiente em relação a análise da atividade antimicrobiana *in vitro* de detergentes alcalino.

Aplicando soda cáustica a 1,99 $\mu g \cdot mL^{-1}$ foi possível inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e a 0,79 $\mu g \cdot mL^{-1}$ inibiu o crescimento de *P. fluorescens*. De acordo com Simões *et al.* (2005), soda cáustica é capaz de interagir e destruir a matriz de EPS, aumentando a vulnerabilidade celular. A literatura ainda é incipiente em testes aplicando soda cáustica no controle de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens,* entretanto Simões *et al.* (2005) relatam que SC é um agente oxidante que reage fortemente com a matriz de EPS, destruindo a estrutura e aumentando sua vulnerabilidade ao estresse hidrodinâmico. Esta atividade foi explorada para remoção de biofilmes, de 7 dias, de *P. fluorescens*, obtendo uma maior eficiência para maiores concentrações de NaOH, porém ainda restando cerca de 10 % do biofilme na concentração de 200 $mmol \cdot L^{-1}$ do sanitizante.

O ácido nítrico teve uma CIM de 1,20 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para ambas bactérias. Essa excelente atividade antimicrobiana pode ser justificada pela interação de radicais livres de NO com moléculas ROS, como H_2O_2 e O_2, gerando derivados, como dióxido de nitrogênio e trióxido de dinitrogênio. Estas moléculas provocam alterações ao DNA e proteínas, a partir da inativação de enzimas metabólicas (Degroote e Fang, 2002; Jones

et al., 2010). Não foram encontrados trabalhos com análises antimicrobianas *in vitro* do ácido nítrico contra *L. monocytogenes* e *P. fluorescens,* entretanto, o CIM obtido por Lou *et al.* (2011) foi entre 20 a 80 $\mu g \cdot mL^{-1}$, ao aplicar ácido clorogênico contra patógenos como *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*. Os autores relatam que esta atividade antimicrobiana é devido a um aumento na permeabilidade citoplasmática, resultando no vazamento de macromoléculas citoplasmáticas.

Nenhuma macroestrutura aplicada (de prata, óxido de zinco, quitosana e carbonato de cálcio) apresentou inibição do crescimento das bactérias nas mesmas concentrações aplicadas para as nanoestruturas. Esse fenômeno pode ser justificado pelo tamanho reduzido, forma das estruturas, grau de aglomeração, dentre outros relacionados ao tamanho nano, os quais são capazes de suprimir os mecanismos de defesa dos microrganismos (Wang *et al.*, 2018).

A nanoestrutura de prata apresentou uma CIM de 6,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para *L. monocytogenes* e 5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para *P. fluorescens*. Martínez-Castañon *et al.* (2008) observou que o tamanho de AgNP influencia na sua atividade antimicrobiana, sendo que, em seus experimentos, quanto menor o tamanho da nanoestrutura, maior foi a atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. De acordo com os autores, devido ao tamanho reduzido, além de apresentar alta superfície de contato, a nanoestrutura pode facilmente alcançar o núcleo da bactéria, levando a morte celular. Os autores encontraram um CIM de 6,25 e 7,50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, para AgNP de 7 nm. Apesar das diferenças nas condições de síntese da nanoestrutura e da espécie da bactéria analisada, este resultado confirma o encontrado neste trabalho. Outro resultado semelhante ao encontrado neste trabalho foi descrito por Lyczak e Schechter (2005), que utilizaram prata nanocristalina contra *P. aeruginosa* e encontraram uma CIM de 4,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Sanchooli *et al.* (2018) encontraram menores valores de CIM de 1,25 $\mu g \cdot mL^{-1}$ contra *L. monocytogenes*, aplicando AgNP. Apesar de não haver especificação da síntese e caracterização da nanoestrutura, este resultado confirma sua atividade antimicrobiana. Ainda, a AgNP produzida neste trabalho teve uma eficiência muito superior da encontrada por Raffi *et al.* (2008), em seu trabalho com *E. coli* após 24 h, sendo necessário aplicar concentrações maiores de 60 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

A nanoestrutura de óxido de zinco teve uma CIM de 3,04 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para *L. monocytogenes* e 5,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para *P. fluorescens*. Yousef e Danial (2012) encontraram valores similares de CIM para ZnOnano contra *E. coli* e *P. aeruginosas* (4 $\mu g \cdot mL^{-1}$). A diferença nos valores de CIM pode ser devido as condições de síntese utilizadas e o

tamanho obtido em cada estudo. Os autores relatam que a alta eficiência bactericida do ZnOnano pode ser atribuída a liberação de peróxidos no meio, mesmo após a morte celular. Além disso, os autores analisaram a atividade antimicrobiana de ZnO e ZnOnano por difusão em ágar e observaram uma maior inibição bacteriana pela nanoestrutura. Pode-se relacionar esse resultado com o obtido neste trabalho, em que o ZnO não foi capaz de inibir o crescimento microbiano nas concentrações aplicadas (< 6,00 µg/mL). Ou seja, a síntese da nanoestrutura de ZnO promove uma melhor ação antimicrobiana do que sua macroestrutura.

A macroestrutura de quitosana testada neste trabalho não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações utilizadas (até 6,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$). Por outro lado, a nanoestrutura de quitosana foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* a 3,04 $\mu g \cdot mL^{-1}$ e de *P. fluorescens* a 4,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$. A principal hipótese que justificava a atividade antimicrobiana de nanoquitosana é devido ao seu tamanho reduzido e possibilidade de penetração na célula, interagindo com biomoléculas e levando a morte celular (Ikono *et al.*, 2019). De acordo com Hu *et al.* (2007), a quitosana (macroestrutura) pode apresentar atividade antimicrobiana, ao analisar o tempo de inibição (> 85 h) de quitosana a 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ contra *E. coli*, *P. aeruginosas*, *S. aureus* e *B. subtilis*. Os autores relatam que além da diferença do grau de acetilação da quitosana, quando em meio ácido, esta estrutura é capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular, resultando em vazamento de componentes intracelulares. A atividade antimicrobiana da nanoquitosana foi comprovada por Wardani e Sudjarwo (2018), em sua análise *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*, obtendo um CIM de 1200 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Os autores obtiveram um valor de CIM muito superior ao obtido neste trabalho e esta diferença pode ser devido às diferentes espécies analisadas e principalmente pela do método de síntese. O'callaghan e Kerry (2016) relatam que o método de síntese da nanoquitosana afeta sua atividade antimicrobiana, uma vez que a adição de ácido acético, quando comparado com a síntese em água, aumenta a estabilidade e performance antimicrobiana devido ao aumento da protonação da NQ.

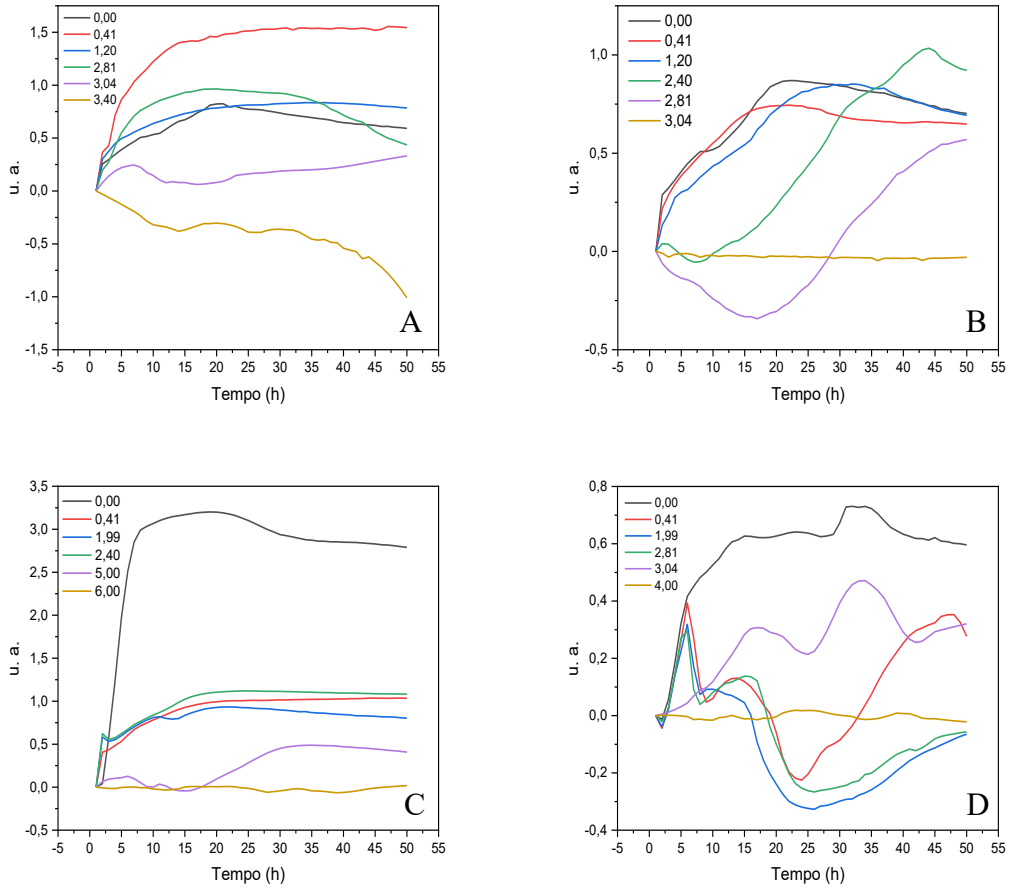
A macroestrutura de carbonato de cálcio testada neste trabalho não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações aplicadas (até 6,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$). O CIM encontrado para a nanoestrutura de carbonato de cálcio foi de 4,00 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para *L. monocytogenes* e 4,05 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para *P. fluorescens*. De acordo com Yang *et al.* (2021), o efeito inibitório provocado pelas nanoestruturas de $CaCO_3$ pode ser atribuído a produção de espécies reativas de oxigênio que aderem na membrana celular, levando a um

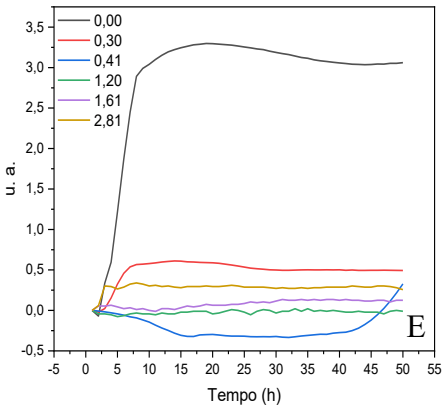
rompimento desta barreira e consequentemente morte celular. Ataee *et al.* (2011), ao aplicar nanoestruturas de carbonato de cálcio por 16 h, encontraram uma CIM de 31,20 $\mu g \cdot mL^{-1}$ contra *Staphylococcus aureus* e *Agrobacterium tumefaciens* em meio sólido e relatam que foi necessária uma concentração duas vezes maior em meio líquido. O valor de CIM encontrado pelos autores foi superior ao obtido neste trabalho, porém a espécies bacterianas analisadas são diferentes e consequentemente a composição do EPS, alterando a atividade antimicrobiana.

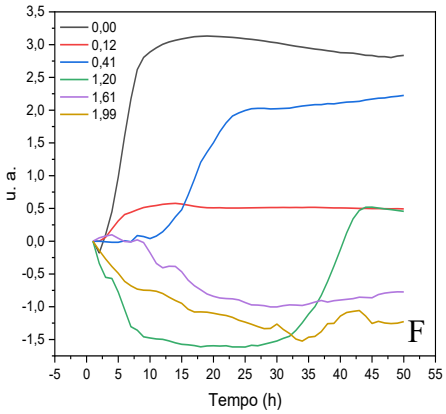
Comparando o resultado obtido pela microplaca com o teste do biofilme em leite, observamos uma divergência. A atividade antimicrobiana pode variar entre as análises feitas neste trabalho como um todo, uma vez que há diferença no substrato, tempo de desenvolvimento do biofilme e concentração do sanitizante e tempo de aplicação do sanitizante (Simões *et al.*, 2010).

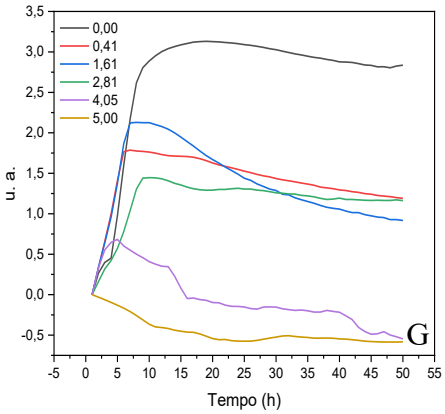
O comportamento cinético apresentado pelas bactérias pode ser observado pelas curvas mostradas nas Figuras 9-12.

Figura 9. Atividade antimicrobiana de A. ZnOnano; B. Nano quitosana; C. AgNP; D. Nano carbonato; E. Ácido nítrico; F. Soda cáustica; G. LAT 300 PLUS; H. Hipoclorito de sódio; em diferentes concentrações ($mg \cdot mL^{-1}$) contra *Listeria monocytogenes* avaliado via densidade óptica.




0,00
0,30
0,41
1,20
1,61
2,81
u. a.
Tempo (h)
E


0,00
0,12
0,41
1,20
1,61
1,99
u. a.
Tempo (h)
F


0,00
0,41
1,61
2,81
4,05
5,00
u. a.
Tempo (h)
G

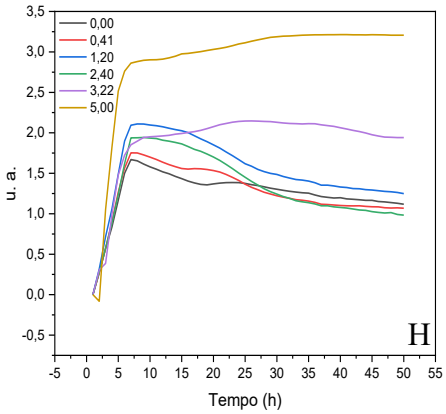
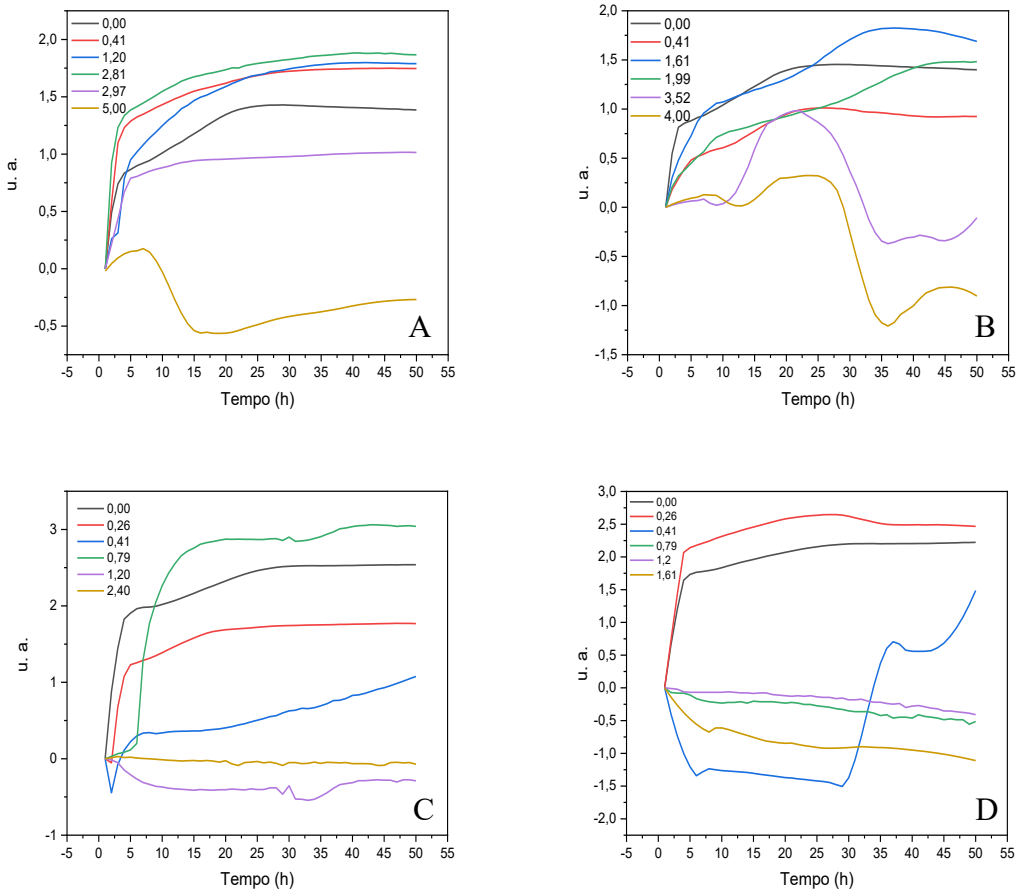
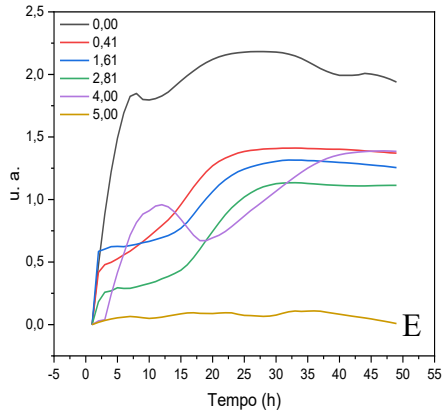
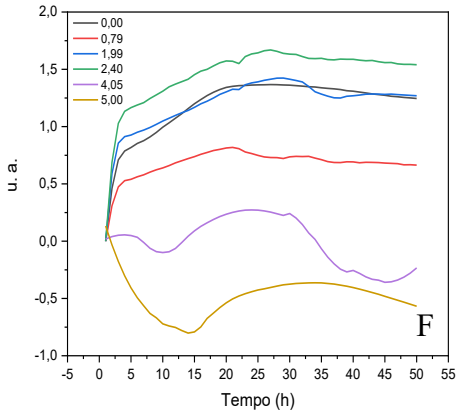
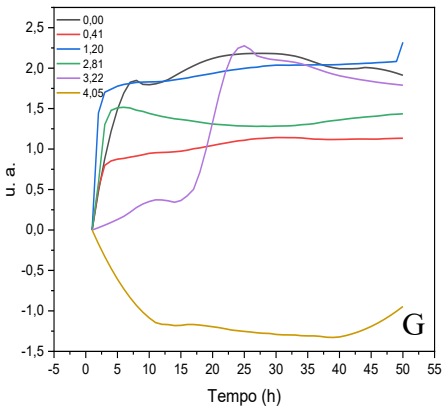

0,00
0,41
1,20
2,40
3,22
5,00
u. a.
Tempo (h)
H

Figura 10. Atividade antimicrobiana de A. ZnOnano; B. Nano quitosana; C. AgNP; D. Nano carbonato; E. Ácido nítrico; F. Soda cáustica; G. LAT 300 PLUS; H. Hipoclorito de sódio; em diferentes concentrações (mg·mL^{-1}) contra *Pseudomonas fluorescens* avaliado via densidade óptica.




0,00
0,41
1,61
2,81
4,00
5,00
u. a.
Tempo (h)
E


0,00
0,79
1,99
2,40
4,05
5,00
u. a.
Tempo (h)
F


0,00
0,41
1,20
2,81
3,22
4,05
u. a.
Tempo (h)
G

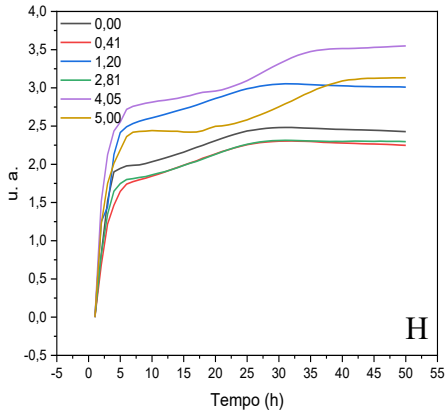

0,00
0,41
1,20
2,81
4,05
5,00
u. a.
Tempo (h)
H

Figura 11. Atividade antimicrobiana de A. ZnO; B. quitosana; C. Ag; D. carbonato em diferentes concentrações (mg·mL^{-1}) contra *Listeria monocytogenes* avaliado em microplaca via densidade óptica.

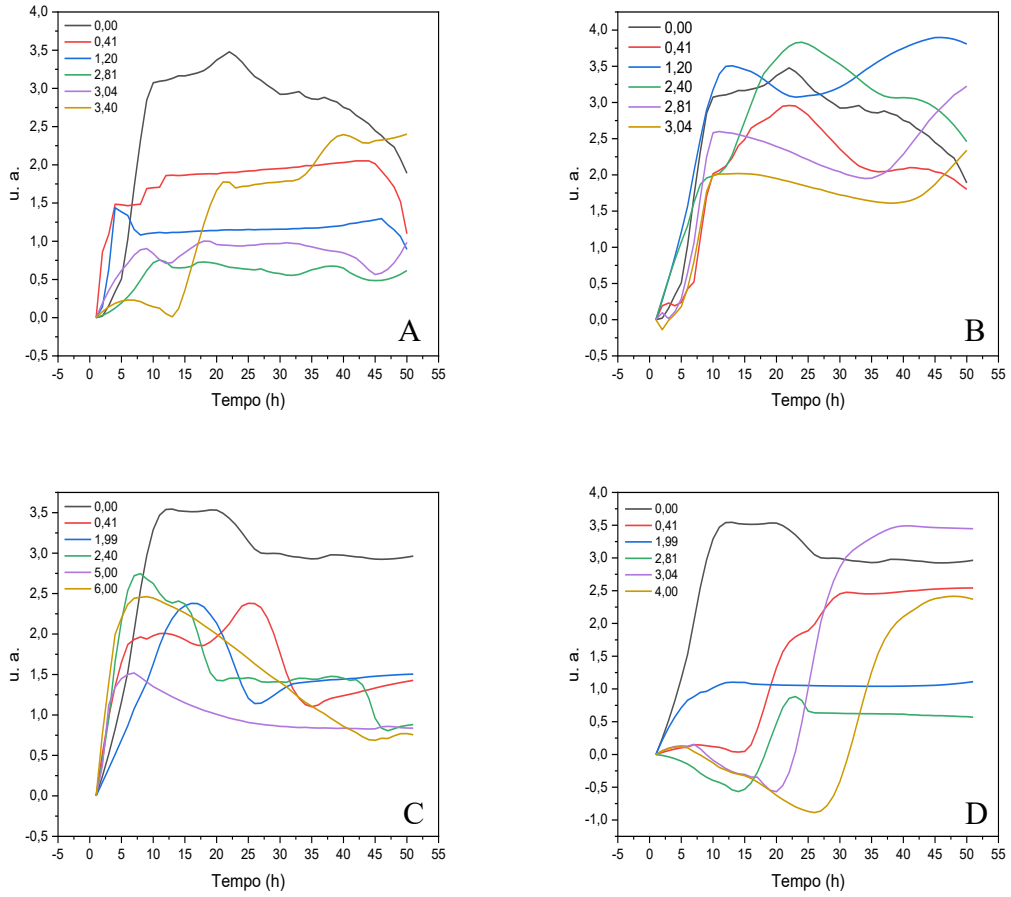
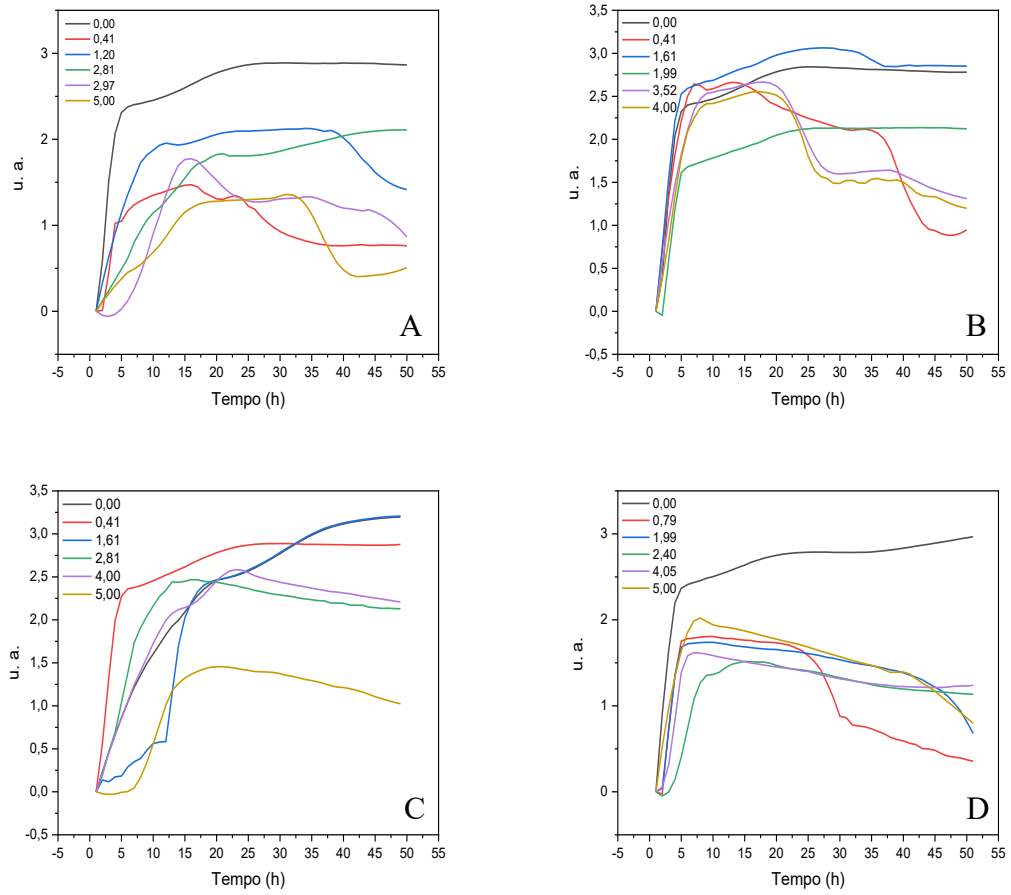


Figura 12. Atividade antimicrobiana de A. ZnO; B. quitosana; C. Ag; D. carbonato em diferentes concentrações (mg·mL^{-1}) contra *Pseudomonas fluorescens* avaliado em microplaca via densidade óptica.



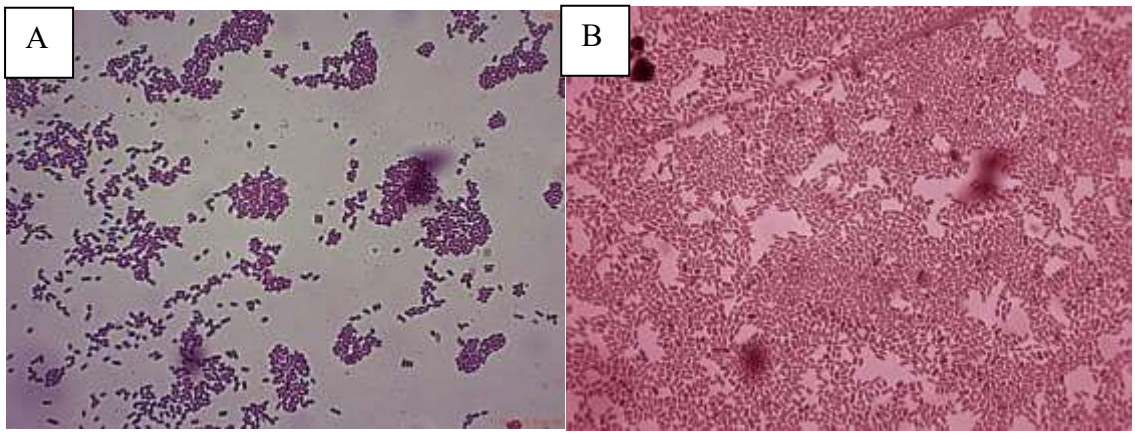
A partir destas curvas, é possível obter o tempo de geração (g) e taxa de crescimento (υ), conforme Tabelas III e IV (Apêndice), sendo que quanto maior for o valor de g, menor é a vantagem seletiva da bactéria no meio e consequentemente o tratamento foi eficiente. Com esta análise é possível observar que o crescimento das bactérias na presença dos sanitizantes aplicados apresentou um tempo de geração entre 0,21 a 34,92 h e uma taxa de divisão (duplicação por hora) de 0,03 a 4,81 h^{-1}. Os maiores valores de tempo de geração são provenientes das nanoestruturas, possibilitando supor que em suas fases log, o crescimento bacteriano foi mais lento do que dos sanitizantes comerciais. Valores semelhantes ao controle foram encontrados por Curiale e Lewus (1994) quando analisaram o comportamento cinético de *L. monocytogenes* em diferentes meios de cultivo e obtiveram um tempo de geração de 0,78 h e taxa de divisão de 1,28 h^{-1}, em caldo triptona de soja com extrato de levedura. Estes valores confirmam o resultado obtido neste trabalho de que a *L. monocytogenes* tem um rápido crescimento em

condições normais, entretanto, as nanoestruturas foram capazes de aumentar o tempo de geração e, portanto, podem ser consideradas como eficientes.

5.2 CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS

Os biofilmes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* foram formados, durante 12 dias, nas placas de aço inoxidável, tendo o leite como substrato. A identificação das diferentes espécies presentes no biofilme foi realizada a partir da contagem em placas de *petri*. Visualmente, as placas apresentaram duas morfologias diferentes. Para a contagem específica da espécie, cada bactéria foi coletada e identificada a partir da técnica de coloração de Gram, que consiste na diferenciação celular a partir de coloração na membrana da célula. Aplicado a técnica, com o auxílio de um microscópio óptico com foco da objetiva de imersão a 1000x, as culturas foram identificadas pela sua coloração. A Figura 13 mostra a diferença entre as bactérias após a coloração de Gram, onde as bactérias gram-positivas retem a cor roxa proveniente do corante cristal violeta e gram-negativa apresentam a cor vermelha proveniente do corante safranina. Considerando que cada placa de *petri* foram inoculadas somente duas bactérias, com diferenças na estrutura celular, pode-se considerar que as culturas mostradas na Figura 13-A são de *Listeria monocytogenes* (ACTC 15313), enquanto as culturas da Figura 13-B são de *Pseudomonas fluorescens* (NCTC 10059). Ainda, é possível observar que ambas apresentam estrutura de bastonetes (Beveridge, 2001).

Figura 13. Micrografia óptica com foco de 1000x de A) *Listeria monocytogenes*; e B) *Pseudomonas fluorescens*.



As Tabelas 7 e 8 mostram a quantidade de Unidade Formadoras de Colônias ($UFC \cdot mL^{-1}$) antes e após diferentes tratamentos, sendo a primeira para *L. monocytogenes* e a segunda para *P. fluorescens*.

Tabela 7. Valores de UFC·mL^{-1}, referentes a *Listeria monocytogenes*, antes (controle) e após diferentes tratamentos (sanitizantes comerciais e nanoestruturas de prata (AgNP 1: 0,005 %; AgNP 2: 0,01%; AgNP 3: 0,02 % (m/v)); de quitosana (NQ 1: 0,4 %; NQ 2: 1,2 %; NQ 3: 2,8 % (m/v)); e de óxido de zinco (ZnOnano 1: 0,4 %; ZnOnano 2: 1,2 %; ZnOnano 3: 2,8 % (m/v)).

Sanitizante	Concentração (%)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12
Controle	-	$2,25 \times 10^5 \pm 2,12 \times 10^4$ aA	$2,87 \times 10^5 \pm 2,52 \times 10^4$ aA	$2,38 \times 10^6 \pm 7,82 \times 10^5$ aA	$2,59 \times 10^3 \pm 8,73 \times 10^5$ aA	TNTC	TNTC
Hipoclorito de sódio	0,8 (v/v)	< 1	< 1	$2,36 \times 10^5 \pm 9,10 \times 10^4$ aB	$1,00 \times 10^5 \pm 0,00$ aB	TNTC	TNTC
LAT 300 PLUS	0,8 (v/v)	< 1	< 1	$8,00 \times 10^3 \pm 0,00$ aB	$1,90 \times 10^4 \pm 5,13 \times 10^3$ aB	$3,43 \times 10^7 \pm 7,02 \times 10^6$ bB	TNTC
Soda cáustica	2,0 (m/v)	< 1	< 1	$1,40 \times 10^4 \pm 0,00$ aB	$1,50 \times 10^4 \pm 0,00$ aB	$2,30 \times 10^7 \pm 2,00 \times 10^6$ aB	TNTC
Ácido nítrico	1,4 (v/v)	< 1	< 1	$3,00 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^4$ aB	$2,10 \times 10^4 \pm 2,83 \times 10^3$ aB	$4,10 \times 10^6 \pm 6,08 \times 10^5$ aC	TNTC

AgNP	0,005 (m/v)	< 1	< 1	$3,00 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^4$ cB	$4,25 \times 10^4 \pm 3,54 \times 10^3$ a,bB	$8,40 \times 10^4 \pm 1,25 \times 10^4$ bC	$2,50 \times 10^5 \pm 0,00$ cE
	0,01 (m/v)	< 1	< 1	$2,50 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^4$ a,bB	$4,50 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^4$ bB	$4,25 \times 10^4 \pm 9,19 \times 10^3$ bC	$2,50 \times 10^5 \pm 0,00$ cE
	0,02 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$8,55 \times 10^4 \pm 14.849,24$ bB	$4,20 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^4$ a,bC	$1,93 \times 10^5 \pm 2,61 \times 10^4$ cE
NQ	0,4 (m/v)	< 1	< 1	$2,38 \times 10^4 \pm 6,85 \times 10^3$ aB	$1,26 \times 10^5 \pm 1,98 \times 10^4$ bB	$1,39 \times 10^5 \pm 2,33 \times 10^4$ bC	$2,01 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^4$ cE
	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$2,17 \times 10^5 \pm 4,60 \times 10^4$ bB	$2,30 \times 10^5 \pm 3,46 \times 10^4$ bC	$1,85 \times 10^5 \pm 1,32 \times 10^4$ bE
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$1,21 \times 10^5 \pm 3,54 \times 10^4$ bB	$2,50 \times 10^5 \pm 0,00$ cC	$1,29 \times 10^5 \pm 1,27 \times 10^4$ bE
ZnOnano	0,4 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$2,50 \times 10^5 \pm 6,35 \times 10^4$ bB	$2,37 \times 10^5 \pm 2,31 \times 10^4$ bC	$2,28 \times 10^5 \pm 2,50 \times 10^4$ bE

	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$2,26 \times 10^5 \pm 2,00 \times 10^4$ bB	$2,40 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^4$ bC	$2,39 \times 10^5 \pm 1,21 \times 10^4$ bE
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$9,20 \times 10^4 \pm 5,67 \times 10^3$ bB	$2,36 \times 10^5 \pm 2,48 \times 10^4$ cC	$1,83 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^4$ dE

TNTC: Muito numeroso para contar (Too numerous to count); < 1: não houve crescimento na placa.
Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).
Teste Tukey determinando diferenças significativas ($p<0,05$), sendo os sobrescritos a-d: linha (tratamento); e A-E: coluna (dias).

Tabela 8. Valores de UFC·mL^{-1}, referentes a *Pseudomonas fluorescens*, antes (controle) e após diferentes tratamentos (sanitizantes comerciais e nanoestruturas de prata (AgNP 1: 0,005 %; AgNP 2: 0,01%; AgNP 3: 0,02 % (m/v)); de quitosana (NQ 1: 0,4 %; NQ 2: 1,2 %; NQ 3: 2,8 % (m/v)); e de óxido de zinco (ZnOnano 1: 0,4 %; ZnOnano 2: 1,2 %; ZnOnano 3: 2,8 % (m/v)).

Sanitizante	Concentração (%)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12
Controle	-	$2,67 \times 10^4 \pm 7,02 \times 10^3$ aA	$1,00 \times 10^4 \pm 3,00 \times 10^3$ aA	$2,63 \times 10^4 \pm 1,53 \times 10^3$ aA	$3,00 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^4$ aA	$2,92 \times 10^5 \pm 5,43 \times 10^4$ aA	TNTC
Hipoclorito de sódio	0,8 (v/v)	< 1	< 1	$6,50 \times 10^4 \pm 2,12 \times 10^4$ aA	$2,47 \times 10^4 \pm 4,16 \times 10^3$ aB	$1,05 \times 10^6 \pm 7,08 \times 10^5$ aB	$3,30 \times 10^6 \pm 1,13 \times 10^6$ bB

LAT 300 PLUS	0,8 (v/v)	< 1	$1,03 \times 10^5 \pm 4,95 \times 10^3$ aC	< 1	$9,95 \times 10^4 \pm 0,00$ aC	$3,11 \times 10^5 \pm 9,34 \times 10^4$ bA	TNTC
Soda cáustica	2,0 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	TNTC
Ácido nítrico	1,4 (v/v)	< 1	< 1	$3,35 \times 10^5 \pm 1,20 \times 10^5$ bB	< 1	< 1	TNTC
AgNP	0,005 (m/v)	< 1	< 1	$2,55 \times 10^5 \pm 5,77 \times 10^4$ cB	$1,00 \times 10^4 \pm 0,00$ dB	< 1	$2,50 \times 10^4 \pm 0,00$ cB
	0,01 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	$2,50 \times 10^4 \pm 0,00$ dB
	0,02 (m/v)	< 1	< 1	$1,70 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^3$ bA	< 1	< 1	< 1
NQ	0,4 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
ZnOnano	0,4 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

TNTC: Muito numeroso para contar (Too numerous to count); < 1: não houve crescimento na placa.
Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).
Teste Tukey determinando diferenças significativas ($p<0,05$), sendo os sobrescritos $^{a-d}$: linha (tratamento); e $^{A-C}$: coluna (dias).

A associação entre *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* é dependente da cepa das bactérias em análise, uma vez que, conforme descrito por Buchanan e Bagi (1999), a *P. fluorescens* pode estimular, inibir ou não ter nenhum efeito no crescimento de *L. monocytogenes.* Os autores variaram o pH e temperatura da cultura e o resultado foi igual ao obtido neste trabalho, uma vez que no teste realizado pelos autores a 4 ºC, em pH 7,0, houve um favorecimento do crescimento da *L. monocytogenes*, quando adicionado a *P. fluorescens*, uma vez que esta última pode produzir enzimas capazes de hidrolisar as proteínas do leite. Os produtos liberados após proteólise, como peptídeos e aminoácidos, podem estimular o crescimento de *L. monocytogenes*. Este é um dos fatores que confirmam a superioridade da *L. monocytogenes* em relação a *P. fluorescens* (Marshall e Schmidt, 1991). Por outro lado, Marshall *et al.* (1992) observaram que a *L. monocytogenes* pode inibir o crescimento de *P. fluorescens*, em temperaturas baixas, em seu estudo em carnes.

Vale ressaltar que na microbiologia não é possível replicar precisamente o crescimento bacteriano, podendo resultar em pequenas diferenças de contagem, uma vez que a formação de biofilmes varia de acordo com temperatura, tempo, oxigênio, fontes de nutrientes, características da superfície, dentre outros (Murthy e Venkatesan, 2008; Kavanagh, 2014).

Os valores de redução log estão relacionados com a eficiência de remoção do biofilme formado pelo tratamento aplicado, sendo que maiores valores deste termo representam uma melhor eficiência do tratamento, em relação ao controle. Apesar de elevados valores de desvio padrão em algumas amostras, analisando pelo coeficiente de variação (desvio padrão / média) de cada resultado (todos abaixo de 15), o desvio padrão de todas amostras neste trabalho podem ser consideradas válidas estatisticamente.

De forma geral, ambas bactérias apresentaram um crescimento ao longo dos 12 dias, comprovando a formação de biofilmes bacterianos nas condições propostas. Analisando o desenvolvimento do biofilme, a carga microbiana se manteve estatisticamente igual até 4 dias, com um aumento expressivo a partir do 6º dia. Para alguns tratamentos, houve uma redução de bactérias após 10 dias. Portanto, é possível sugerir períodos em que ocorreram os estágios de desenvolvimento do biofilme.

1. Adesão inicial: 2 dias;
2. Formação de micro colônias: entre 2 a 6 dias;
3. Maturação: entre 6 a 12 dias;

4. Dispersão: acima de 10 dias.

Na adesão inicial, estágio onde o biofilme é facilmente removível, o controle foi estatisticamente diferente dos sanitizantes aplicados, representando 2,25 x 10^5 (± 2,12 x 10^4) UFC·mL^{-1} para a *L. monocytogenes* e 2,67 x 10^4 (± 7,02 x 10^3) UFC·mL^{-1} para a *P. fluorescens*, enquanto o hipoclorito de sódio (HS), LAT 300 PLUS e soda caustica (SC) apresentaram valores menores que 1,20 x 10^4 (± 0,00) UFC·mL^{-1}, e não houve formação de colônias para o ácido nítrico (AN) e para os nanosanitizantes. Neste estágio, os nanosanitizantes e o AN são 99,99 % eficientes na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens.*

Durante a formação de micro colônias, estágio onde o biofilme produz EPS e já é capaz de realizar *Quorum Sensing*, o controle foi estatisticamente diferente dos sanitizantes aplicados para a *L. monocytogenes*, representando 2,87 x 10^5 (± 2,52 x 10^4) UFC·mL^{-1}, no 4º dia, enquanto o tratamento com sanitizantes garantiu que não houvesse crescimento na placa. Em relação a *P. fluorescens,* no mesmo dia, o controle e LAT apresentaram valores de UFC·mL^{-1}, enquanto os outros tratamentos apresentaram valores <1. Ou seja, os nanosanitizantes demonstraram eficiência semelhante que os sanitizantes comerciais, exceto o detergente LAT que apresentou desempenho inferior.

Durante a maturação do biofilme, estágio de maior evolução e maior resistência do biofilme contra antimicrobianos, houve uma diferença estatística entre o controle e demais tratamentos. Além disso, após 10 dias, os sanitizantes comerciais HS, LAT, e SC, apresentaram valores de UFC·mL^{-1}, para a *L. monocytogenes,* estatisticamente diferentes do ácido nítrico e dos nanosanitizantes, os quais apresentaram pouca formação de colônia. Os valores de UFC·mL^{-1} do controle, HS, e LAT, para *P. fluorescens*, foram estatisticamente diferentes dos outros tratamentos, os quais apresentaram valores <1. Ou seja, durante a maturação, os nanosanitizantes apresentaram eficiência semelhante ao AN, sendo superiores aos outros tratamentos aplicados. Entretanto, sabe-se que o tratamento com AN pode promover corrosão à superfície do equipamento, o que inviabiliza sua aplicação nas indústrias. Esta corrosão depende da reação catódica envolvida no processo redox entre os elementos presentes no aço, Fe, Cr e Ni, e também, depende da oxidação de íons e espécies presentes no meio. Na solução AN-água a reação catódica se dá pela reação de redução de HNO_3 (Kolman *et al.*, 1997; Ningshen *et al.*, 2011).

O estágio de dispersão é representado pela ruptura do biofilme e liberação de células de vida planctônicas e tolerantes, para colonizar outras superfícies. Este estágio é alcançado quando as condições da superfície não favorecem a proliferação microbiana,

portanto um biofilme pode se manter na superfície enquanto obtiver condições de sobrevivência, como substrato, oxigênio e sem perturbações externas. Ou seja, é possível que a dispersão do biofilme, e consequentemente, uma redução no valor de UFC possa acontecer com a suspensão do fornecimento de substrato. Entretanto, o foco deste projeto era manter o desenvolvimento do biofilme, mantendo a troca de leite a cada 2 dias. Por esse motivo, o biofilme não apresentou um estágio de dispersão tão acentuado após 12 dias (Cappitelli *et al.*, 2014).

Ainda no estágio de dispersão, no último dia de análise (12º dia), em termos de *L. monocytogenes*, o controle, HS, LAT, SC e AN apresentaram valores incontáveis de $UFC \cdot mL^{-1}$ (TNTC), e os nanosanitizantes tiveram valores próximos, abaixo de $2{,}50 \times 10^5$ (± 0,00) $UFC \cdot mL^{-1}$. Em termos de *P. fluorescens*, o controle e os tratamentos químicos comerciais apresentaram valores incontáveis de $UFC \cdot mL^{-1}$ (TNTC). Em destaque, os nanosanitizantes apresentaram valores < 1 $UFC \cdot mL^{-1}$. Este resultado mostra que os nanosanitizantes são mais eficientes do que os sanitizantes convencionais para remoção do biofilme após 12 dias.

Neste último estágio, pode-se observar que o LAT teve ação antibacteriana somente contra *L. monocytogenes* e o HS somente contra *P. fluorescens*, uma vez que os outros sanitizantes comerciais apresentaram valores incontáveis de $UFC \cdot mL^{-1}$ (TNTC). Uma hipótese para o fato está nos mecanismos de defesa, tais como diferença na composição da matriz do EPS produzido por cada bactéria, considerando que cada sanitizante é capaz de atingir uma estrutura diferente nesta matriz. A exata composição desta matriz ainda é controvérsia e varia de acordo com a bactéria e condições de crescimento, mas sabe-se que os componentes majoritários são polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. O excesso de EPS favorece que as substâncias possam se ligar aos agentes antimicrobianos e desintoxicar seus efeitos à medida que se difundem através do biofilme, protegendo as células mais internas (Chae e Schraft, 2001). A caracterização do EPS produzido pelo biofilme analisado neste trabalho pode propor melhores análises deste mecanismo de defesa. Ainda neste estágio, destaque para os nanosanitizantes que apresentaram valores abaixo de 10^5 para *L. monocytogenes* e < 1 $UFC \cdot mL^{-1}$ para a *P. fluorescens*.

De acordo com a Instrução Normativa - IN nº 60 (Anvisa, 2019a) e Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 255 (Anvisa, 2019b), bactérias patogênicas não podem estar presentes nas instalações de um laticínio. Portanto, em termos de *L. monocytogenes*, podemos considerar que HS, LAT, SC e AN foram eficientes somente até o 4º dia; AgNP

0,02 % (m/v), NQ 1,2 e 2,8 % (m/v) e ZnOnano foram eficientes até o 6º dia. Após este estágio, apesar de não alcançar uma eficiência adequada, os nanosanitizantes apresentaram maior atividade antimicrobiana do que os tratamentos comerciais, uma vez que a *L. monocytogenes* é uma bactéria extremamente resistente e de difícil controle. Analisando a *P. fluorescens* observa-se eficiência do LAT até o 2º dia, HS e AN até o 4º dia; SC e AgNP 0,01 % (m/v) até o 10º dia; e NQ e ZnOnano mais de 12 dias. Este resultado sugere a aplicação dos nanosanitizantes no controle de microrganismos patogênicos, em especial *P. fluorescens.*

Além da análise feita a partir das unidades de colônia, a eficiência de cada tratamento pode ser medida em comparação com o controle, a partir da redução log, conforme Tabela 9 e 10. De forma geral, houve uma flutuação destes valores ao longo dos dias de análise. Uma hipótese para o fato é de que a eficiência de sanitização diminuiu até um certo ponto, enquanto o número de UFC foi crescente ao longo de todos os dias. Em outras palavras, nos estágios iniciais de formação do biofilme os tratamentos ainda se mostravam eficazes, resultando em valores maiores da redução log. Já em estágios intermediários, alguns tratamentos não se mostraram eficazes, resultando em valores menores de redução log. Porém, os valores da contagem de colônias para estes tratamentos foram constantes desde os estágios intermediários até o último dia de análise, quando a quantidade de colônias para o controle foi superior aos tratamentos, resultando em um aumento novamente nos valores da redução log.

É possível que a queda da eficiência dos tratamentos tenha acontecido devido a formação de uma matriz heterogênea de EPS e ativação de mecanismos de resistência, como QS e formação de estruturas celulares, dificultando a ação do agente antimicrobiano, os quais ocorrem a partir do estágio de formação de micro colônias, sendo intensificados no estágio de maturação (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Conforme discutido e confirmado nesta seção, as nanoestruturas possuem atividade antimicrobiana capaz de superar estas barreiras, reafirmando o potencial em se aplicar nanotecnologia no controle de biofilmes.

Tabela 9. Valores de redução log UFC·mL^{-1}, em relação ao controle, de *Listeria monocytogenes* após diferentes tratamentos com produtos comerciais e nanosanitizantes.

Tratamentos	Concentração (%)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12
Hipoclorito de sódio	0,8 (v/v)	1,96 ± 0,13	0,99 ± 0,20	0,96 ± 0,14	1,39 ± 0,14	0,32 ± 0,00	0,77 ± 0,12
LAT 300 PLUS	0,8 (v/v)	1,70 ± 0,08	1,68 ± 0,04	2,46 ± 0,14	2,14 ± 0,19	0,16 ± 0,09	2,00 ± 0,00
Soda cáustica	2,0 (m/v)	1,27 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,04 ± 0,3	0,01 ± 0,01
Ácido nítrico	1,4 (v/v)	5,35 ± 0,04	5,46 ± 0,04	0,89 ± 0,18	2,07 ± 0,16	1,08 ± 0,06	0,09 ± 0,02
AgNP	0,005 (m/v)	5,35 ± 0,04	1,53 ± 0,12	0,89 ± 0,18	1,77 ± 0,15	2,77 ± 0,07	3,00 ± 0,00
	0,01 (m/v)	5,35 ± 0,04	5,46 ± 0,04	1,99 ± 0,29	1,77 ± 0,26	3,07 ± 0,09	3,00 ± 0,00
	0,02 (m/v)	5,35 ± 0,04	5,46 ± 0,04	2,64 ± 0,37	1,47 ± 0,16	3,08 ± 0,15	3,12 ± 0,06
NQ	0,4 (m/v)	5,35 ± 0,04	2,16 ± 0,04	1,99 ± 0,19	1,29 ± 0,16	2,55 ± 0,07	3,10 ± 0,02
	1,2 (m/v)	5,35 ± 0,04	2,16 ± 0,04	6,36 ± 0,14	1,42 ± 0,85	2,34 ± 0,07	3,13 ± 0,03
	2,8 (m/v)	5,35 ± 0,04	5,46 ± 0,04	6,36 ± 0,14	1,31 ± 0,14	2,30 ± 0,00	3,29 ± 0,04
ZnOnano	0,4 (m/v)	5,35 ± 0,04	5,46 ± 0,04	2,97 ± 0,19	1,00 ± 0,14	2,32 ± 0,04	3,04 ± 0,05
	1,2 (m/v)	5,35 ± 0,04	5,46 ± 0,04	3,12 ± 0,37	1,04 ± 0,15	2,31 ± 0,02	3,02 ± 0,02

	2,8 (m/v)	5,35 ± 0,02	5,46 ± 0,04	6,36 ± 0,14	1,43 ± 0,15	2,32 ± 0,05	3,14 ± 0,03

Tabela 10. Valores de log UFC·mL^{-1}, em relação ao controle, de *Pseudomonas monocytogenes* após diferentes tratamentos com produtos comerciais e nanosanitizantes.

Sanitizante	Concentração (%)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12
Hipoclorito de sódio	0,8 (v/v)	4,41 ± 0,04	1,07 ± 0,24	-0,38 ± 0,59	1,08 ± 0,16	-0,55 ± 0,03	1,09 ± 0,15
LAT 300 PLUS	0,8 (v/v)	1,41 ± 0,04	-0,68 ± 0,04	1,12 ± 0,14	0,48 ± 0,16	0,03 ± 0,14	0,19 ± 0,00
Soda cáustica	2,0 (m/v)	4,41 ± 0,04	1,03 ± 0,04	0,82 ± 0,14	1,77 ± 0,14	2,47 ± 0,00	0,19 ± 0,00
Ácido nítrico	1,4 (v/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	-1,09 ± 0,21	5,47 ± 0,14	5,47 ± 0,00	0,19 ± 0,00
AgNP	0,005 (m/v)	4,41 ± 0,04	0,73 ± 0,04	-0,98 ± 0,14	1,47 ± 0,14	1,88 ± 0,16	2,19 ± 0,00
	0,01 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	0,19 ± 0,15	2,37 ± 0,23	1,38 ± 0,42	2,19 ± 0,00
	0,02 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	4,42 ± 0,14	5,47 ± 0,14	2,32 ± 0,21	4,59 ± 0,00
NQ	0,4 (m/v)	4,41 ± 0,04	0,74 ± 0,16	0,19 ± 0,32	5,47 ± 0,14	5,47 ± 0,00	7,59 ± 0,00
	1,2 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	4,42 ± 0,14	5,47 ± 0,14	5,47 ± 0,00	7,59 ± 0,00
	2,8 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	4,42 ± 0,14	5,47 ± 0,14	5,47 ± 0,00	7,59 ± 0,00
ZnOnano	0,4 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	0,59 ± 0,23	5,47 ± 0,14	5,47 ± 0,00	7,59 ± 0,00

	1,2 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	0,73 ± 0,19	5,47 ± 0,14	2,47 ± 0,00	7,59 ± 0,00
	2,8 (m/v)	4,41 ± 0,04	4,33 ± 0,04	4,42 ± 0,14	3,37 ± 0,26	5,47 ± 0,00	7,59 ± 0,00

A eficiência do hipoclorito de sódio, comercialmente conhecido por água sanitária, para a *Listeria monocytogenes* teve máxima de 1,96 (± 0,13) ciclos log, no dia 2, e no dia 12 foi capaz de reduzir somente 0,77 (± 0,12); para a *Pseudomonas fluorescens* teve uma redução de 4,41 (± 0,04) ciclos log, no dia 2, e uma redução de 1,09 (0,15) ciclos log no dia 12. Este resultado demonstra que o sanitizante tem baixa eficiência em qualquer estágio de maturação do biofilme formado.

O efeito antibacteriano do HS está relacionado com a ação oxidativa nos grupos sulfidrilas das enzimas bacterianas, prejudicando reações metabólicas essenciais (Vianna *et al.*, 2004). Norwood e Gilmour (2000), em seu trabalho com biofilme de *L. monocytogenes*, obtiveram uma redução máxima de apenas 2 ciclos log no controle do biofilme com HS a 0,1 % (m/m) de cloro ativo, e concentrações menores não apresentaram redução log.

Bansal *et al.* (2021) indicam que HS pode reduzir a habilidade da *L. monocytogenes* de vida planctônica em formar biofilmes em poliestireno, quando observaram que não há formação de EPS com a exposição de HS. Pagedar e Singh (2015), em seu trabalho com biofilme de *P. aeruginosa* presente em laticínio, mostram que o hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio e iodóforo foram eficientes contra a bactéria em vida planctônica, porém são ineficientes no controle do biofilme formado. De acordo com os autores, a baixa eficiência de alguns biocidas está associada a dificuldade de penetração ao longo da matriz do biofilme, sua interação com os componentes da matriz, e pela presença de materiais orgânicos. Resultado semelhante foi observado por Stewart *et al.* (2001), em que o hipoclorito não foi eficiente na remoção de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, uma vez que o biofilme possui mecanismos de barreira que impedem a penetração do agente antimicrobiano. Portanto, HS pode ser recomendado apenas para a limpeza e remoção de sujidades, como material orgânico, o que facilita a ação posterior de um sanitizante.

O detergente alcalino, LAT 300 PLUS, teve uma eficiência de remoção de 1,70 (± 0,08) ciclos log no dia 2; 2,46 (± 0,14) ciclos log no dia 6; e 2,00 (± 0,00) ciclos log no dia 12, para a *L. monocytogenes.* Em relação a *P. fluorescens*, houve uma redução de 1,41 (± 0,04) ciclos log no dia 2, e somente 0,19 (± 0,00) após 12 dias. Este resultado demonstra que o sanitizante apresenta baixa eficiência de remoção das bactérias analisadas para qualquer estágio de maturação do biofilme.

A literatura não apresenta trabalhos aplicando LAT 300 PLUS na remoção de biofilmes. Apesar disso, o resultado encontrado neste trabalho para o sanitizante, está

próximo dos resultados para o hipoclorito de sódio e de outros detergentes alcalinos na literatura, como o SpecTak 1000, que foi utilizado a 1,5 % (m/m) por Peng *et al.* (2002) a fim de simular a limpeza CIP. Os autores encontraram uma redução de 1,18 log em biofilmes de *Bacillus cereus* formados em leite após 8 dias. O detergente alcalino, Tuff Stuff XF a 1,6 % (m/m), foi aplicado por Krysinski *et al.* (1992), sendo capaz de remover todas as células de *L. monocytogenes* formadas somente no primeiro dia. Estes resultados demonstram a baixa eficiência de detergentes alcalinos na remoção de biofilmes bacterianos.

O hidróxido de sódio, comercialmente conhecido por soda caustica, teve baixos valores de redução log, mostrando sua ineficiência como sanitizante de laticínios. Para a *L. monocytogenes,* no dia 2, houve uma redução de 1,27 (± 0,04) ciclos log, chegando em apenas 0,01 (± 0,01) ciclos log após 12 dias. Para a *P. fluorescens,* no dia 2 houve uma redução de 4,41 (± 0,04) ciclos log, e 0,19 (± 0,00) ciclos log no dia 12.

A literatura ainda é incipiente quanto ao uso de hidróxido de sódio para controle de biofilmes, mas sabe-se que sua atividade antimicrobiana está relacionada com interações com a matriz de EPS (Simões *et al.*, 2005). O resultado encontrado neste trabalho está de acordo com o trabalho de Kumari e Sarkar (2016), os quais encontraram uma redução log máxima de 2,55 para *B. cereus* PT4, usando 1,5 % NaOH, por 30 min, a 65 ºC. Pilotto *et al.* (2007) aplicou soda caustica 2,2 % para desinfecção do chão e notou uma redução log de 0,82 de coliformes totais.

O ácido nítrico se mostrou eficiente para a *L. monocytogenes* no primeiro estágio de maturação (até 4 dias, chegando a reduzir 5,46 ± 0,04 ciclos log), alcançando uma redução de 0,09 (± 0,02) ciclos log após 12 dias de desenvolvimento. Em relação a *P. fluorescens,* houve uma flutuação dos valores, chegando em 4,33 (± 0,04) ciclos log no dia 4, uma queda para -1,09 (± 0,21) ciclos log no dia 6, um aumento para 5,47 (± 0,14) ciclos log nos dias 8 e 10, e reduzindo para apenas 0,19 (± 0,00) ciclos log após 12 dias de formação de biofilme. Uma hipótese para que essa flutuação tenha ocorrido é devido a produção de substâncias, quando a bactéria está em estresse metabólico, que reduzem temporariamente a ação do ácido nítrico e favorecem o desenvolvimento do biofilme. Sandhya e Ali (2015) relatam que a matriz de EPS é um mecanismo de resposta ao estresse, e reportam a presença majoritária de ácido glucorônico, o qual pode sofrer oxidação e se ligar ao ácido nítrico, reduzindo a virulência do sanitizante. Pham *et al.* (2004) relatam que PHA (ácidos polihidroxialcanóicos) tem um papel fundamental na tolerância ao estresse. Portanto, são necessários testes para verificar a influência dessas

substâncias produzidas na ação do ácido nítrico. Este resultado mostra que o sanitizante tem eficiência contra as bactérias analisadas, porém esta eficiência varia muito ao longo da maturação do biofilme.

O produto aplicado na limpeza de uma superfície pode alterar a propriedade desta, sendo que os álcalis e ácidos fortes, como o ácido nítrico, tornam a superfície mais hidrofílica, enquanto ácidos fracos causam hidrofobicidade. Geralmente, bactérias aderem mais em superfícies hidrofílicas do que hidrofóbicas. Portanto, AN pode favorecer a formação de biofilmes, quando este não apresenta total eficiência (Chmielewski e Frank, 2003).

Entretanto, Gibson *et al.* (1999) observaram que detergentes ácidos são eficientes, com redução de 4 logs da população viável de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, incubadas em 5 dias, porém ainda restando 3 logs aderidos na superfície. Portanto, outra estratégia se mostra necessária para reduzir ainda mais essa população bacteriana. Jiang e Yuan (2013) mostram que a combinação de peróxido de oxigênio com ácido nitroso livre, pode formar intermediários reativos de nitrogênio e radicais livres, os quais são altamente tóxicos, podendo levar à inibição bacteriana. De acordo com os autores, nesta combinação, o ácido alcança uma maior eficiência biocida. Entretanto, os autores obtiveram uma redução máxima de 2 ciclos logs quando aplicaram o produto por 6 h em biofilmes de águas residuárias. Ou seja, a redução da carga microbiana ainda é baixa e exige um elevado tempo de exposição, o que inviabiliza a aplicação em indústrias.

As nanoestruturas de prata, quitosana e óxido de zinco apresentam atividade antimicrobiana comprovada, sendo mais eficiente que outros tratamentos. Entretanto, a literatura é incipiente quando se trata da aplicação destas nanoestruturas no controle de biofilmes em superfícies utilizando a técnica de quantificação em placa, principalmente quando se trata de laticínios.

As nanoestruturas de prata (AgNP) foram eficientes contra *L. monocytogenes* em todos os dias de análise, em todas as concentrações aplicadas (0,005; 0,001; e 0,02 % (m/v)), tendo máxima no estágio inicial do biofilme (até 4 dias), onde chegou a reduzir 5,46 (± 0,00) ciclos log, exceto para a primeira concentração, a qual reduziu 1,53 (± 0,12) ciclos log. Os valores de redução log tiveram uma queda ao longo dos dias, alcançando uma redução de cerca de 3,00 (± 0,00) ciclos log no dia 12. Em relação a *P. fluorescens,* no estágio inicial de maturação, o sanitizante foi capaz de reduzir 4,41 (± 0,04) ciclos log. Para os outros estágios, houve redução log, mas os valores foram diferentes entre as concentrações, sendo maior redução para maiores concentrações. Após 12 dias, à 0,02 %

(m/v) (AgNP 3), a redução foi de 4,59 (± 0,00) ciclos log e de 2,19 (± 0,00) ciclos log para as outras concentrações. Este resultado mostra que AgNP, mesmo em baixas concentrações, pode ser utilizado para remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em qualquer estágio de maturação.

AgNP apresentam alta área superficial de ação, elevada reatividade e mecanismos como aderência e penetração na parede celular, levando a perda da integridade da membrana e da permeabilidade. Os microrganismos são improváveis de desenvolver resistência contra nanoprata, em comparação com antibióticos, uma vez que AgNP interagem, simultaneamente, com vários alvos, como membrana, enzimas e plasmídeos (Wu *et al.*, 2014). Mohammed e Abdel Aziz (2019) encontraram uma atividade biocida de AgNP (100 $mg \cdot L^{-1}$) relativamente moderada contra *L. monocytogenes*, sendo possível aumentar esse efeito com a adição de peróxido de oxigênio. Manoharadas *et al.* (2021) observaram uma maior ação biocida, em testes de halo de inibição, contra *S. aureus* quando aplicado 1 $mmol \cdot L^{-1}$ AgNP + bacteriófagos. Vale ressaltar que a propriedade antimicrobiana depende do tamanho, estrutura cristalina e potencial *zeta* da nanoestrutura, e com isso os poucos resultados encontrados na literatura apresentam diferenças (Wang *et al.*, 2018).

As nanoestruturas de quitosana (NQ) apresentaram eficiência contra *L. monocytogenes* em todos dias de análise, em todas concentrações aplicadas, tendo redução de 5,34 (± 0,04) ciclos log no dia 2, passando por 6,36 (± 0,14) ciclos log, exceto para a menor concentração (1,99 (± 0,19) ciclos log), no dia 6, alcançando uma redução de até 3,29 (± 0,04) ciclos log, para a maior concentração, no dia 12. Esta queda na redução log se deve principalmente a alta resistência da bactéria contra o sanitizante. Uma hipótese para esta resistência está no mecanismo de defesa descrito anteriormente, a composição do EPS. A biossíntese do EPS produzido pela *Listeria* é ativada com altos índices de di-GMP cíclico, molécula tida como segundo mensageiro que coordena diversos aspectos no crescimento bacteriano, e é composta por N-acetil-manosamina e galactose (ManNAc-Gal) (Köseoğlu *et al.*, 2015; Jenal *et al.*, 2017). A indução de ManNAc-Gal por c-di-GMP é responsável por várias características fenotípicas, como agregação celular e elevação da tolerância à desinfetantes e desidratação, propiciando a *Listeria* sua permanência no meio (Colagiorgi *et al.*, 2016) Ou seja, é possível que esta bactéria seja capaz de resistir à alguns sanitizantes devido ao carboidrato produzido, porém esta análise precisa ser validada com experimentos de caracterização. Ainda assim, quando comparado com os outros tratamentos, NQ 2 e 3 apresentaram maiores reduções

de ciclos log. O sanitizante apresentou maior eficiência para a *P. fluorescens,* apresentando valores crescentes, iniciando em 4,41 (± 0,04) ciclos log no estágio inicial de maturação, passando por 4,42 (± 0,14) ciclos log em 6 dias, exceto para a menor concentração (0,19 (± 0,32) ciclos log), e chegando em 7,59 (± 0,00) ciclos log após 12 dias. O valor da redução log da NQ aumentou com o tempo devido ao aumento na diferença entre os valores de UFC·mL^{-1} do controle e de NQ. Ou seja, enquanto a quantidade de colônias aumentou para o controle, NQ conseguiu eliminar 99,99 % das colônias presentes. Este resultado sugere que NQ pode ser aplicado na sanitização de biofilmes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em qualquer estágio de maturação.

Devido seu tamanho reduzido, as nanoestruturas de quitosana podem penetrar na matriz extracelular dos biofilmes e por serem moléculas catiônicas, estas irão interagir com partículas aniônicas na superfície dos microrganismos, levando a inibição do crescimento celular. NQ apresentam um amplo espectro de ação e estas propriedades foram estudadas e comprovadas por Ikono *et al.* (2019), em testes de atividade antimicrobiana (quantidade de massa e viabilidade celular) de biofilme de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* com 18 h de incubação. Paomephan *et al.* (2018) aplicaram NQ como desinfetante de vegetais, e confirmaram a atividade antimicrobiana da nanoestrutura com tamanho de 328,6 nm contra *E. coli*, reduzindo 3,38 logs UFC·mL^{-1}, e com tamanho de 717,9 nm contra *Salmonella typhimurium*, reduzindo 2,83 logs UFC·mL^{-1}. Os autores relatam que a atividade antimicrobiana da NQ é dependente do seu tamanho e da estrutura de cada bactéria e não depende da carga superficial ou peso molecular dos polímeros da quitosana. Porém, ainda são necessários estudos para investigar este mecanismo.

As nanoestruturas de óxido de zinco (ZnOnano) apresentaram redução log em todos os dias de análise. Para a *L. monocytogenes* os valores de redução log iniciaram em 5,34 (± 0,04) para todas concentrações de ZnOnano, uma vez que não houve formação de colônias com o tratamento com ZnOnano. Devido aos mecanismos de resistência da bactéria, o tratamento não foi capaz de remover a bactéria em todos os dias. Entretanto, houve variações nos valores de redução log ao longo dos dias, alcançando valores próximos a 3,14 (± 0,03) no 12º dia. Para a *P. fluorescens*, no estágio inicial do biofilme, a redução log foi de 4,41 (± 0,04), alcançando 7,59 (± 0,00) no dia 12. Este aumento ao longo dos dias, se deve ao elevado valor de UFC do controle, em comparação a não formação de colônias quando o cupom foi submetido a ZnOnano em qualquer

concentração. Estes valores comprovam a eficiência do ZnOnano na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em qualquer estágio de maturação.

O mecanismo de ação antimicrobiana do ZnOnano não é totalmente compreendido e ainda é controverso. Pode ser atribuído a produção de peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio que, assim como os íons de zinco, causam inibição de atividades vitais das bactérias, como glicólise, translocação transmembrana de prótons e tolerância ao ácido. Esta propriedade é testada em diferentes áreas, como na incorporação de ZnOnano em PVC, material aplicado na medicina, a fim de reduzir a atividade de biofilmes de *S. aureus* (Seil e Webster, 2011). Bhattacharyya *et al.* (2018), comprovaram a eficiência de ZnOnano, em seu estudo com biofilmes de *Streptococcus pneumoniae*, para redução da formação de EPS via método de ácido fenol-sulfúrico, e obteve um MIC (concentração mínima inibitória) de 12 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de ZnOnano.

Em suma, em estágios mais avançados (após 12 dias), somente os nanosanitizantes foram capazes de reduzir de 3,00 a 7,59 ciclos log, enquanto os sanitizantes comerciais apresentaram uma redução de no máximo 2,00 ciclos log. Considerando que um sanitizante eficiente deve reduzir a contagem de células planctônicas de 5 logs ou mais e de células aderidas de 3 logs ou mais, dentre os tratamentos aplicados neste trabalho, somente as nanoestruturas atendem este requisito, enquanto a aplicação dos produtos comerciais como sanitizantes se mostra inviável (Lindsay e Von Holy, 1999).

5.3 ANÁLISE DO NANOCOMPÓSITO (HIDROGEL PPG/HMC/NANO)

A formação e desenvolvimento dos biofilmes de *E. coli* e *S. typhimurium* aderidos à aço inoxidável AISI 304 em caldo BHI foram observados com a quantificação das células aderidas, conforme Tabela 11. Frozi et al. (2017) confirmam a capacidade de formação de biofilmes das duas bactérias em questão em superfícies de aço inoxidável AISI 304, e reforçam a necessidade da higienização adequada na indústria de alimentos.

Tabela 11. Avaliação da eficiência de remoção de biofilmes bacterianos de *E. coli* e *S. typhimurium*, aderidos em superfícies de aço inoxidável, com diferentes tratamentos (álcool, hidrogel puro e hidrogel (HG) com nanoestruturas de prata, quitosana e óxido de zinco).

Tratamento	**Concentração (%)**	**UFC·mL^{-1}**		**Redução log**	
		E. coli	*S. typhimurium*	*E. coli*	*S. typhimurium*
Controle	-	$3,30 \times 10^{6\ A}$ ($\pm 1,13 \times 10^{6}$)	$8,40 \times 10^{6\ A}$ ($\pm 1,87 \times 10^{6}$)	-	-
Álcool em gel	70	$3,30 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 1,39 \times 10^{4}$)	$1,92 \times 10^{5\ B}$ ($\pm 4,90 \times 10^{4}$)	1,47 (± 0,38)	1,48 (± 0,09)
Hidrogel	-	$3,17 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 5,86 \times 10^{3}$)	$4,27 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 6,66 \times 10^{3}$)	1,02 (± 0,42)	1,92 (± 0,37)
HG+AgNP	0,005 (m/v)	$5,97 \times 10^{5\ B}$ ($\pm 2,62 \times 10^{5}$)	< 1	1,33 (± 0,34)	2,32 (± 0,61)
	0,01 (m/v)	$3,75 \times 10^{5\ B}$ ($\pm 1,63 \times 10^{5}$)	< 1	2,06 (± 0,33)	1,39 (± 0,37)
	0,02 (m/v)	$3,20 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 9,54 \times 10^{3}$)	< 1	3,77 (± 0,18)	2,46 (± 0,19)
HG+NQ	0,05835 (m/v)	$2,20 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 1,14 \times 10^{4}$)	< 1	2,74 (± 0,22)	3,22 (± 0,60)
	0,1167 (m/v)	< 1	< 1	3,38 (± 0,29)	2,79 (± 0,13)
	0,2334 (m/v)	< 1	< 1	3,98 (± 0,76)	3,29 (± 0,78)

HG+ZnOnano	0,4 (m/v)	$9,03 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 5,34 \times 10^{4}$)	$1,83 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 1,05 \times 10^{4}$)	3,17 (± 0,33)	3,27 (± 0,49)
	1,2 (m/v)	$1,15 \times 10^{5\ B}$ ($\pm 1,17 \times 10^{5}$)	< 1	2,68 (± 0,47)	2,29 (± 0,27)
	2,8 (m/v)	$2,15 \times 10^{5\ B}$ ($\pm 6,00 \times 10^{4}$)	$5,17 \times 10^{4\ B}$ ($\pm 3,13 \times 10^{4}$)	2,85 (± 0,18)	2,84 (± 0,49)

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).
Teste Tukey determinando diferenças significativas ($p<0,05$), sendo os sobrescritos $^{a-d}$: linha (bactérias); e $^{A-E}$: coluna (tratamentos)

Foram analisadas *E. coli* e *S. typhimurium* devido a sua patogenicidade e toxicidade, causando problemas de contaminação em laticínios e, consequentemente, problemas como diarreia, trombocitopenia, anemia e insuficiência renal aguda (Clegg *et al.*, 1983; Dehkordi *et al.*, 2014). Além dessas bactérias, é interessante a análise de outras bactérias patogênicas presentes em indústrias de alimentos, como *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*.

Os tratamentos álcool em gel e hidrogel foram mais eficientes contra *E. coli* do que contra *S. typhimurium*; enquanto os nanosanitizantes foram mais eficientes contra *S. typhimurium* do que contra *E. coli*. É possível atribuir essa diferença pela estrutura celular das bactérias, em que é possível que alguma biomolécula ou mecanismo da bactéria *E. coli* seja menos resistente para o álcool e da mesma forma para *S. typhimurium*, em relação as nanoestruturas (Martínez-Castañon et al., 2008).

Analisando os valores de $UFC \cdot mL^{-1}$ da Tabela 11, observamos que todos os tratamentos aplicados foram mais eficientes do que o controle na remoção dos biofilmes, sendo estatisticamente iguais entre si e diferentes do controle.

Para este trabalho, a eficiência do hidrogel foi analisada com foco em laticínios, mas o projeto pode ser aplicado em quaisquer outras superfícies metálicas em indústrias que almejam evitar contaminação. De acordo com os padrões microbiológicos sanitários estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 255 (Anvisa, 2019b), a partir da Instrução Normativa - IN nº 60 (Anvisa, 2019a), a tolerância para a presença de *E. coli* é de 10 $UFC \cdot mL^{-1}$ e ausente para *Salmonella*. Sendo assim, nenhum tratamento aplicado nesta análise foi capaz de reduzir a carga microbiana ao limite determinado pelo órgão regulamentador brasileiro. Essa dificuldade em atingir uma alta eficiência de sanitização poderia ser justificada pela concentração das nanoestruturas aplicadas nesta análise. Conforme comprovado pela análise antimicrobiana *in vitro* de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*, realizada neste trabalho, seria necessário, em geral, uma concentração acima de 2,8 % (m/v) dos nanosanitizantes. Ou seja, é possível que concentrações maiores de nanoestruturas teriam proporcionado uma maior eficiência ao hidrogel.

Os valores de redução log mostram a comparação entre o controle e os tratamentos, portanto maiores valores deste dado indicam uma maior eficiência. É possível observar que os nanocompósitos foram capazes de reduzir uma alta carga microbiana de *E. coli* e *S. typhimurium*, alcançando valores de redução próximos ou acima de 3 ciclos log, sendo cerca de duas vezes mais eficiente que o álcool em gel. Ou

seja, quando comparado com o álcool em gel, produto mais comumente utilizado para sanitização de superfícies em indústrias, a eficiência destes nanocompósitos é superior. Pode-se dizer também que a inserção de nanoestruturas aumentou a eficiência do hidrogel de PPG/HMC na remoção de biofilmes de *E. coli* e *S. typhimurium*, uma vez que o hidrogel puro obteve valores de até 1,92 ciclos log.

A baixa eficiência apresentada pelo álcool em gel pode ser explicada pela incapacidade de romper as barreiras do biofilme e adentrá-lo (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). O trabalho de Abati et al. (2012), houveram valores de UFC acima do limite satisfatório para álcool em gel 70 %, reforçando a importância de alternativas para garantir a higiene dos manipuladores de alimentos e sanitização das instalações de indústrias de alimentos. Apesar disso, o mecanismo de ação do álcool em bactérias tem como hipótese o dano à membrana, inibição do mRNA e desnaturação de proteínas, quando em concentrações entre 60 a 90 %, uma vez que a água é importante no processo de desnaturação de proteínas. O principal componente responsável por esse processo é o *n*-propanol (Golin *et al.*, 2020).

Considerando que um sanitizante eficiente deve reduzir a contagem de células planctônicas em 5 logs ou mais e de células sésseis de 3 logs ou mais (Lindsay e Von Holy, 1999), o álcool em gel se mostrou inviável e a inserção de 0,02 % (m/v) de AgNP, de 0,2334 % (m/v) de NQ, ou de 0,4 % (m/v) de ZnOnano foi capaz de alcançar valores acima de 3 ciclos logs e, portanto, tem um alto potencial para a higienização de superfícies em indústrias. Conforme relatado na seção 5.1, a superioridade das nanoestruturas pode ser justificada pelo seu tamanho reduzido, facilitando sua penetração na matriz extracelular dos biofilmes, provocando vazamento de biomoléculas, e ainda pela liberação de íons que interagem com vários alvos, como membrana, enzimas e plasmídeos, causando a morte celular. Estes mecanismos ainda são hipóteses e precisam de mais estudos para sua comprovação (Wu *et al.*, 2014; Ikono *et al.*, 2019).

Apesar de não conseguir reduzir a carga microbiana à um nível tolerável determinado pela ANVISA, o nanocompósito sintetizado apresenta eficiência superior ao produto aplicado na sanitização em indústrias de alimentos, o álcool em gel. Além disso, considerando que o álcool em gel pode selecionar patógenos resistentes, os hidrogéis com nanoestruturas apresentam potencial para substituir o produto comercial, mitigando o problema da contaminação na indústria de alimentos, garantindo a segurança dos alimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de alimentos é um problema muito preocupante para todos, uma vez que pode veicular diversas doenças ao consumidor e gerar perdas econômicas para a indústria. Os 3 testes realizados neste trabalho confirmam o potencial que a nanotecnologia tem para solucionar problemas de contaminação em laticínios. Estes testes se complementam, uma vez que a atividade antimicrobiana detalha a concentração mínima dos sanitizantes para atingir inibição bacteriana, além de confirmar a propriedade antimicrobiana das nanoestruturas; o teste do hidrogel mostra quais nanoestruturas podem ser aplicadas na sanitização de bancadas e superfícies de aço inoxidável em indústrias de alimentos; e o controle de biofilmes bacterianos presentes nos equipamentos de laticínios a partir de diferentes dispersões de nanotecnologia pode mitigar os problemas de contaminação de produtos lácteos.

A Tabela 12 apresenta uma comparação entre os tratamentos aplicados neste trabalho, mostrando o potencial de aplicação dos nanosanitizantes em indústrias de alimentos, principalmente em laticínios.

7 CONCLUSÃO

Este projeto comprova a eficiência de nanoestruturas de prata, de quitosana, de óxido de zinco e de carbonato de cálcio no controle de biofilmes bacterianos de *Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli e Salmonella typhimurium* formados em superfícies de aço inoxidável em laticínios. Os produtos convencionais aplicados nas indústrias tiveram uma eficiência inferior no controle destes biofilmes após 12 dias de análise, em relação às nanoestruturas, sendo 164,5 % para *L. monocytogenes*, 759,0 % para *P. fluorescens*, 270,7 % para *E. coli* e 171,4 % para *S. typhimurium*. Portanto, os nanosanitizantes analisados possuem um potencial de transformação no processo de limpeza industrial e, consequentemente, garantindo a segurança e saúde do consumidor.

Tabela 12. Resumo do potencial de aplicação das nanoestruturas para controle microbiológico em relação a sanitizantes convencionais. A eficiência foi analisada em termos da redução log de biofilmes em aço inoxidável e a concentração foi obtida via análise antimicrobiana *in vitro* por 51 h.

Tratamento	**Aplicação**	**Espectro de ação**	**Concentração (µg/mL)**	**Eficiência inicial**	**Eficiência final**	**Mecanismo de ação**
Hipoclorito de sódio	CIP de laticínios	*Listeria*	*	1,96	0,77	Afeta reações metabólicas pela inibição de enzimas bacterianas.
		Pseudomonas		4,41	1,09	
LAT 300 PLUS	CIP de laticínios	*Listeria*	5,00	1,70	2,00	
		Pseudomonas	4,05	1,41	0,19	
Soda caustica	CIP de laticínios	*Listeria*	1,99	1,27	0,01	Destrói a matriz de EPS.
		Pseudomonas	0,79	4,41	0,19	
Ácido nítrico	CIP de laticínios	*Listeria*	1,20	5,35	0,09	Afeta o mecanismo de bombeamento de prótons do citoplasma.
		Pseudomonas	1,20	4,41	0,19	
Álcool em gel	Superfícies metálicas	*E. coli*	**	1,47		Dano à membrana, inibição do mRNA e desnaturação de proteínas.
		Salmonella		1,48		
Hidrogel	Superfícies metálicas	*E. coli*	**	1,02		
		Salmonella		1,92		

Nanoestrutura de prata	CIP de laticínios e superfícies metálicas	*Listeria* *Pseudomonas*	6,00 5,00	5,35 4,41	3,12 4,59	Penetração na célula e interação com DNA e outras estruturas.
Nanoestruturas de quitosana	CIP de laticínios e superfícies metálicas	*Listeria* *Pseudomonas*	3,04 4,00	5,35 4,41	3,29 7,59	Interação com partículas aniônicas.
Nanoestruturas de óxido de zinco	CIP de laticínios e superfícies metálicas	*Listeria* *Pseudomonas*	3,04 5,00	5,35 4,41	3,14 7,59	Liberação de íons zinco que inibem funções vitais.
Nanoestruturas de carbonato de cálcio	CIP de laticínios e superfícies metálicas	*Listeria* *Pseudomonas*	4,00 4,05	-		Produção de ROS que levam à morte celular.

*. Não foi alcançado a Concentração Mínima Inibitória até 5,0 µg/mL.
**. Teste não foi realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASTECIMENTO, M. D. A. P. E. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado**. Instrução normativa nº 51 2002.

ABATI, M.; GELINSKI, J. L. N.; BARATTO, C. M. Monitoramento microbiológico rápido e condições higiênicas de manipuladores de uma indústria de alimentos. **Evidência,** v. 12, n. 2, p. 187-196, 2012. ISSN 2236-6059.

ADEYEYE, S. A. O.; FAYEMI, O. E. Nanotechnology and food processing: between innovations and consumer safety. **Journal of Culinary Science & Technology,** v. 17, n. 5, p. 435-452, 2019. ISSN 1542-8052.

AGHABABAZADEH, R. et al. ZnO nanoparticles synthesised by mechanochemical processing. Journal of Physics: Conference Series, 2006, IOP Publishing. p.075.

ANDRADE BOARI, C. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por Aeromonas hydrophila e Staphylococcus aureus usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 29, n. 4, 2009. ISSN 0101-2061.

ANDREWS, G. Distinguishing pasteurized, UHT and sterilized milks by their lactulose content. **International Journal of Dairy Technology,** v. 37, n. 3, p. 92-95, 1984. ISSN 1364-727X.

ANTUNES, F. S. et al. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia,** v. 9, n. 1, 2013. ISSN 1808-7310.

ANTUNES, V. D. C. Uso de microfiltração para melhoria da qualidade e extensão da vida de prateleira de leite pasteurizado. **Brazilian Journal of Food Technology,** v. 17, p. 75-86, 2014. ISSN 1981-6723. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232014000100011&nrm=iso >.

ANVISA, A. N. D. V. S. Instrução Normativa - IN nº 60, de 23 de dezembro de 2019. 2019a. Disponível em: < https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356 >.

_____. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 331, de 23 de dezembro de 2019. 2019b. Disponível em: < https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272 >.

ANVISA, L. D. B. ESCOPO DA HABILITAÇÃO REBLAS - ABNT NBR ISO/IEC 17025. 2018. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/33860/4528726/PROLAB+Laborat%C3%B3rio+de+Biotecnologia+-+Escopo+17025+a+partir+de+29+05+2018.pdf/dc0f043a-268e-4af0-bdd5-1664f49db748 >.

AO, W. et al. Mechanochemical synthesis of zinc oxide nanocrystalline. **Powder Technology,** v. 168, n. 3, p. 148-151, 2006. ISSN 0032-5910.

ARAUJO, E. A. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles against bacterial cells adhered to stainless steel surfaces. **Journal of food protection,** v. 75, n. 4, p. 701-705, 2012. ISSN 0362-028X.

ARBEX, W. et al. **Controle inteligente da qualidade do leite**. Anuário leite: EMBRAPA 2019.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology,** v. 16, n. 7, p. 397, 2018. ISSN 1740-1534.

ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials,** v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012. ISSN 0142-9612.

ATAEE, R. et al. Antibacterial effect of calcium carbonate nanoparticles on Agrobacterium tumefaciens. **Journal Mil Med,** v. 13, n. 2, p. 65-70, 2011.

BABOU-KAMMOE, R. et al. Synthesis of CaCO3 nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions. **The Canadian journal of chemical engineering,** v. 90, n. 1, p. 26-33, 2012. ISSN 0008-4034.

BANK, W. Food-borne Illnesses Cost US$ 110 Billion Per Year in Low- and Middle-Income Countries. 2018. Disponível em: < https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2018/10/23/food-borne-illnesses-cost-us-110-billion-per-year-in-low-and-middle-income-countries >.

BANSAL, M. et al. Decreased biofilm formation by planktonic cells of Listeria monocytogenes in the presence of sodium hypochlorite. **Food Microbiology,** v. 96, p. 103714, 2021/06/01/ 2021. ISSN 0740-0020. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002020303038 >.

BARANCELLI, G. V. et al. Listeria monocytogenes: ocorrência em produtoslácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BARZEGARI, A. et al. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. **Infection and Drug Resistance,** v. 13, p. 659, 2020.

BATA-VIDÁCS, I. et al. Nanotechnology and microbial food safety. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex, Zubaran**, p. 155-159, 2013.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Archives of Ophthalmology,** v. 126, n. 11, p. 1572-1581, 2008. ISSN 0003-9950.

BERNI NETO, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2008.

BEVERIDGE, T. J. Use of the Gram stain in microbiology. **Biotechnic & Histochemistry,** v. 76, n. 3, p. 111-118, 2001/01/01 2001. ISSN 1052-0295. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118 >.

BHATTACHARYYA, P. et al. Zinc oxide nanoparticle inhibits the biofilm formation of Streptococcus pneumoniae. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 111, n. 1, p. 89-99, 2018/01/01 2018. ISSN 1572-9699. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s10482-017-0930-7 >.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por Aeromonas hydrophila e Staphylococcus aureus usando leite e diferentes condições de cultivo. **Food Science and Technology,** v. 29, p. 886-895, 2009. ISSN 0101-2061.

BOELS, G. et al. **Product and method for removal of biofilms**: Google Patents 2018.

BOMMARITO, G. M. et al. **Engineered surfaces for reducing bacterial adhesion**: Google Patents 2013.

BRASIL, M. D. S. Informações técnicas: Doenças transmitidas por alimentos. 2020a. Disponível em: < https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/informacoes-tecnicas >.

_____. Situação epidemiológica DTA. 2020b. Disponível em: < http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/situacao-epidemiologica >.

BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International journal of food microbiology,** v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006. ISSN 0168-1605.

BUCHANAN, R. L.; BAGI, L. K. Microbial competition: effect of Pseudomonas fluorescens on the growth of Listeria monocytogenes. **Food Microbiology,** v. 16, n. 5, p. 523-529, 1999/10/01/ 1999. ISSN 0740-0020. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002098902647 >.

BUCHANAN, R. L. et al. A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food control,** v. 75, p. 1-13, 2017. ISSN 0956-7135.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997. ISSN 0021-8995.

CAMINO FELTES, M. M.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P.; BLOCK, J. M. Food quality, food-borne diseases, and food safety in the Brazilian food industry. **Food Quality and Safety,** v. 1, n. 1, p. 13-27, 2017. ISSN 2399-1399.

CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. **Food Engineering Reviews,** v. 6, n. 1-2, p. 29-42, 2014. ISSN 1866-7910.

CARRILLO-INUNGARAY, M. L. et al. Use of nanoparticles in the food industry: advances and perspectives. In: (Ed.). **Impact of nanoscience in the food industry**: Elsevier, 2018. p.419-444.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Cell viability of Listeria monocytogenes biofilms. **Food Microbiology,** v. 18, n. 1, p. 103-112, 2001/02/01/ 2001. ISSN 0740-0020. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002000903745 >.

CHATTERJEE, A.; ABRAHAM, J. Microbial contamination, prevention, and early detection in food industry. In: (Ed.). **Microbial Contamination and Food Degradation**: Elsevier, 2018. p.21-47.

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 & technology,** v. 96, n. 1, p. 27-38, 2016. ISSN 1958-5586.

CHMIELEWSKI, R.; FRANK, J. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety,** v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003. ISSN 1541-4337.

CLEGG, F. et al. Outbreaks of Salmonella newport infection in dairy herds and their relationship to management and contamination of the environment. **The Veterinary Record,** v. 112, n. 25, p. 580-584, 1983. ISSN 0042-4900.

COLAGIORGI, A. et al. Listeria monocytogenes biofilms in the wonderland of food industry. **Pathogens,** v. 6, n. 3, p. 41, 2017.

COLAGIORGI, A. et al. A Look inside the Listeria monocytogenes Biofilms Extracellular Matrix. **Microorganisms,** v. 4, n. 3, 2016. ISSN 2076-2607.

COSTERTON, J. W. et al. New methods for the detection of orthopedic and other biofilm infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology,** v. 61, n. 2, p. 133-140, 2011. ISSN 0928-8244. Disponível em: < https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00766.x >. Acesso em: 2/20/2021.

CURIALE, M. S.; LEWUS, C. Detection of Listeria monocytogenes in samples containing Listeria innocua. **Journal of Food Protection,** v. 57, n. 12, p. 1048-1051, 1994. ISSN 0362-028X.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. **Polish Journal of Environmental Studies,** v. 16, n. 6, 2007. ISSN 1230-1485.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current opinion in microbiology,** v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013. ISSN 1369-5274.

DE PAZ, L. E. C. et al. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on Streptococcus mutans biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 77, n. 11, p. 3892-3895, 2011. ISSN 0099-2240.

DEGROOTE, M. A.; FANG, F. C. Antimicrobial properties of nitric oxide. In: (Ed.). **Nitric oxide and infection**: Springer, 2002. p.231-261.

DEHKORDI, F. S. et al. Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of Escherichia coli strains in fermented dairy products. **BMC Research Notes,** v. 7, n. 1, p. 217, 2014/04/07 2014. ISSN 1756-0500. Disponível em: < https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-217 >.

DEINHAMMER, R.; ANDERSEN, C. **Methods For Preventing, Removing, Reducing, or Disrupting Biofilm**: Google Patents 2008.

DEQUEIROZ, G. A.; DAY, D. F. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing Pseudomonas aeruginosa biofilms from surfaces. **Journal of Applied Microbiology,** v. 103, n. 4, p. 794-802, 2007/10/01 2007. ISSN 1364-5072. Disponível em: < https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03299.x >. Acesso em: 2021/03/22.

DING, X. et al. Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of Pseudomonas aeruginosa biofilm. **Journal of medical microbiology,** v. 60, n. 12, p. 1827-1834, 2011. ISSN 1473-5644.

DYNES, J. J. et al. Morphological and biochemical changes in Pseudomonas fluorescens biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 55, n. 2, p. 163-178, 2009/02/01 2009. ISSN 0008-4166. Disponível em: < https://doi.org/10.1139/W08-109 >. Acesso em: 2021/03/03.

EL ABED, S. et al. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. In: (Ed.). **Scanning electron microscopy**: Intechopen, 2012.

FABREGA, J.; RENSHAW, J. C.; LEAD, J. R. Interactions of silver nanoparticles with Pseudomonas putida biofilms. **Environmental science & technology,** v. 43, n. 23, p. 9004-9009, 2009. ISSN 0013-936X.

FIGUEIREDO, E. L.; MELO, J. K. L.; NEVES, N. C. O. Diagnóstico higiênico-sanitário e da qualidade microbiológica de produtos lácteos em um Laticínio localizado em Tucuruí-Pará. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes,** v. 71, n. 2, p. 53-64, 2016. ISSN 2238-6416.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology,** v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010. ISSN 1740-1534.

FRANCI, G. et al. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Molecules,** v. 20, n. 5, 2015. ISSN 1420-3049.

FROZI, J. B.; ESPER, L. M. R.; FRANCO, R. M. Formação de Biofilmes Mono e Multi-espécies de Escherichia coli, Staphylococcus aureus, e Salmonella spp. Isoladas de Pescado Cru e Indústria de Pescado. **Ciência Rural,** v. 47, n. 10, 2017. ISSN 0103-8478.

FURUKAWA, S. et al. Removing Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. **Food Control,** v. 21, n. 5, p. 669-672, 2010. ISSN 0956-7135.

GALIE, S. et al. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology,** v. 9, p. 898, 2018. ISSN 1664-302X.

GAREDEW, L. et al. Identification of gram-negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town and its suburbs, Ethiopia. **BMC public health,** v. 12, n. 1, p. 950, 2012. ISSN 1471-2458.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science,** v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008/09/10/ 2008. ISSN 1002-0071. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002007108002049 >.

GHATAK, P. D. et al. A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption. **Scientific reports,** v. 8, n. 1, p. 873, 2018. ISSN 2045-2322.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology,** v. 87, n. 1, p. 41-48, 1999/07/01 1999. ISSN 1364-5072. Disponível em: < https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00790.x >. Acesso em: 2021/03/11.

GOLIN, A. P.; CHOI, D.; GHAHARY, A. Hand sanitizers: A review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery, and efficacy against coronaviruses. **American Journal of Infection Control,** v. 48, n. 9, p. 1062-1067, 2020/09/01/ 2020. ISSN 0196-6553. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655320305629 >.

GRAZIANI, C. et al. Salmonella. In: DODD, C. E. R.;ALDSWORTH, T., *et al* (Ed.). **Foodborne Diseases**. Elsevier, 2017. p.133-169.

GRUTSCH, A. A. et al. Bacillus spp. as Pathogens in the Dairy Industry. In: (Ed.). **Foodborne Diseases**: Elsevier, 2018. p.193-211.

GU, H.; REN, D. Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances. **Frontiers of Chemical Science and Engineering,** v. 8, n. 1, p. 20-33, 2014. ISSN 2095-0179.

HARPER, D. R. et al. Bacteriophages and biofilms. **Antibiotics,** v. 3, n. 3, p. 270-284, 2014.

HORIE, M. et al. Evaluation of cellular influences caused by calcium carbonate nanoparticles. **Chemico-Biological Interactions,** v. 210, p. 64-76, 2014/03/05/ 2014. ISSN 0009-2797. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279714000040 >.

HU, Y. et al. Self-aggregation and antibacterial activity of N-acylated chitosan. **Polymer,** v. 48, n. 11, p. 3098-3106, 2007. ISSN 0032-3861.

HUANG, K.; DOU, F.; NITIN, N. Biobased Sanitizer Delivery System for Improved Sanitation of Bacterial and Fungal Biofilms. **ACS applied materials & interfaces,** v. 11, n. 19, p. 17204-17214, 2019. ISSN 1944-8244.

HUNT, S. M. et al. Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 70, n. 12, p. 7418, 2004. Disponível em: < http://aem.asm.org/content/70/12/7418.abstract >.

IKONO, R. et al. Nanochitosan antimicrobial activity against Streptococcus mutans and Candida albicans dual-species biofilms. **BMC Research Notes,** v. 12, n. 1, p. 383, 2019/07/08 2019. ISSN 1756-0500. Disponível em: < https://doi.org/10.1186/s13104-019-4422-x >.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratioElectronic supplementary information (ESI) available: UV–VIS spectra of silver nanorods. See http://www. rsc. org/suppdata/cc/b1/b100521i. **Chemical Communications**, n. 7, p. 617-618, 2001.

JANG, J. et al. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology,** v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017. ISSN 1364-5072.

JENAL, U.; REINDERS, A.; LORI, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. **Nature Reviews Microbiology,** v. 15, n. 5, p. 271-284, 2017/05/01 2017. ISSN 1740-1534. Disponível em: < https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190 >.

JIANG, G.; YUAN, Z. Synergistic inactivation of anaerobic wastewater biofilm by free nitrous acid and hydrogen peroxide. **Journal of Hazardous Materials,** v. 250-251, p. 91-98, 2013/04/15/ 2013. ISSN 0304-3894. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389413000654 >.

JOHANSEN, C. **Method for enzymatic treatment of biofilm**: Google Patents 2000.

JONES, M. L. et al. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. **Applied microbiology and biotechnology,** v. 88, n. 2, p. 401-407, 2010. ISSN 1432-0614.

JUN, W. et al. Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. **Journal of food engineering,** v. 99, n. 3, p. 314-322, 2010. ISSN 0260-8774.

KAFETZOPOULOS, D. P.; PSOMAS, E. L.; KAFETZOPOULOS, P. D. Measuring the effectiveness of the HACCP food safety management system. **Food control,** v. 33, n. 2, p. 505-513, 2013. ISSN 0956-7135.

KAVANAGH, F. **Analytical microbiology**. Elsevier, 2014. ISBN 1483270548.

KIM, M. K. et al. Surface-attached molecules control Staphylococcus aureus quorum sensing and biofilm development. **Nature microbiology,** v. 2, n. 8, p. 17080, 2017. ISSN 2058-5276.

KOLMAN, D. G. et al. Corrosion of 304 stainless steel exposed to nitric acid-chloride environments. **Corrosion Science,** v. 39, n. 12, p. 2067-2093, 1997/12/01/ 1997. ISSN 0010-938X. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X97000929 >.

KÖSEOĞLU, V. K. et al. L isteria monocytogenes exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. **Molecular microbiology,** v. 96, n. 4, p. 728-743, 2015. ISSN 0950-382X.

KRYSINSKI, E. P.; BROWN, L. J.; MARCHISELLO, T. J. Effect of Cleaners and Sanitizers on Listeria monocytogenes Attached to Product Contact Surfaces. **Journal of Food Protection,** v. 55, n. 4, p. 246-251, 1992. ISSN 0362-028X. Disponível em: < https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.4.246 >. Acesso em: 3/4/2021.

KUKHTYN, M. et al. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. 2017.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology,** v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998. ISSN 0168-1605.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control,** v. 69, p. 20-29, 2016. ISSN 0956-7135.

LABIB, M. E.; LAI, C.-Y. **Cleaning method for removing biofilm and debris from lines and tubing**: Google Patents 2000.

LARSON, E. L.; EKE, P. I.; LAUGHON, B. E. Efficacy of alcohol-based hand rinses under frequent-use conditions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 30, n. 4, p. 542, 1986. Disponível em: < http://aac.asm.org/content/30/4/542.abstract >.

LEE, Y.-D.; KIM, J.-Y.; PARK, J.-H. Characteristics of coliphage ECP4 and potential use as a sanitizing agent for biocontrol of Escherichia coli O157: H7. **Food control,** v. 34, n. 2, p. 255-260, 2013. ISSN 0956-7135.

LEQUETTE, Y. et al. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. **Biofouling,** v. 26, n. 4, p. 421-431, 2010. ISSN 0892-7014.

LINDSAY, D. et al. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated Bacillus cereus and a

Pseudomonas fluorescens isolate. **Journal of Applied Microbiology,** v. 92, n. 2, p. 352-361, 2002. ISSN 1364-5072.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Different responses of planktonic and attached Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens to sanitizer treatment. **Journal of Food Protection,** v. 62, n. 4, p. 368-379, 1999. ISSN 0362-028X.

LOU, Z. et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. **Journal of Food Science,** v. 76, n. 6, p. M398-M403, 2011/08/01 2011. ISSN 0022-1147. Disponível em: < https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02213.x >. Acesso em: 2021/07/22.

LU, X. et al. Application of Mid-infrared and Raman Spectroscopy to the Study of Bacteria. **Food and Bioprocess Technology,** v. 4, n. 6, p. 919-935, 2011/08/01 2011. ISSN 1935-5149. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s11947-011-0516-8 >.

LYCZAK, J. B.; SCHECHTER, P. J. Nanocrystalline silver inhibits antibiotic-, antiseptic-resistant bacteria. **Clinical Pharmacology & Therapeutics,** v. 77, n. 2, p. P60-P60, 2005/02/01 2005. ISSN 0009-9236. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.12.119 >. Acesso em: 2021/07/11.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582712987.

MAHAMUNI-BADIGER, P. P. et al. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C,** v. 108, p. 110319, 2020/03/01/ 2020. ISSN 0928-4931. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119323793 >.

MANOHARADAS, S. et al. Concerted dispersion of Staphylococcus aureus biofilm by bacteriophage and 'green synthesized'silver nanoparticles. **RSC Advances,** v. 11, n. 3, p. 1420-1429, 2021.

MARION, K. **Method of removing a biofilm**: Google Patents 2005.

MARRIOTT, N. G.; SCHILLING, M. W.; GRAVANI, R. B. Food Contamination Sources. In: MARRIOTT, N. G.;SCHILLING, M. W., *et al* (Ed.). **Principles of Food Sanitation**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p.83-91. ISBN 978-3-319-67166-6.

MARSHALL, D. L. et al. Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of Listeria monocytogenes and Pseudomonas fluorescens on precooked chicken. **Food Microbiology,** v. 9, n. 4, p. 303-309, 1992/12/01/ 1992. ISSN 0740-0020. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0740002092800386 >.

MARSHALL, D. L.; SCHMIDT, R. H. Physiological evaluation of stimulated growth of Listeria monocytogenes by Pseudomonas species in milk. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 37, n. 8, p. 594-599, 1991/08/01 1991. ISSN 0008-4166. Disponível em: < https://doi.org/10.1139/m91-101 >. Acesso em: 2021/03/17.

MARTIN, J. G. P. **Biofilmes de Staphylococcus aureus isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal**. 2015. Universidade de São Paulo

MARTÍNEZ-CASTAÑON, G.-A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of nanoparticle research,** v. 10, n. 8, p. 1343-1348, 2008. ISSN 1572-896X.

MEIRELES, A.; SIMÕES, M. Sanitation of equipment. In: (Ed.). **Food Preservation**: Elsevier, 2017. p.167-195.

MERINO, L. et al. Biofilm formation by Salmonella sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International,** v. 119, p. 530-540, 2019. ISSN 0963-9969.

MIRZAEI, H.; DARROUDI, M. Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. **Ceramics International,** v. 43, n. 1, p. 907-914, 2017. ISSN 0272-8842.

MOHAMMED, A. N.; ABDEL AZIZ, S. A. A. Novel approach for controlling resistant Listeria monocytogenes to antimicrobials using different disinfectants types loaded on silver nanoparticles (AgNPs). **Environmental Science and Pollution Research,** v. 26, n. 2, p. 1954-1961, 2019/01/01 2019. ISSN 1614-7499. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s11356-018-3773-5 >.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology,** v. 16, n. 10, p. 2346, 2005. ISSN 0957-4484.

MURTHY, P. S.; VENKATESAN, R. Industrial biofilms and their control. 2008.

NILSSON, A. S. Pharmacological limitations of phage therapy. **Upsala Journal of Medical Sciences,** v. 124, n. 4, p. 218-227, 2019/10/02 2019. ISSN 0300-9734. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1688433 >.

NINGSHEN, S. et al. Corrosion behaviour of AISI type 304L stainless steel in nitric acid media containing oxidizing species. **Corrosion Science,** v. 53, n. 1, p. 64-70, 2011/01/01/ 2011. ISSN 0010-938X. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X10004543 >.

NIÑO-MARTÍNEZ, N. et al. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 20, n. 11, p. 2808, 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2808 >.

NISHIMURA, T. et al. Bacteremia or pseudobacteremia? Review of Pseudomonas fluorescens infections. **World journal of emergency medicine,** v. 8, n. 2, p. 151, 2017.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of Listeria monocytogenes in a steady-state multispecies biofilm. **Journal of Applied**

Microbiology, v. 88, n. 3, p. 512-520, 2000/03/01 2000. ISSN 1364-5072. Disponível em: < https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00990.x >. Acesso em: 2021/03/03.

O'CALLAGHAN, K. A.; KERRY, J. P. Preparation of low-and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. **Food Control,** v. 69, p. 256-261, 2016. ISSN 0956-7135.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology,** v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000. ISSN 0066-4227.

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, n. 8, p. 5317-5322, 2015/08/01 2015. ISSN 0975-8402. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s13197-014-1575-4 >.

PAOMEPHAN, P. et al. Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against Escherichia coli and Salmonella Typhimurium and their application as vegetable wash disinfectant. **Food Control,** v. 86, p. 294-301, 2018/04/01/ 2018. ISSN 0956-7135. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517304553 >.

PASSOS DA SILVA, D. et al. An update on the sociomicrobiology of quorum sensing in gram-negative biofilm development. **Pathogens,** v. 6, n. 4, p. 51, 2017.

PAZ, B. E. R. et al. **Obtenção e caracterização de nanoestruturas de carbonato de cálcio**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. São Carlos - SP 2017.

PENG, J.-S.; TSAI, W.-C.; CHOU, C.-C. Inactivation and removal of Bacillus cereus by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology,** v. 77, n. 1, p. 11-18, 2002/07/25/ 2002. ISSN 0168-1605. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502000600 >.

PETERSON, C. L. Nanotechnology: From Feynman to the grand challenge of molecular manufacturing. **IEEE Technology and Society Magazine,** v. 23, n. 4, p. 9-15, 2004. ISSN 0278-0097.

PHAM, T. H.; WEBB, J. S.; REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by Pseudomonas aeruginosa in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology,** v. 150, n. 10, p. 3405-3413, 2004. ISSN 1465-2080. Disponível em: < https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27357-0 >.

PILOTTO, F. et al. Antibacterial efficacy of commercial disinfectants on dirt floor used in poultry breeder houses. **Brazilian Journal of Poultry Science,** v. 9, p. 127-131, 2007. ISSN 1516-635X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2007000200009&nrm=iso >.

QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate research,** v. 339, n. 16, p. 2693-2700, 2004. ISSN 0008-6215.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future medicinal chemistry,** v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015. ISSN 1756-8919.

RAFFI, M. et al. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against E. coli ATCC-15224. **Journal of materials science and technology,** v. 24, n. 2, p. 192-196, 2008. ISSN 1005-0302.

REINEMANN, D. J. et al. Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. **Bulletin-International Dairy Federation**, p. 3-18, 2003. ISSN 0250-5118.

REYNOLDS, J.; DOLASINSKI, M. J. Systematic review of industry food safety training topics & modalities. **Food Control,** v. 105, p. 1-7, 2019. ISSN 0956-7135.

RICHTER, F. L. et al. **Acid sanitizing and cleaning compositions containing protonated carboxylic acids**: Google Patents 2002.

ROBBINS, J. B. et al. Elimination of Listeria monocytogenes biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. **Journal of food protection,** v. 68, n. 3, p. 494-498, 2005. ISSN 0362-028X.

ROHDE, H. et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European journal of cell biology,** v. 89, n. 1, p. 103-111, 2010. ISSN 0171-9335.

ROSSI, C. et al. Influence of incubation conditions on biofilm formation by Pseudomonas fluorescens isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. **Italian journal of food safety,** v. 5, n. 3, 2016.

ROYER, S.; MORAIS, A. P.; DA FONSECA BATISTÃO, D. W. Phage therapy as strategy to face post-antibiotic era: a guide to beginners and experts. **Archives of Microbiology,** v. 203, n. 4, p. 1271-1279, 2021/05/01 2021. ISSN 1432-072X. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s00203-020-02167-5 >.

SAMARŽIJA, D.; ZAMBERLIN, Š.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo,** v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SANCHOOLI, N. et al. In vitro antibacterial effects of silver nanoparticles synthesized using Verbena officinalis leaf extract on Yersinia ruckeri, Vibrio cholera and Listeria monocytogenes. **Iranian journal of microbiology,** v. 10, n. 6, p. 400, 2018.

SANDHYA, V.; ALI, S. Z. The production of exopolysaccharide by Pseudomonas putida GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. **Microbiology,** v. 84, n. 4, p. 512-519, 2015/07/01 2015. ISSN 1608-3237. Disponível em: < https://doi.org/10.1134/S0026261715040153 >.

SASSONE, L. M. et al. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. **Brazilian Dental Journal,** v. 14, p. 99-102, 2003. ISSN 0103-6440.

SAÚDE, M. D. **Distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos - Brasil, 2007-2015**. Boletim Epidemiológico 32: Secretaria de Vigilância em Saúde. 51 2020.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Reduced Staphylococcus aureus proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. **Acta Biomaterialia,** v. 7, n. 6, p. 2579-2584, 2011/06/01/ 2011. ISSN 1742-7061. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111001309 >.

SHEKH, M. I. et al. Nano silver-embedded electrospun nanofiber of poly (4-chloro-3-methylphenyl methacrylate): use as water sanitizer. **Environmental Science and Pollution Research,** v. 24, n. 6, p. 5701-5716, 2017. ISSN 0944-1344.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology,** v. 20, n. 9, p. 407-413, 2009. ISSN 0924-2244.

SHI, Z. et al. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials,** v. 27, n. 11, p. 2440-2449, 2006. ISSN 0142-9612.

SHOJAEI, Z.; YADOLLAHI, A. Physicochemical and microbiological quality of raw, pasteurized and UHT milks in shops. **Asian journal of scientific research,** v. 1, n. 5, p. 532-538, 2008.

SIDDIQI, K. S.; UR RAHMAN, A.; HUSEN, A. Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes. **Nanoscale research letters,** v. 13, n. 1, p. 1-13, 2018. ISSN 1556-276X.

SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Pseudomonas fluorescens biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. **Bmc Biotechnology,** v. 8, n. 1, p. 79, 2008. ISSN 1472-6750.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. **Water Research,** v. 39, n. 20, p. 5142-5152, 2005/12/01/ 2005. ISSN 0043-1354. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135405005452 >.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology,** v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010. ISSN 0023-6438.

SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, 1984. ISBN 0875531172.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control,** v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013/06/01/ 2013. ISSN 0956-7135.

Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006536 >.

STEWART, P. S. et al. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. **Journal of Applied Microbiology,** v. 91, n. 3, p. 525-532, 2001/09/12 2001. ISSN 1364-5072. Disponível em: < https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01413.x >. Acesso em: 2021/03/04.

STIEFEL, P. et al. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. **Applied microbiology and biotechnology,** v. 100, n. 9, p. 4135-4145, 2016. ISSN 0175-7598.

STREET, R. Particularities of FSSC 22000–food safety management system. **Journal of Environmental Protection and Ecology,** v. 16, n. 1, p. 274-279, 2015.

TAN, S. Y.-E. et al. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. **Current opinion in biotechnology,** v. 26, p. 1-6, 2014. ISSN 0958-1669.

TAYEL, A. A. et al. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. **Journal of Food Safety,** v. 31, n. 2, p. 211-218, 2011. ISSN 0149-6085.

THOMAS, A.; SATHIAN, C. Cleaning-in-place (CIP) system in dairy plant-review. **IOSR-JESTFT,** v. 8, p. 41, 2014.

TSOLIGKAS, A. N. et al. Characterisation of spin coated engineered Escherichia coli biofilms using atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 89, p. 152-160, 2012/01/01/ 2012. ISSN 0927-7765. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511005145 >.

TUTU, B. O.; ANFU, P. O. Evaluation of the food safety and quality management systems of the cottage food manufacturing industry in Ghana. **Food control,** v. 101, p. 24-28, 2019. ISSN 0956-7135.

UPADYA, M.; SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Role of efflux pump inhibitors on the antibiofilm efficacy of calcium hydroxide, chitosan nanoparticles, and light-activated disinfection. **Journal of endodontics,** v. 37, n. 10, p. 1422-1426, 2011. ISSN 0099-2399.

VAN ASSELT, A.; VAN HOUWELINGEN, G.; TE GIFFEL, M. Monitoring system for improving cleaning efficiency of cleaning-in-place processes in dairy environments. **Food and bioproducts processing,** v. 80, n. 4, p. 276-280, 2002. ISSN 0960-3085.

VIANNA, M. E. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** v. 97, n. 1, p. 79-84, 2004/01/01/ 2004. ISSN 1079-2104. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210403003603 >.

VICKERY, K.; PAJKOS, A.; COSSART, Y. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. **American journal of infection control,** v. 32, n. 3, p. 170-176, 2004. ISSN 0196-6553.

VIMAL, S. et al. Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. **Aquaculture,** v. 358, p. 14-22, 2012. ISSN 0044-8486.

VLKOVA, H. et al. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms-a review. **Czech J. Food Sci,** v. 26, p. 309-323, 2008.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules,** v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.

WANG, H. et al. Effect of growth media on gene expression levels in Salmonella Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. **Food control,** v. 59, p. 546-552, 2016. ISSN 0956-7135.

WANG, H. et al. Silver nanoparticles: A novel antibacterial agent for control of Cronobacter sakazakii. **Journal of Dairy Science,** v. 101, n. 12, p. 10775-10791, 2018/12/01/ 2018. ISSN 0022-0302. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218309639 >.

WARDANI, G.; SUDJARWO, S. A. In vitro antibacterial activity of chitosan nanoparticles against Mycobacterium tuberculosis. **Pharmacognosy journal,** v. 10, n. 1, 2018.

WEIB, T.; XALTER, R. **Nano silver-zinc oxide composition**: Google Patents 2014.

WHO, W. H. O. Estimates of the global burden of foodborne diseases. 2015. Disponível em: < https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/en/ >.

_____. Food safety. 2019. Disponível em: < https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety >. Acesso em: 08 April 2020.

WU, D. et al. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against Enterococcus faecalis Biofilm. **Journal of Endodontics,** v. 40, n. 2, p. 285-290, 2014/02/01/ 2014. ISSN 0099-2399. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239913007322 >.

YANG, L. et al. Fabrication, characterization and antibacterial mechanism of in-situ modification nano-CaCO3/TiO2/CS coatings. **International Journal of Food Science & Technology,** v. 56, n. 6, p. 2675-2686, 2021/06/01 2021. ISSN 0950-5423. Disponível em: < https://doi.org/10.1111/ijfs.14897 >. Acesso em: 2021/07/25.

YOUSEF, J. M.; DANIAL, E. N. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. **J Health Sci,** v. 2, n. 4, p. 38-42, 2012.

APÊNDICE

Tabela I. Valores de UFC·cm^{-2}, referentes a *Listeria monocytogenes*, antes (controle) e após diferentes tratamentos (sanitizantes comerciais e nanoestruturas de prata (AgNP 1: 0,005 %; AgNP 2: 0,01%; AgNP 3: 0,02 % (m/v)); de quitosana (NQ 1: 0,4 %; NQ 2: 1,2 %; NQ 3: 2,8 % (m/v)); e de óxido de zinco (ZnOnano 1: 0,4 %; ZnOnano 2: 1,2 %; ZnOnano 3: 2,8 % (m/v)).

Sanitizante	Concentração (%)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12
Controle	-	$5,63 \times 10^4$ ± $5,30 \times 10^3$	$7,17 \times 10^4$ ± $6,29 \times 10^3$	$5,95 \times 10^5$ ± $1,95 \times 10^5$	$6,48 \times 10^4$ ± $2,18 \times 10^5$	TNTC	TNTC
Hipoclorito de sódio	0,8 (v/v)	< 1	< 1	$5,91 \times 10^4$ ± 0,00	$2,50 \times 10^4$ ± $2,30 \times 10^4$	TNTC	TNTC
LAT 300 PLUS	0,8 (v/v)	< 1	< 1	$2,00 \times 10^3$ ± 0,00	$4,75 \times 10^3$ ± $1,28 \times 10^3$	$8,58 \times 10^6$ ± $1,76 \times 10^6$	TNTC
Soda cáustica	2,0 (m/v)	< 1	< 1	$3,50 \times 10^3$ ± 0,00	$3,75 \times 10^3$ ± 0,00	$5,75 \times 10^6$ ± $5,00 \times 10^5$	TNTC
Ácido nítrico	1,4 (v/v)	< 1	< 1	$7,50 \times 10^4$ ± $1,77 \times 10^4$	$5,25 \times 10^3$ ± 0,00	$1,03 \times 10^6$ ± $1,52 \times 10^5$	TNTC

AgNP	0,005 (m/v)	< 1	< 1	$7,50 \times 10^4$ ± $1,77 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$ ± $8,84 \times 10^2$	$2,10 \times 10^4$ ± $3,13 \times 10^3$	$6,25 \times 10^4$ ± 0,00
	0,01 (m/v)	< 1	< 1	$6,25 \times 10^3$ ± $3,53 \times 10^3$	$1,13 \times 10^4$ ± $5,30 \times 10^3$	$1,06 \times 10^4$ ± $2,30 \times 10^3$	$6,25 \times 10^4$ ± 0,00
	0,02 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$2,14 \times 10^4$ ± $3,71 \times 10^3$	$1,05 \times 10^4$ ± $3,54 \times 10^3$	$4,82 \times 10^4$ ± $6,53 \times 10^3$
NQ	0,4 (m/v)	< 1	< 1	$5,94 \times 10^3$ ± $1,77 \times 10^2$	$3,15 \times 10^4$ ± 495×10^3	$3,49 \times 10^4$ ± $5,83 \times 10^3$	$5,03 \times 10^4$ ± $2,54 \times 10^3$
	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$5,44 \times 10^4$ ± $1,15 \times 10^4$	$5,75 \times 10^4$ ± $8,66 \times 10^3$	$4,63 \times 10^4$ ± $3,31 \times 10^3$
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$3,04 \times 10^4$ ± $8,84 \times 10^2$	$6,25 \times 10^4$ ± 0,00	$3,23 \times 10^4$ ± $3,19 \times 10^3$
ZnOnano	0,4 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$6,25 \times 10^4$ ± 0,00	$5,92 \times 10^4$ ± $5,77 \times 10^3$	$5,71 \times 10^4$ ± $6,25 \times 10^3$
	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	$5,64 \times 10^4$	$5,99 \times 10^4$	$5,97 \times 10^4$

					± 5,01 x 10^3	± 2,62 x 10^3	± 3,03 x 10^3
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	2,30 x 10^4 ± 1,41 x 10^3	5,89 x 10^4 ± 6,21 x 10^3	4,58 x 10^4 ± 2,84 x 10^3

Tabela II. Valores de UFC·cm^{-2}, referentes a *Pseudomonas fluorescens*, antes (controle) e após diferentes tratamentos (sanitizantes comerciais e nanoestruturas de prata (AgNP 1: 0,005 %; AgNP 2: 0,01%; AgNP 3: 0,02 % (m/v)); de quitosana (NQ 1: 0,4 %; NQ 2: 1,2 %; NQ 3: 2,8 % (m/v)); e de óxido de zinco (ZnOnano 1: 0,4 %; ZnOnano 2: 1,2 %; ZnOnano 3: 2,8 % (m/v)).

Sanitizante	Concentração (%)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10	Dia 12
Controle	-	6,54 x 10^3 ± 1,76 x 10^3	2,50 x 10^3 ± 7,50 x 10^2	6,58 x 10^3 ± 3,89 x 10^2	7,50 x 10^4 ± 1,77 x 10^4	7,29 x 10^4 ± 1,36 x 10^4	TNTC
Hipoclorito de sódio	0,8 (v/v)	< 1	< 1	1,63 x 10^4 ± 5,30 x 10^3	6,17 x 10^3 ± 1,04 x 10^3	2,63 x 10^5 ± 1,77 x 10^4	8,25 x 10^5 ± 2,83 x 10^5
LAT 300 PLUS	0,8 (v/v)	< 1	2,59 x 10^4 ± 1,28 x 10^3	< 1	2,49 x 10^4 ± 3,71 x 10^3	7,77 x 10^4 ± 2,33 x 10^4	TNTC
Soda cáustica	2,0 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	TNTC
Ácido nítrico	1,4 (v/v)	< 1	< 1	8,38 x 10^4 ± 3,01 x 10^4	< 1	< 1	TNTC
AgNP	0,005 (m/v)	< 1	< 1	6,38 x 10^4 ± 1,44 x 10^3	2,50 x 10^3 ± 0,00	< 1	6,25 x 10^4 ± 0,00

	0,01 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	$6,25 \times 10^4$ ± 0,00
	0,02 (m/v)	< 1	< 1	$4,25 \times 10^3$ ± $2,50 \times 10^3$	< 1	< 1	< 1
NQ	0,4 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
ZnOnano	0,4 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	1,2 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	2,8 (m/v)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabela III. Análise da cinética de crescimento da *L. monocytogenes* frente à diferentes sanitizantes, avaliada a partir da atividade antimicrobiana *in vitro*.

Sanitizante	Concentração	Tempo de geração (g)	Taxa de divisão (υ)
Ácido nítrico	0,00	0,685602351	1,458571429
	0,30	2,930581248	0,341229236
	0,41	5,482695811	0,182392027
	1,20	*	*
	1,61	*	*
	2,81	*	*
Soda cáustica	0,00	0,878396125	1,138438538
	0,12	3,125324473	0,319966777

	0,41	1,870378425		0,534651163	
	1,20	*		*	
	1,61	*		*	
	1,99	*		*	
LAT 300	0,00	0,818847085		1,221229236	
	0,41	0,847744043		1,179601329	
	1,61	0,829498167		1,205548173	
	2,81	1,643551381		0,608438538	
	4,05	2,533243562		0,394750831	
	5,00	*		*	
Hidróxido de sódio	0,00	1,047721814		0,954451827	
	0,41	0,985721771		1,01448505	
	1,20	0,825290634		1,211694352	
	2,40	0,920179756		1,086744186	
	3,22	0,820208186		1,219202658	
	5,00	0,626691651		1,595681063	
Nanosanitizantes	**Concentração**	**Macro**	**Nano**	**Macro**	**Nano**
ZnO	0,00	0,809227	2,027209052	1,235748	0,493289037
	0,41	0,840665	1,044739856	1,189535	0,95717608
	1,20	0,740686	1,601404554	1,3501	0,624451827

	2,81	3,645392	2,834008097	0,274319	0,352857143
	3,04	2,636188	7,456031707	0,379336	0,134119601
	3,40	1,512183	*	0,661296	*
Quitosana	0,00	0,809227	1,86135675	1,235748	0,537242525
	0,41	1,728296	2,087812999	0,578605	0,4789701
	1,20	0,916816	4,88477767	1,090731	0,204717608
	2,40	1,807916	9,06353508	0,553123	0,110332226
	2,81	0,986788	9,160073037	1,013389	0,109169435
	3,04	1,228471	*	0,81402	*
Prata	0,00	0,837787	0,609237744	1,193621	1,641395349
	0,41	2,616026	3,362752765	0,382259	0,297375415
	1,99	1,750509	2,57882111	0,571262	0,387774086
	2,40	0,717418	2,508542379	1,393887	0,398637874
	5,00	0,963077	8,929101157	1,038339	0,111993355
	6,00	0,744626	*	1,342957	*
Carbonato	0,00	0,803567	3,652912621	1,244452	0,273754153
	0,41	1,95938	2,709270927	0,510365	0,36910299
	1,99	2,492754	4,218049327	0,401163	0,237076412
	2,81	1,53744	4,267687509	0,650432	0,234318937
	3,04	1,085859	24,00318979	0,92093	0,04166113

	4,00	1,330504	*	0,751595	*

* Não houve curva de crescimento bacteriano.

Tabela IV. Análise da cinética de crescimento da *P. fluorescens* frente à diferentes sanitizantes, avaliada a partir da atividade antimicrobiana *in vitro*.

Sanitizante	Concentração	Tempo de geração (g)	Taxa de divisão (v)
Ácido nítrico	0,00	0,632578862	1,580830565
	0,26	0,838416757	1,192724252
	0,41	2,046922815	0,488538206
	0,79	1,254532572	0,797109635
	1,2	*	*
	2,4	*	*
Soda cáustica	0,00	0,676328502	1,478571429
	0,26	0,535330002	1,868006645
	0,41	0,648664957	1,541627907
	0,79	*	*
	1,2	*	*
	1,61	*	*
LAT 300	0,00	0,622466705	1,606511628
	0,41	0,753385228	1,327342193
	1,2	0,208114387	4,805049834
	2,81	0,462131331	2,163887043
	3,22	1,260046885	0,793621262
	4,05	*	*

Hidróxido de sódio	0,00	0,470239025		2,126578073	
	0,41	0,738360398		1,354352159	
	1,20	0,379456407		2,635348837	
	2,81	0,549340244		1,820365449	
	4,05	0,618794071		1,616046512	
	5,00	0,843468027		1,185581395	
Nanosanitizantes	**Concentração**	**Macro**	**Nano**	**Macro**	**Nano**
ZnO	0,00	0,598588	1,450812166	1,670598	0,689269103
	0,41	1,10617	0,932870514	0,90402	1,071960133
	1,20	1,546445	2,376253256	0,646645	0,420830565
	2,81	3,29863	19,49481865	0,303156	0,051295681
	2,97	1,79252	34,9187935	0,557874	0,028637874
	5,00	3,975172	*	0,251561	*
Quitosana	0,00	0,570497	1,059225112	1,752857	0,944086379
	0,41	0,877833	6,194690265	1,139169	0,161428571
	1,61	0,554358	2,381140733	1,803887	0,419966777
	1,99	0,679136	4,222783389	1,472458	0,236810631
	3,52	0,946422	3,049027553	1,056611	0,327973422
	4,00	0,939744	*	1,06412	*
Prata	0,00	2,488426	1,129710254	0,40186	0,885182724

	0,41	0,598659	5,829943831	1,670399	0,171528239
	1,61	2,043865	1,593941961	0,489269	0,627375415
	2,81	1,384226	6,079579883	0,722425	0,16448505
	4,00	2,584356	2,405882823	0,386944	0,415647841
	5,00	2,726449	*	0,366777	*
Carbonato	0,00	0,499336	1,534461664	2,002658	0,651694352
	0,79	0,709655	2,316097261	1,409136	0,431760797
	1,99	0,742092	1,384226259	1,347542	0,722425249
	2,40	1,815659	1,084333009	0,550764	0,922225914
	4,05	0,847171	31,98724761	1,180399	0,031262458
	5,00	1,035076	*	0,966113	*

* Não houve curva de crescimento bacteriano.

Figura I. Quadro com as disposições das amostras na microplaca para análise de atividade antimicrobiana em diferentes sanitizantes. Elaboração: Próprio autor, 2020.

	Volume de sanitizante (µL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	**Volume de água destilada (µL)**
A	0,0													75,0
B	11,0													64,0
C	21,0													54,0
D	32,0													43,0
E	43,0													32,0
F	53,0													22,0
G	64,0													11,0
H	75,0													0,0
Placa 1.		**ZnOnano**			**AgNP**			**$CaCO_3$nano**			**QuitosanaNano**			
Placa 2.		**ZnO**			**Ag**			**$CaCO_3$**			**Quitosana**			
Placa 3.		**Ácido nítrico**			**Soda cáustica**			**LAT 300**			**Hipoclorito**			