

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO

**COMPLEXOS QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS
NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E EM AMBIENTES HOSPITALARES**

UBERLÂNDIA - MG

2023

JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO

**COMPLEXOS QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS
NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E EM AMBIENTES HOSPITALARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Linha de pesquisa: Investigação Etiológica

Orientadora: Prof^a. Dra. Daise Aparecida Rossi

Coorientadora: Prof^a. Dra. Roberta Torres de Melo

UBERLÂNDIA-MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P379 Peixoto, Jéssica Laura Miranda, 1997-
2023 COMPLEXOS QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES
BACTERIANOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E EM AMBIENTES
HOSPITALARES [recurso eletrônico] / Jéssica Laura
Miranda Peixoto. - 2023.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Coorientadora: Roberta Torres de Melo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.588>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida ,1963-,
(Orient.). II. Melo, Roberta Torres de ,1987-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 15/2023				
Data:	27 DE SETEMBRO DE 2023	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	11:23
Matrícula do Discente:	12112MEV014				
Nome do Discente:	JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO				
Título do Trabalho:	COMPLEXOS QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E EM AMBIENTES HOSPITALARES				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Natan de Jesus Pimentel Filho (UFSCar); Fernanda Raghianti (IFTM); Daise Aparecida Rossi (FAMEV/UFU), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/09/2023, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Raghianti, Usuário Externo**, em 27/09/2023, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Natan de Jesus Pimentel Filho, Usuário Externo**, em 27/09/2023, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4797837** e o código CRC **AF5D97E4**.

JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO

**COMPLEXOS QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS
NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E EM AMBIENTES HOSPITALARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Uberlândia, 27 de setembro de 2023.

Banca examinadora

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi – FAMEV – UFU

Profa. Dra. Fernanda Raghianti – IFTM

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho – UFSCAR

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JÉSSICA LAURA MIRANDA PEIXOTO – Nascida em Araguari, Estado de Minas Gerais, em 06 de dezembro de 1997, filha de Marli Alves de Miranda Peixoto e Carlos Henrique da Cunha Peixoto. Médica Veterinária graduada pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – FAMEV UFU em dezembro de 2019, e Técnica em Agropecuária pelo Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM Campus Uberlândia em 2014. Durante a graduação foi bolsista PIBIC FAPEMIG de 2017 a 2019. Em março de 2021 iniciou o mestrado acadêmico na Universidade Federal de Uberlândia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, tornando-se bolsista MAI-DAI pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Dedico esse trabalho a todos aqueles que apesar das inúmeras circunstâncias diárias, nunca desistem dos seus sonhos, metas, objetivos e principalmente da fé!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me concedeu o dom da vida e a cada amanhecer continua me guiando, abençoando, fortalecendo e abrindo novas portas. Somente ele acalenta a mente e o coração diante dos momentos de dificuldade. Muito obrigada por todas as oportunidades e experiências concedidas a mim!

Aos meus pais, Marli e Carlos, que são meus grandes exemplos de vida e minha base, e aos meus irmãos, Joicy e David, por todo apoio, ensinamentos, força, companheirismo e por acreditarem nos meus sonhos e no meu potencial! Ao meu marido Vitor, por sempre estar ao meu lado, por me compreender, apoiar e acalmar, por ser esse grande parceiro de vida e de sonhos! Sem vocês, eu não teria o suporte e o carinho tão necessários para completar essa fase da minha vida! Também agradeço aos demais familiares que de alguma forma contribuíram para o êxito desse momento!

Também agradeço a todos os membros da equipe LABIO, LEPMOL e LADOC que de diferentes formas tornaram a jornada menos árdua. Ao técnico Rafael do LAMEV –FEQUI– UFU, pela atenção e cuidado nas análises de MEV, que sem dúvida resultaram em imagens de enriquecimento ao trabalho.

Em especial, agradeço a minha orientadora professora Daise, que aceitou esse desafio, acreditando no meu potencial, e no decorrer do mestrado transmitiu seus conhecimentos e concedeu todo suporte necessário de forma leve e genuína! Também sou grata a minha coorientadora, professora Roberta, que é uma grande parceira e esteve muito envolvida no projeto, se dispondo a me auxiliar inclusive na bancada, transmitindo conhecimentos imprescindíveis à realização desse projeto!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e a todos os professores, pela oportunidade, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas, além do incentivo a melhoria contínua. Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa na modalidade MAI-DAI; à empresa Start Química pela parceria no programa de inovação MAI-DAI.

RESUMO

Infecções causadas por bactérias resistentes à antimicrobianos são responsáveis pela morte de milhões de pessoas anualmente. A formação de biofilmes representa um dos mecanismos de resistência bacteriana, em que ocorre o desenvolvimento de comunidades microbianas organizadas e aderidas à superfície biótica ou abiótica, mantendo-se unidas por uma matriz polimérica autoproduzida. O biofilme está relacionado com cerca de 80% das infecções microbianas crônicas do corpo humano e favorece a transferência horizontal de genes de resistência aos antibióticos. Também é a principal causa de deterioração de alimentos, surtos de toxinfecções alimentares e bioincrustação em equipamentos na indústria alimentícia, acarretando graves prejuízos ao setor. Diante dos impactos que o biofilme representa para indústrias alimentícias e ambientes hospitalares, a dissertação foi dividida em dois capítulos: o primeiro consta de revisão bibliográfica sobre o tema, e o segundo, de um artigo científico que objetivou caracterizar a estrutura e a composição de biofilmes de 11 cepas de diferentes espécies e/ou sorovares com importância para esses ambientes, e a partir desses resultados, desenvolver novos produtos capazes de inibir a formação do biofilme e de destruir o biofilme maduro. As frações de carboidratos, ácido desoxirribonucleico extracelular (DNAe) e proteínas que compõem a matriz foram quantificadas nas 11 cepas por tratamento enzimático com Metaperiodato de sódio, DNase e Proteinase K, respectivamente. A fração de maior teor na biomassa total das cepas alternou-se entre proteína e carboidratos. Quatro produtos foram desenvolvidos pela empresa parceira e testados sobre as 11 cepas, sendo eles P1- Start Solvquat, P2- Start Tensoacid, P3- Start Tensoenzim e P4- Ácido Hipocloroso. De forma geral os produtos foram mais eficazes em inibir a formação do biofilme do que degradar o biofilme maduro. P4 apresentou a maior eficiência na inibição da formação do biofilme em todas as cepas enquanto sobre o biofilme maduro o produto mais eficaz variou entre as cepas.

Palavras-chave: contaminação; higiene; infecções nosocomiais; matriz extracelular; multirresistência

ABSTRACT

Infections caused by antimicrobial-resistant bacteria are responsible for the deaths of millions of people annually. The formation of biofilms represents one of the mechanisms of bacterial resistance, in which the development of organized microbial communities adhered to the biotic or abiotic surface, held together by a self-produced polymeric matrix. Biofilm is related to around 80% of chronic microbial infections in the human body and favors the horizontal transfer of antibiotic resistance genes. It is also the main cause of food spoilage, outbreaks of food poisoning and biofouling on equipment in the food industry, causing serious losses to the sector. Given the impacts that biofilm represents for food industries and hospital environments, the dissertation was divided into two chapters: the first consists of a bibliographic review on the topic, and the second, of a scientific article that aimed to characterize the structure and composition of biofilms. of 11 strains of different species and/or serovars with importance for these environments, and based on these results, develop new products capable of inhibiting biofilm formation and destroying mature biofilm. The fractions of carbohydrates, extracellular deoxyribonucleic acid (eDNA) and proteins that make up the matrix were quantified in the 11 strains by enzymatic treatment with Sodium Metaperiodate, DNase and Proteinase K, respectively. The fraction with the highest content in the total biomass of the strains alternated between protein and carbohydrates. Four products were developed by the partner company and tested on the 11 strains, namely P1- Start Solvquat, P2- Start Tensoacid, P3- Start Tensoenzim and P4- Hypochlorous Acid. In general, the products were more effective in inhibiting biofilm formation than degrading mature biofilm. P4 showed the highest efficiency in inhibiting biofilm formation in all strains, while on mature biofilm the most effective product varied between strains.

Keywords: contamination; hygiene; nosocomial infections; extracellular matrix; multiresistance

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO I	Pág.
FIGURA 1: Estágios do ciclo de formação do biofilme.....	24
CAPÍTULO II	
FIGURA 1: Efeito do tratamento com proteinase K (PK), DNase e Metaperiodato de sódio (SM) nos biofilmes maduros.....	90
TABELA 1: Produção média de biomassa por cepa com as respectivas frações proteica, de DNA e carboidratos.....	91
FIGURA 2: Micrografias de Microscopia de fluorescência do biofilme monoespécie de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>E. coli</i> APEC e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92
FIGURA 3: Micrografias de Microscopia de fluorescência do biofilme monoespécie de <i>Salmonella Choleraesuis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	92
FIGURA 4: Imagens por MEV de biofilmes de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>E. coli</i> APEC e <i>Salmonella Choleraesuis</i>	93
FIGURA 5: Imagens por MEV de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	94
FIGURA 6: Imagens por MEV de biofilmes de <i>Campylobacter jejuni</i> com uso do P2 - Start Tensoacid; <i>Salmonella Choleraesuis</i> com uso do P4 - Ácido Hipocloroso.....	95
FIGURA 7: Imagens por MEV de biofilme de <i>E. coli</i> APEC e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com uso do P2 – Start Tensoacid; <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA com uso do P1 – Start Solvquat.....	96
FIGURA 8: Capacidade de inibir a formação do biofilme: Start Solvquat (P1), Start Tensoacid (P2), Start Tensoenzim (P3) e Ácido Hipocloroso (P4).....	97

FIGURA 9: Efeito do tratamento com Start Solvquat (P1), Start Tensoacid (P2), Start Tensoenzim (P3) e Ácido Hipocloroso (P4) no biofilme pré-formado.....98

TABELA 2: Efeito do tratamento com Start Solvquat (P1), Start Tensoacid (P2), Start Tensoenzim (P3) e Ácido Hipocloroso (P4) sobre o biofilme pré-formado (P1-P4) e a capacidade de inibir a formação do biofilme (P1-P4).....100

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AHL: QS acil-homoserina lactona

AI-2: Sistema autoindutor-2

AIP: QS de peptídeo autoindutor

AIPs: Peptídeos auto-indutores

ANOVA: Análise de variância

AT: Ácido teicóico

ATCC: Cepas de referência – American Type Culture Collection

Aur: Aureolisina

Bap: Proteína associada a biofilme

DL: D-limoneno

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNAe: Ácido Desoxirribonucleico Extracelular

Eap: Proteína de aderência extracelular

EPS: Substâncias poliméricas extracelulares

Fap: Amiloides funcionais em *Pseudomonas*

HC: Hospital de Clínicas

HV: Hospital Veterinário

IA: Indústrias Avícolas Exportadoras

IFB: Índice de Formação de Biofilme

IRAS: Infecções relacionadas à assistência à saúde

LasRI, RhIRI: Reguladores de transcrição

LPS: Lipopolissacarídeos

MDR: Microrganismos multirresistentes

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MVs: Vesículas de membrana

OmpA: Proteína A da membrana externa

OMS: Organização Mundial de Saúde

OMVs: Vesículas de membrana externa

Pel: Película

PNCP: Programa Nacional de Controle de Patógenos

PSI: Locus de síntese de polissacarídeo

PSMs: Modulinas solúveis em fenol

QACs: Compostos de amônio quaternário

QS: *Quorum sensing*

ScpA: Estafoína A

SIF: Serviço de Inspeção Federal

SMP: Produtos microbianos solúveis

SspB: Estafoína B

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VBNC: Estado viável mas não cultivável

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1-INTRODUÇÃO GERAL	16
2-OBJETIVOS.....	17
2.1- OBJETIVO GERAL	17
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3-REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1- BIOFILMES.....	18
3.2- ETAPAS DA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES	24
3.3- <i>QUORUM SENSING</i> E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	27
3.4 - GÊNEROS BACTERIANOS	31
3.4.1- Gêneros bacterianos de importância na indústria alimentícia	35
3.4.2- Gêneros bacterianos de importância para a saúde/ambiente hospitalar	38
3.5- COMPONENTES COMUNS NA MATRIZ DO BIOFILME DE GRAM- POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS	50
3.6-COMPOSTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	53
3.6.1- Base quaternária	53
3.6.2- Ácido fosfórico	54
3.6.3- D-limoneno vegetal	55
3.6.4- Ácido hipocloroso.....	56
3.6.5- Protease e amilase	57
4-CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO II	84
Resumo	85
1-Introdução.....	86
2-Material e Métodos	87
2.1- Cepas	87
2.2- Formação do biofilme e Índice de Formação de Biofilme (IFB)	87
2.3- Análise de composição dos biofilmes	87
2.4- Microscopia de fluorescência	88
2.5- Tratamentos com produtos químicos específicos.....	88

2.6- Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	88
2.7- Análise estatística.....	89
3-Resultados.....	89
3.1- Análise de composição do biofilme	89
3.2- Microscopia de fluorescência e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	91
3.3- Atividade antibiofilme dos produtos químicos	96
4-Discussão	101
5-Conclusões.....	106
Referências	108

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1- INTRODUÇÃO GERAL

Diante da capacidade das bactérias patogênicas causarem graves enfermidades e até mesmo a morte de indivíduos, é crescente a preocupação com a inocuidade dos alimentos bem como as condições de higiene dos ambientes hospitalares, e consequentemente, com a saúde pública. Sabe-se que o controle microbiológico é extremamente importante tanto dentro da indústria alimentícia quanto em hospitais. Neste contexto, o biofilme bacteriano é cada vez mais estudado, pois representa uma forma de resistência no ambiente de difícil eliminação e uma fonte potencial e permanente de contaminação. Trata-se de uma estratégia de sobrevivência das bactérias, que formam uma comunidade multimicrobiana inserida em uma matriz polimérica autoproduzida e aderida a superfícies bióticas ou abióticas (Sharahi et al., 2019). Essa estratégia confere proteção à atuação de agentes biocidas (antibióticos e sanitizantes), além de concentrar nutrientes, prevenir a desidratação e permitir evasão imunológica por diferentes mecanismos (Kamaruzzaman et al., 2018).

Bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* possuem importância tanto para a economia quanto para a saúde pública, em razão de serem excelentes formadoras de biofilmes em condições adversas. *Acinetobacter baumannii* também é produtora de biofilme e considerada a bactéria gram-negativa de maior ameaça em originar infecções nosocomiais graves (Nie et al., 2020). Esse patógeno, juntamente com *Pseudomonas aeruginosa* e membros da família Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos estão listados como prioridade crítica pela Organização Mundial de Saúde diante da necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos (World Health Organization, 2021). *Klebsiella pneumoniae* produtora de *carbapenemase* e multirresistente, também é um importante agente de infecções nosocomiais e produtora de biofilme. A forma séssil é um fator chave para a sua colonização e persistência no hospedeiro, o que consequentemente dificulta o tratamento (Stallbaum et al., 2021).

O biofilme maduro desses micro-organismos consiste em um problema constante dentro de indústrias e hospitais, pois é uma fonte de contaminação e

infecção e também de recontaminação e reinfecção de difícil eliminação pelos processos de higienização convencionais. Reconhecido como uma ameaça à saúde global, o biofilme bacteriano é frequentemente responsável por infecções persistentes. Assim, é urgentemente necessário o desenvolvimento de novos compostos desinfetantes que utilizem de tecnologia avançada e que possam resultar no aumento da potência e da ação biocida sobre o biofilme bacteriano. Nesse cenário, tem-se como propósito o desenvolvimento de produtos inovadores e específicos, que sejam capazes tanto de impedir a formação do biofilme pelos patógenos analisados nesse estudo como promover a degradação completa do biofilme maduro pré-existente no ambiente.

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de formação de biofilme de 08 cepas multirresistentes aos antibióticos e 03 cepas ATCC, e verificar a estrutura e a composição da matriz extracelular para basear o desenvolvimento de produtos inovadores e específicos para as características determinadas, e posteriormente, testar a capacidade destes biocidas nos biofilmes das cepas estudadas.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) determinar a capacidade de formação de biofilme de: *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA);

- b) quantificar a fração de carboidratos, DNAe (ácido desoxirribonucleico extracelular) e proteínas na biomassa dos biofilmes para determinar a sua composição;
- c) analisar qualitativamente a fração de carboidratos e proteínas de cinco cepas por microscopia de fluorescência;
- d) verificar a ultraestrutura dos biofilmes sem tratamento (controle) das cinco cepas citadas anteriormente (c) por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); realizar MEV dos biofilmes tratados com o produto de maior eficiência;
- e) determinar a eficácia de quatro produtos desenvolvidos por empresa parceira baseados nos resultados anteriores quanto a capacidade de impedir a formação do biofilme e destruir o biofilme formado.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- BIOFILMES

Robert Koch desenvolveu seus postulados no século XIX para provar a relação entre um agente causal e uma determinada doença. Esses postulados ajudaram a criar a teoria de que cada espécie bacteriana se comportaria como uma entidade isolada tanto no homem quanto na natureza. Assim, por muitos anos as bactérias encontradas em suspensões foram caracterizadas como planctônicas, ou seja, bactérias que vivem livres em um meio líquido. Em determinados momentos, observou-se que algumas bactérias planctônicas possuíam a capacidade de se aderirem em várias superfícies. Dessa forma, em 1943, Zobell estudou a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios, assim como em diferentes tipos de superfície, dentre elas o vidro, metal e plástico. Em 1978, Costerton e colaboradores verificaram por meio de técnicas de microscopia mais avançadas que a maioria dos micro-organismos no ambiente natural se encontrava na forma fixa a

substratos (sésseis), e assim lançou o termo biofilme (Costerton; Geesey; Cheng, 1978; Mendoça et al., 2012; Zobell, 1943).

O biofilme é composto por comunidades microbianas multicelulares aderidas a uma superfície, viva ou inerte, e mantidas unidas por meio de matrizes poliméricas autoproduzidas. Essas matrizes são compostas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), sendo principalmente polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. As EPS são responsáveis por reforçar a estrutura e consequentemente proteger o biofilme, tendo como característica ser insolúvel. Também há produção de produtos microbianos solúveis (SMP) que são liberados tanto dentro quanto fora do biofilme. A função e a natureza dos SMP e EPS diferem entre as espécies bacterianas e suas respostas frente aos estresses ambientais (Azeredo et al., 2016; Giaouris; Simoes; Dubois-Brissonnet, 2020).

O processo de formação do biofilme é complexo, dinâmico, multicelular e resultante de uma adaptação fisiológica contra estresses ambientais (Giaouris; Simoes; Dubois-Brissonnet, 2020). Essa adaptação promove a proteção dos micro-organismos e a permanência no ambiente, sendo de difícil erradicação mesmo realizando regularmente procedimentos cuidadosos de higienização. A resiliência é oriunda da matriz autoproduzida, que compreende a maior parte da biomassa do biofilme. Essa matriz permite interações físicas e sociais entre as células microbianas, transferência de genes, resistência a antimicrobianos e outros agentes biocidas, além de proporcionar benefícios estruturais e funcionais como hidratação, captura de recursos e capacidade digestiva (Flemming et al., 2016). Em grande parte dos biofilmes, os micro-organismos representam menos de 10% do volume, podendo chegar a 30%, enquanto a matriz e a água representam o restante, podendo ser superiores a 90%. A água é a responsável pelo fluxo de nutrientes essenciais para a sobrevivência bacteriana no interior do biofilme (Flemming; Wingender, 2010; Preda; Săndulescu, 2019).

Há um sistema digestivo externo ao biofilme criado pela retenção de enzimas extracelulares e pelo sequestro de nutrientes dissolvidos e particulados da fase aquosa. Esses se tornam utilizáveis como fontes de

nutrientes e energia. Além disso, os próprios componentes da matriz podem servir como nutrientes, mas devido à complexidade das EPS é necessária uma ampla gama de enzimas para realizar a degradação completa de todos os componentes. A matriz também atua como um centro de reciclagem que retém todos os componentes das células lisadas e os mantém disponíveis. Dentre esses componentes consta o DNA, que pode corresponder a um reservatório de genes e contribuir para a transferência horizontal dos mesmos (Flemming; Wingender, 2010). O desenvolvimento do biofilme favorece a transferência horizontal de genes por meio dos elementos integrativos e conjugativos devido ao contexto biofísico concebido pela matriz extracelular (Lécuyer et al., 2018). Logo, o biofilme constitui um alvo de grande importância para monitoramento regular, visando o controle de sua ocorrência e da disseminação de genes de resistência aos antibióticos em ambientes clínicos, industriais e no meio ambiente (Michaelis; Grohmann, 2023).

Geralmente o biofilme na natureza é composto por múltiplas espécies que vivem em consórcio, e assim, todas são beneficiadas de alguma forma com a presença das outras. Essa parceria cooperativa promove uma adequação geral do biofilme. A formação de biofilme multiespécies ocorre em um nível aprimorado na presença da coagregação, em que a sucessão bacteriana é rigidamente controlada por meio de interações receptor-ligante associadas à superfície celular. Dessa forma, algumas bactérias aderidas são pioneiras e reconhecidas, servindo de âncora para colonizadores secundários, e o contato próximo decorrente da coagregação propicia a cooperação entre as diferentes espécies. Frequentemente ocorre uma organização tridimensional do biofilme pela colaboração entre as bactérias para degradar compostos. Assim, são originadas estruturas que facilitam a permutação do produto de degradação primária para os degradadores secundários, que comumente estão agrupados em torno do degradador primário (Giaouris et al., 2015).

Dentre as interações existentes, as interações competitivas comuns consistem no antagonismo para regular as fontes de nutrientes, oxigênio e também o espaço disponível para colonizar. A disponibilidade

de nutrientes aliada à competição por eles é um fator marcante tanto na determinação da composição bacteriana de um biofilme, como na força motriz para o desenvolvimento do mesmo. A competição também pode ser decorrente da produção de compostos que promoverá uma inativação, inibição do crescimento ou impedimento da adesão de outras espécies, assim como também podem provocar um desprendimento de células da estrutura do biofilme. Exemplos desses compostos são bacteriocinas, ácidos orgânicos, biossurfactantes e enzimas (Giaouris et al., 2015; Rendueles; Ghigo, 2012). Tanto as interações cooperativas quanto as competitivas podem desencadear alterações fisiológicas e regulatórias nas bactérias presentes no biofilme, e eventualmente contribuir para a seleção de mutantes que são mais bem adaptados, e consequentemente mais resistentes no ambiente (Rendueles; Ghigo, 2012).

A capacidade de formação de biofilmes por patógenos, assim como a maior resistência no ambiente, implicam em um grande problema tanto para ambientes industriais quanto para ambientes hospitalares. Uma vez que o biofilme se desenvolveu sobre determinada superfície e alcançou maturidade, a sua eliminação é muito difícil por meio dos processos de higienização convencionais e se tornam um problema constante. Há muitos tipos de bactérias capazes de produzir biofilmes, e determinados gêneros se destacam devido a maior capacidade de originar o biofilme em condições hostis além de estarem envolvidas em infecções alimentares e hospitalares. Exemplos desses patógenos são *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter* (Kamaruzzaman et al., 2018).

Vale ressaltar que existem biofilmes benéficos para a saúde humana, animal, meio ambiente, agricultura e ambientes industriais. Esses biofilmes são produzidos por micro-organismos não patogênicos. Por exemplo, para a microbiota intestinal o biofilme contribui na homeostase, arquitetando a colonização, gerando estabilidade e resiliência para a comunidade contra invasores, assim como maturidade

da defesa do hospedeiro, digestão de alimentos e também modificações químicas em medicamentos. Em todo o trato gastrointestinal há naturalmente o crescimento de biofilmes multiespécies, tanto na superfície epitelial quanto no lúmen gerando respectivamente, colônias ligadas à mucina e a partículas de alimentos. Os biofilmes com características anormais dos comensais são associados com doenças humanas. Sabe-se que o apêndice humano alberga um biofilme muito denso quando comparado ao restante do cólon, e acredita-se que se trata de bactérias comensais. Essas bactérias desempenham um papel crucial na reconstituição da microbiota comensal normal após distúrbios gastrointestinais, e ainda, há a hipótese de que estimulem o desenvolvimento do sistema imunológico pós-natal (Motta et al., 2021). Outro exemplo de proteção mediada por biofilme é o microbioma da via oral e do trato reprodutivo contra *Candida albicans*, um patógeno fúngico (Robertson; Mclean, 2015).

Se tratando do meio ambiente e da agricultura, os biofilmes bacterianos ligados à superfícies fúngicas são naturalmente existentes e estão associados a raízes das plantas, promovendo melhoria na produção das culturas, na absorção de nutrientes e proteção das plantas frente a diferentes estresses ambientais (Pandit et al., 2020). Diferentes bactérias podem ser utilizadas como biofertilizantes e também como biocontrole, sendo *Bacillus subtilis* um exemplo de rizobactéria utilizada no biocontrole, uma vez que produz um biofilme robusto que protege as plantas tanto de patógenos bacterianos quanto de patógenos fúngicos. No contexto de substâncias perigosas presentes no meio ambiente, seja no solo, no ar ou na água, as bactérias em biofilme são utilizadas na biorremediação, convertendo assim as substâncias perigosas em compostos inofensivos. Além disso, biofilmes bacterianos também estão sendo utilizados no tratamento de águas residuais para neutralizar e degradar tanto compostos orgânicos quanto inorgânicos (Muhammad et al., 2020). Também é crescente o interesse e os estudos sobre o uso de biofilmes bacterianos na prevenção da corrosão dentro dos sistemas de distribuição de água, assim como na indústria médica, marítima e também de processamento de alimentos. Esse interesse é decorrente

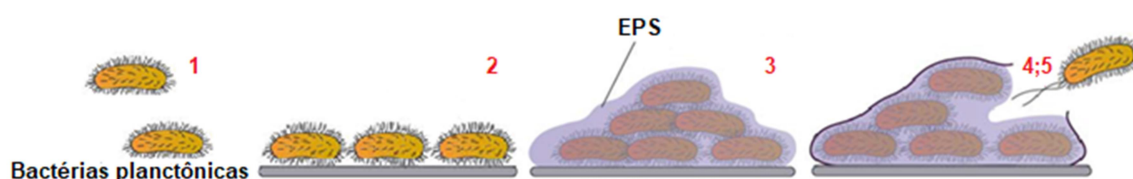
da eficácia dos micro-organismos em biofilme, assim como o custo-benefício, e por fim, o comportamento ecológico, no entanto ainda há muitas lacunas para serem elucidadas (Guo et al., 2018). Na indústria alimentícia, cepas probióticas são usadas em decorrência da sua capacidade em gerar benefícios à saúde, contribuindo tanto na prevenção quanto no tratamento de várias doenças ao serem consumidas. Os efeitos positivos estão associados à formação do biofilme, que determina vigor frente a temperatura, pH ácido, estresse osmótico e forças mecânicas. Bactérias ácido lácticas como o *Lactobacillus* são micro-organismos frequentemente utilizados como probióticos (Turhan et al., 2019). Esses micro-organismos produzem substâncias antimicrobianas naturais e biossurfactantes. Assim, sua aplicação como biofilme competitivo apresenta uma nova forma ainda em estudo para o controle de bactérias patogênicas visando impedir a contaminação cruzada de alimentos no ambiente industrial. Bactérias ácido lácticas isoladas de alimentos brasileiros reduziram a formação de biofilme dos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *E. coli* O157:H7. Também apresentaram as características probióticas além de potencialmente não apresentarem risco aos consumidores. Dessa forma, foram consideradas como uma excelente opção para formar biofilmes protetores e serem utilizadas como parte de produtos utilizados na limpeza diária objetivando reduzir a incidência dos micro-organismos patogênicos formadores de biofilme nos equipamentos de processamento de alimentos (Gómez et al., 2016).

De contraste a esses benefícios oriundos de micro-organismos não patogênicos, existem inúmeros malefícios decorrentes dos patógenos. As consequências impactam a indústria alimentícia diante de perdas produtivas e econômicas, e a Saúde Única, considerando doenças, desequilíbrio e consequentemente maiores gastos com tratamentos e ainda óbitos. Assim, novas estratégias de controle e erradicação de biofilmes patogênicos são constantemente requeridas e pesquisadas.

3.2- ETAPAS DA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

O desenvolvimento do biofilme é regido por diferentes etapas que são apresentadas na figura 1.

FIGURA 1: Estágios do ciclo de formação do biofilme. 1- Fase livre, 2- Fixação à superfície, 3- Adesão célula a célula (microcolônia), 4- Maturação e expansão (macrocolônia), 5- Dispersão. A imagem é adaptada de Kamaruzzaman et al., 2018.



A primeira etapa ocorre quando bactérias planctônicas se fixam a uma superfície biótica (lesões endoteliais, tecidos necróticos, mucosas) ou abiótica (dispositivos de permanência como cateteres vasculares, cateteres urinários, próteses, e também em superfícies do ambiente clínico e ambientes industriais). Nessa etapa as bactérias utilizam o DNAe, flagelos, pili, fímbrias e proteínas da membrana externa para auxiliar na detecção, e consequentemente, na fixação à superfície. Essa ligação primária é reversível e pode ocorrer de forma ativa ou passiva, dependendo de fatores microbianos como motilidade ou expressão de adesinas, respectivamente. Além disso, as cepas planctônicas podem se dirigir a um local específico e aderir em uma lesão/superfície existente ou ainda induzir diretamente uma necrose tecidual, e posteriormente se aderirem. Essa adesão também é influenciada pelas propriedades físico-químicas da superfície, uma vez que as bactérias se comportam como partículas hidrofóbicas de carga negativa (Kamaruzzaman et al., 2018; Preda; Săndulescu, 2019). Bactérias Gram-negativas possuem lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa enquanto as Gram-positivas possuem ácidos teicóicos (AT) no interior da parede celular. Esses componentes fornecem cargas para a superfície externa das

bactérias, e consequentemente, influenciam na aderência às superfícies (Ruhal; Kataria, 2021). Por se tratar de uma ligação reversível, essa etapa pode ser removida mais facilmente por um processo adequado de limpeza quando comparado às etapas posteriores.

Considerando uma superfície abiótica, a adesão ocorre mediada por interações físico-químicas não específicas de longo alcance entre a bactéria e a superfície, como forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Já para uma superfície biótica, a adesão é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante. Se tratando de um dispositivo biomédico, como um cateter venoso ou urinário que será implantado em um paciente, a adesão pode ocorrer de forma direta ou via filme condicionante. Esse filme condicionante é orgânico e de composição variável de acordo com o sítio de inserção, porém constituído principalmente por proteínas (albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibronectina). Dessa forma, a adesão direta ocorre no momento ou próximo do momento de inserção do implante, enquanto via filme condicionante é tardiamente, dias depois da inserção (Trentin; Giordani; Macedo, 2013).

Já a segunda etapa trata-se de uma adesão irreversível, em que ocorre a secreção das EPS e essas promovem tanto a adesão célula a célula quanto entre a célula e a superfície. Assim, o processo de adesão é consolidado por meio da produção das EPS. Os genes que são responsáveis pela adesão e montagem da matriz extracelular são ativados por fatores como a densidade populacional e limitação de nutrientes. Nessa etapa ocorre aumento na produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras autoindutoras, criando um modo de comunicação entre as bactérias denominado *Quorum sensing* (QS). Esse por sua vez promove a transcrição de genes específicos em resposta à densidade populacional bacteriana. Nesse estágio, as bactérias são capazes de se ligar a bactérias da mesma ou de diferentes espécies, originando agregados fortemente ligados à superfície (Kamaruzzaman et al., 2018; Preda; Săndulescu, 2019; Trentin; Giordani; Macedo, 2013). A adesão é irreversível por ser mediada por

interações fortes como ligações eletrostáticas ou de Van der Waals (Trentin; Giordani; Macedo, 2013).

A terceira etapa consiste em formação de microcolônias, que é resultante da agregação e crescimento bacteriano de forma simultânea. Nesse estágio as bactérias ficam protegidas pela camada de EPS, que consiste em uma barreira física entre a comunidade e o meio extracelular. A comunicação entre as bactérias dentro da comunidade acontece via QS, que modula as funções celulares, a patogênese, a aquisição de nutrientes, conjugação, motilidade e a produção de metabólitos secundários. Acredita-se que as células nas camadas mais externas do biofilme possuem um metabolismo mais ativo enquanto as células mais profundas regulam negativamente o seu metabolismo e entram em um estado considerado latente e persistente. (Kamaruzzaman et al., 2018; Preda; Săndulescu, 2019).

Já a quarta etapa é referente a maturação e expansão do biofilme, originando macrocolônias. A maturação ocorre à medida que as bactérias se replicam e as EPS se acumulam. Durante esse momento há a criação de canais no biofilme, que irão permitir a passagem de nutrientes e moléculas sinalizadoras em gradiente, que favorecem a aglomeração organizada e a diferenciação das células baseado em seu estado metabólico. A quinta e última etapa ocorre após a maturação, momento em que os biofilmes estão espessos e desenvolve um ambiente anaeróbico no seu interior. Nessa etapa acontece o desprendimento e a dispersão de bactérias planctônicas que irão colonizar e gerar um novo biofilme em outro local. Considerando um biofilme em um hospedeiro, essas células planctônicas ou ainda aglomerados de células desprendidos, podem circular como êmbolos sépticos e colonizar novos locais, e conseqüentemente, ocasionar uma nova infecção com formação potencial de biofilme (Kamaruzzaman et al., 2018; Preda; Săndulescu, 2019). Já para um biofilme dentro do ambiente industrial, o desprendimento dessas células representa tanto uma fonte de contaminação para o produto final que pode ocasionar desde uma infecção gastrointestinal até doenças mais graves no consumidor, quanto uma nova fonte para a instalação de biofilme em

outro ponto do ambiente industrial. Dessa forma, se esse ciclo não sofrer uma quebra pelos processos de higienização ou pelo tratamento do hospedeiro, serão constantemente fontes de recontaminação e reinfeção, respectivamente.

3.3- QUORUM SENSING E FATORES DE VIRULÊNCIA

O *quorum sensing* possui extrema importância na virulência bacteriana, assim como, na resistência e formação de biofilmes. Existem cerca de pelo menos três tipos principais de QS que constituem o alvo primordial para o tratamento de infecções associadas a biofilme. Em bactérias Gram-negativas, o sistema QS é mediado por autoindutores do tipo acil-homoserina lactona (AHL), enquanto em bactérias Gram-positivas, as moléculas sinalizadoras são oligopeptídeos, denominados peptídeos autoindutores (AIP). Em ambas também há o sistema autoindutor-2 (AI-2) (Preda; Săndulescu, 2019).

As moléculas do AHL possuem em comum o anel homoserina-lactona, mas variam em comprimento e substitutos. São sintetizadas por uma AHL sintetase cognata específica e a concentração aumentada dessas moléculas está vinculada a um maior crescimento bacteriano (Preda; Săndulescu, 2019). Em *Pseudomonas aeruginosa* o QS é responsável por controlar a expressão de mais de 300 genes (Azam; Khan, 2019). É um sistema complexo e dominado por dois circuitos principais de N-acil-homoserina lactona: LasRI e RhIRI, com LasRI atuando de forma hierárquica sobre RhIRI. Juntos regulam uma série de genes, metabólitos e enzimas responsáveis pela virulência desse patógeno (Ahmed et al., 2021).

Ambos são reguladores de transcrição, mas LasRI é apontado como o principal controlador da virulência mediada por QS. No entanto, em infecções crônicas em pacientes com fibrose cística, *P. aeruginosa* pode alterar a hierarquia, de forma que o LasRI não seja mais funcional, permitindo que RhIRI atue independentemente, e seja o responsável pela persistência desse patógeno em infecções crônicas. Dessa forma, a inativação do RhIRI é muito mais prejudicial ao patógeno, e por isso,

menos observada quando comparado a inativação do LasRI. A emergência de mutantes nulos LasR é considerada uma evidência de evolução adaptativa para o ambiente pulmonar com fibrose cística, cujo os benefícios não estão elucidados. Mas especula-se que essa perda de função possa resultar em vantagem na aquisição de nutrientes no ambiente pulmonar, ou atuar como uma forma de trapaça social, ou que seja necessário um sistema de QS funcional apenas para o estabelecimento da infecção. Dessa forma, denota-se atenção para o alvo terapêutico, que anteriormente era somente o LasRI, mas já existem indícios que o RhlRI pode ser um alvo melhor, e assim, uma estratégia multi-alvo se faz necessária (Ahmed et al., 2021).

Bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* secretam peptídeos auto-indutores (AIPs) como moléculas sinalizadoras para ativar o sistema QS. Conforme a concentração ambiental de AIPs aumenta, esses se ligam ao sensor histidina quinase, que por sua vez fosforila e consequentemente altera a expressão do gene alvo. Em *S. aureus* a colonização e a expressão dos fatores de virulência são regidos pelo sistema *agr* (regulador do gene acessório). Esse por sua vez, é o responsável pela produção de inúmeras toxinas como a toxina da síndrome do choque tóxico e hemolisinas. A principal molécula efetora do *agr* é a RNAIII, que é responsável pela regulação negativa das proteínas de ligação ao hospedeiro e pela regulação positiva sobre toxinas. Por uma via independente dessa molécula, existe regulação mediada por AgrA sobre uma família de toxinas denominadas modulinas solúveis em fenol (PSMs). Essas toxinas possuem grande mérito na formação e dispersão de biofilmes (Peng et al., 2019; Preda; Săndulescu, 2019; West et al., 2022).

As bactérias também podem detectar e traduzir os sinais interespecíficos AI-2 ou autoindutor-2, que são gerados por outras cepas distintas presentes no mesmo ambiente. Esse tipo de sinalização é catalisada pela LuxS sintase, que também está envolvida na ativação do ciclo de metilação e no controle da expressão de centenas de genes relacionados com os processos microbianos de adesão superficial, produção de toxinas e desprendimento de células planctônicas (Jiang et

al., 2019). Os fatores de virulência se alteram entre as diferentes cepas, mas constituem um ponto chave tanto para a patogênese das infecções como para os biofilmes, uma vez que ajudam as bactérias a driblar a resposta imune do hospedeiro e consequentemente originam distúrbios, além de auxiliar na formação e desenvolvimento do biofilme (Jiang et al., 2019).

Dentre os fatores de virulência em *P. aeruginosa* tem-se a piocianina, uma toxina para mamíferos que danifica o tecido do hospedeiro e prejudica a função dos órgãos (Qin et al., 2022), enquanto a 3-oxo-C12-HSL é uma molécula sinalizadora do QS que contribui para o estabelecimento da infecção crônica. Exoenzimas como a protease IV degradam imunoglobulinas e outros elementos do sistema imunológico complementar de mamíferos. Já a hemolisina promove permeabilidade vascular e consequentemente gera danos em órgãos-alvo. Em relação ao biofilme desse patógeno, os exopolissacarídeos possuem grande relevância, sendo que o alginato atua sobre a formação de micro-colônias semelhantes a dedos e na redução da susceptibilidade do biofilme a antibióticos. Já o Psl (locus de síntese de polissacarídeo) atua na fixação inicial e maturação do biofilme, enquanto o Pel (película) designa um fenótipo de colônia enrugada, atua sobre a interação célula a célula, na densidade celular e também na compactação do biofilme. Um outro fator é o ramnolipídio, um surfactante que mantém canais não colonizados em torno de macro-colônias (Azam; Khan, 2019; Jiang et al., 2019). Além disso, esse último fator de virulência promove a degradação do surfactante pulmonar e destrói as junções oclusivas, o que gera uma lesão direta nas células epiteliais da traqueia e do pulmão (Chadha; Harjai; Chhibber, 2021).

Já em *S. aureus* as proteínas de maior abundância na matriz extracelular são principalmente fatores de virulência, como hemolisinas (alfa, beta, delta e gama), leucotoxinas, lipases, proteína de aderência extracelular e também a PSM α 1, uma modulina solúvel em fenol (PSM). A alfa-hemolisina apresenta toxicidade para uma ampla gama de células dos mamíferos, sendo ativa contra eritrócitos além de dermonecrótica, neurotóxica e consequentemente letal. Já a beta-hemolisina também

promove hemólise, mas não é dermonecrótica, e em camundongos não apresenta letalidade. A gama-hemolisina atua sobre eritrócitos, neutrófilos e macrófagos. Por fim, a delta-hemolisina também lisa eritrócitos e outras células de mamíferos, além de estruturas subcelulares como as organelas ligadas a membrana, esferoplastos e protoplastos, e também possui atividade dermonecrótica, bem como letalidade. Foi demonstrado que o biofilme desse patógeno possui um alto potencial de virulência e utiliza múltiplas estratégias de forma simultânea para evadir do sistema imunológico do hospedeiro. Essas estratégias consistem nos fatores de virulência já citados e também na proteção mediada pela matriz extracelular assim como pela biossíntese de cápsula (Dinges; Orwin; Schlievert, 2000; Graf et al., 2019).

A maior parte dos fatores de virulência identificados na matriz extracelular possui um alto ponto isoelétrico, entre 8-12. As proteínas citoplasmáticas encontradas nessa matriz também apresentam ponto isoelétrico dentro dessa faixa, sendo principalmente proteínas ribossômicas. Dessa forma, observa-se uma forte carga positiva, e acredita-se que essas proteínas catiônicas interagem com as superfícies celulares aniônicas e com o DNAe, de forma que atue como pontes eletrostáticas entre as células, disponibilizando uma resistência física ao biofilme (Graf et al., 2019).

Leucotoxinas são responsáveis por formar poros e também lisam células sanguíneas. Leucocidina de Pantón-Valentine está presente em cerca de 5% das cepas clínicas de *S. aureus*, no entanto está fortemente associada a cepas *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) adquiridas na comunidade e causadoras de pneumonia, infecções de pele e tecidos moles (Oliveira; Borges; Simões, 2018).

S. aureus secreta duas lipases, SAL 1 e SAL 2, que degradam di e triglicerídeos, não possuem atividade hemolítica e nem citotóxica mas melhoram a formação do biofilme, possivelmente por aprimorarem a liberação DNAe. Também podem afetar a integridade da membrana citoplasmática por meio da degradação de fosfolipídeos, além de contribuírem para a adesão e, conseqüentemente, para a invasão da célula hospedeira (Nguyen et al., 2018). Proteína de aderência

extracelular (Eap) também é denominada como proteína análoga de histocompatibilidade de classe II (Map), facilita as interações entre a superfície da bactéria e as proteínas plasmáticas, e dessa forma promove a adesão ao endotélio do hospedeiro e consequentemente a internalização em fibroblastos e células epiteliais. Essa proteína também influencia a estrutura do biofilme, tornando-o mais robusto (Yonemoto et al., 2019). Outra proteína de extrema relevância no biofilme estafilocócico é a Bap (proteína associada ao biofilme) que promove adesão a superfícies abióticas e também uma forte interação entre as células (Valle; Fang; Lasa, 2020). Já as modulinas solúveis em fenol são amiloides funcionais que desencadeiam respostas inflamatórias, lisam células e são associadas a uma maior virulência em MRSA. A PSM α 1 é de grande importância na montagem e estrutura do biofilme desse micro-organismo, pois originam fibrilas β -amilóides cruzadas e de alta estabilidade (Malishev et al., 2021).

3.4 - GÊNEROS BACTERIANOS

Determinados gêneros bacterianos se destacam devido a maior capacidade de originar biofilmes em condições hostis, além de estarem envolvidas em infecções alimentares e hospitalares. Exemplos desses patógenos são *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, e bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter* (Kamaruzzaman et al., 2018).

A. baumannii é um cocobacilo Gram-negativo aeróbico que pertence ao gênero *Acinetobacter*, família Moraxellaceae. Trata-se de um micro-organismo imóvel, não fastidioso e nem fermentativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, que cresce em temperaturas entre 20 e 44 °C sendo de 33 a 35 °C a temperatura ótima. É um patógeno emergente a nível global, frequentemente associado a infecções mediadas por biofilme e considerado como um alto risco em se tornar um patógeno humano de “alerta vermelho” (Gedefie et al., 2021; Trabulsi; Alterthum, 2015). Faz parte do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e

Enterobacter spp.), que reúne seis patógenos destacados pela sua resistência a múltiplas drogas, elevada virulência e envolvimento em infecções hospitalares complicadas (Rosa et al., 2020). O gênero é encontrado de forma onipresente no ambiente como bactérias saprófitas de vida livre, e sobrevive a tratamentos anaeróbios de águas residuais sendo detectado com maior frequência em biossólidos do que em águas efluentes. Uma vez que esses biossólidos podem ser utilizados na fertilização agrícola há o risco de disseminação de *A. baumannii* clinicamente relevante (Pulami; Kämpfer; Glaeser, 2023).

E. coli é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo, que pode possuir mobilidade através de flagelos e capacidade de aderência a superfícies ou a células por meio de fímbrias. Algumas estirpes crescem em temperaturas entre 7 e 46 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima. Em pH maior que 4,5 conseguem crescer, assim como em concentrações de NaCl a 6,5%, necessitando de atividade de água mínima de 0,95. É um membro da família Enterobacteriaceae que engloba micro-organismos capazes de converterem nitrato a nitrito, fermentar glicose e lactose, oxidase-negativo e catalase-positivo. *E. coli* é parte da microbiota intestinal normal tanto dos seres humanos quanto de animais, ambos em estado hígido. As espécies patogênicas são divididas em pelo menos cinco categorias causadoras de infecção intestinal por meio de mecanismos distintos (*E. coli* diarreïnogênicas) e outras tantas associadas especificamente com infecções extraintestinais (EXPEC: *E. coli* patogênica extra intestinal), como as urinárias e meningites. As categorias de *E. coli* diarreïnogênicas são *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (ASAE, 2023a; Blount, 2015; Trabulsi; Alterthum, 2015).

K. pneumoniae é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo, imóvel, encapsulado, com temperatura e pH ótimos para o crescimento a 37 °C e 7, respectivamente. É um membro da família Enterobacteriaceae que está presente nas fezes de 30% dos indivíduos normais compondo o microbioma, e em menor frequência, na

nasofaringe (Trabulsi; Alterthum, 2015). Também reside no meio ambiente, no solo, em águas superficiais e recentemente foi detectada como biofilme em estado seco colonizando superfície seca por quatro semanas. Apresentou capacidade de assumir um estado VBNC (viável mas não cultivável), com maior culturabilidade após as quatro semanas em condições secas (Centeleghe et al., 2023). A incidência de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos cresceu de forma alarmante, despontando como um problema de saúde pública mundial ao promover infecções de corrente sanguínea com significativa morbidade e mortalidade (Zhu et al., 2023).

P. aeruginosa corresponde a um bacilo Gram-negativo, não fermentador, não esporulado, móvel e aeróbio podendo crescer anaerobicamente na presença de nitrato como acceptor final de elétrons. Oxidase-positivo, citrato positivo, cresce em temperatura ampla de 4 a 42 °C e pertence à família Pseudomonadaceae. Extremamente ubíquo, está presente nos alimentos, no solo, na água, nos vegetais, nos animais e nos diversos ambientes hospitalares. É metabolicamente versátil e produz pigmentos hidrossolúveis como a piocianina (azul), pioverdina (esverdeada), piomelanina (marrom) e piorrubina (vermelho) que se difundem no meio de cultura. Nesse, também há produção de *slime*, uma camada com aspecto mucoide que é importante na formação do biofilme, pois origina uma matriz fortemente hidrofóbica. Essa camada é formada pelo polissacarídeo alginato (ácido manurônico + ácido glicurônico), que origina um gel ao redor da bactéria e consequentemente as colônias se apresentam mucoides (Trabulsi; Alterthum, 2015). É naturalmente resistente a uma gama de agentes antimicrobianos devido a sua membrana externa que confere pouca permeabilidade, além dos diversos sistemas de transporte, e ainda pode adquirir resistência por meio de mutação genômica e absorção horizontal de elementos que a determinam (Cramer; Klockgether; Tümmler, 2023).

S. aureus são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não fastidiosos, não móveis, catalase-positiva, resistentes às condições ambientais e membro da família Staphylococcaceae. Sobrevivem em

ambientes secos, em variações de pH entre 4,2 a 9,3 sendo ótimo em torno da neutralidade, e em temperatura de 6 a 48 °C, com ótimo a 37 °C. Vivem de forma comensal em humanos e animais, podendo ser isolado em diferentes sítios. Nos humanos o isolamento possui maior frequência na cavidade nasal anterior, e a transmissão entre esses e os animais acontece em ambas as direções. Pode causar infecções, intoxicação alimentar estafilocócica e a síndrome da pele escaldada estafilocócica (Trabulsi; Alterthum, 2015). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) caracteriza-se pela resistência aos beta-lactâmicos e está frequentemente associado com doenças infecciosas humanas graves (Liu et al., 2023). A presença desse micro-organismo em animais de produção gera preocupação, pois representa uma fonte de contaminação dos alimentos em sua origem, podendo alcançar o consumidor final (Avila-Novoa et al., 2021).

Salmonella é um gênero que pertence à família Enterobacteriaceae, e consiste em bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, geralmente móveis por flagelos peritríquios, catalase-positiva, oxidase-negativa e ubíquos. Crescem em valores de pH entre 4,5 e 9,3 e temperatura de 7 a 48 °C, sendo a ótima entre 35 e 37 °C, e são extremamente resistentes ao congelamento. Esse gênero se divide em duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*), além de mais de 2.600 sorovares. *S. enterica* pode ser classificada em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) sendo *S. enterica* subespécie *enterica* a que possui a maior quantidade de sorovares e a principal causa de salmonelose. Os sorovares de cada subespécie são classificados de acordo com as características dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Podem ser estritamente adaptados a um hospedeiro específico como *S. Gallinarum* em aves e *S. Typhi* em humanos, ou afetarem uma ampla gama de hospedeiros provocando gastroenterites e infecções extra-intestinais como bacteremia (*S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*). A gravidade da doença depende tanto de fatores do hospedeiro quanto do sorovar envolvido. É considerado um patógeno animal e zoonótico de importância mundial que é frequentemente transmitido ao homem por

meio do consumo de alimentos contaminados (ASAE, 2023; Stevens; Kingsley, 2021; Trabulsi; Alterthum, 2015).

Campylobacter é um gênero que pertence à família Campylobacteraceae. São bacilos Gram-negativos de forma espiralada, não formadores de esporos e móveis por flagelação monopolar ou bipolar monotríquia. Oxidase-positivos, incapazes de fermentar ou oxidar hidratos de carbono ou crescer nas condições de oxigênio atmosférico ou em anaerobiose. São microaerófilos estritos que necessitam de 5 a 10% de oxigênio para proliferarem. Em culturas velhas se tornam corpos esféricos ou cocoides sem viabilidade, assumindo a forma VBNC. O gênero possui natureza zoonótica, com cerca de 25 espécies e 9 subespécies, que detêm como reservatório natural os mamíferos e as aves, tanto os domésticos quanto silvestres. *Campylobacter jejuni* foi reconhecido como agente de infecção intestinal em 1970, e eventualmente toma a circulação, desencadeando infecção em diferentes órgãos. As espécies termofílicas envolvidas em infecções intestinais possuem temperatura ótima de crescimento em torno de 42 °C. São altamente ubíquos, encontrado na água, alimentos, intestino humano e de animais, e em ambientes aquáticos pode arquitetar endossimbiose com amebas de vida livre. *C. jejuni* juntamente com *Campylobacter coli* são responsáveis pela morte de 33 milhões de pessoas a cada ano decorrentes de doenças diarreicas (Trabulsi; Alterthum, 2015; Zhang et al., 2023).

3.4.1- Gêneros bacterianos de importância na indústria alimentícia

Biofilmes são os principais causadores da deterioração de alimentos e surtos de toxinfecções alimentares, além de danos em equipamentos de processamento de alimentos devido a bioincrustação. Os biofilmes permitem que as bactérias se liguem a uma grande variedade de superfícies abióticas como polipropileno, plástico, vidro, aço inoxidável, além de superfícies bióticas como os alimentos e origine o biofilme maduro dentro de alguns dias ou horas. As superfícies de processamento de alimentos apresentam um ambiente ideal para o

desenvolvimento do biofilme, pois possuem alta quantidade de nutrientes decorrentes do processo produtivo que são utilizados pelos micro-organismos para crescimento e fixação. Logo, biofilmes representam um grande obstáculo para a indústria alimentícia, em razão de ser uma origem de contaminação cruzada para os alimentos de difícil eliminação, ocasionando grandes problemas de segurança alimentar e perdas econômicas. *C. jejuni*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. enterica* e *S. aureus* são patógenos relevantes para os ambientes de processamento de alimentos (Abebe, 2020; Avila-Novoa et al., 2021; Carrascosa et al., 2021). Em nível global é incalculável o impacto anual dos biofilmes nas indústrias alimentícias, o que resulta na perda de milhões de dólares (Guo et al., 2023).

As doenças transmitidas por alimentos contaminados afetam anualmente cerca de uma em cada 10 pessoas em todo o mundo, ocasionando mais de 420.000 mortes. A maioria é decorrente de doenças diarreicas em crianças menores de 5 anos de idade (World Health Organization, 2023). Diante desse cenário e da expansão do mercado internacional há o estabelecimento progressivo de acordos de comércio internacional estabelecendo regras e padrões para a produção e o comércio de alimentos inócuos, que quando infringidos geram embargos econômicos ao país. Nesse sentido, o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) tem como objetivo reduzir a prevalência de agentes patogênicos nos produtos de origem animal fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), assim como avaliar as ações de controle adotadas pelos estabelecimentos e gerenciar o risco visando preservar a segurança alimentar. Esse programa abrange o controle de *Salmonella* spp. em carne de bovinos, frangos e perus, entre outros patógenos (MAPA, 2018).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango e o maior exportador, e assim, a avicultura é um setor de grande expressão para o país, com produção em 2022 de 14.524 milhões de toneladas de carne de frango (ABPA, 2023). O destaque mundial leva a preocupação redobrada com a segurança alimentar. Neste contexto, *Salmonella* e *Campylobacter* são considerados os principais

contaminantes de produtos avícolas, mas *Pseudomonas* spp. e *E. coli* também são de importância para o setor (Rather et al., 2021; Rossi et al., 2017). Em 2021 as zoonoses mais relatadas pela União Europeia foram campilobacteriose e salmonelose, relacionadas principalmente ao consumo e manipulação de carne de frango contaminada por *C. jejuni*, *S. Enteritidis* (principal fonte de surtos: ovos e derivados) e *S. Typhimurium*, respectivamente (EFSA, 2022). Logo, o controle das fontes de contaminação por esses patógenos dentro da indústria é extremamente relevante, uma vez que geram grandes perdas econômicas. As principais fontes desses micro-organismos são os intestinos dos animais durante a fase de abate e a contaminação cruzada durante as etapas de processamento, transporte e armazenamento (Rather et al., 2021). Espécies psicrófilas de *Pseudomonas* estão relacionadas a deterioração de carnes durante o armazenamento refrigerado aeróbio. Originam biofilmes que se combinam aos exsudatos da carne de diferentes espécies e geram defeito de qualidade ocasionando rejeição pelo consumidor (Wickramasinghe et al., 2020). Quanto à indústria de carne vermelha, a carne bovina e suína são os tipos mais associados a surtos em decorrência da contaminação por *Salmonella* e *E. coli* a nível global. Sendo os estabelecimentos de processamento o cenário de contaminação mais implicado aos surtos, seguido pelos ambientes domésticos (Warmate; Onarinde, 2023).

Na indústria de laticínios o desenvolvimento de biofilme em plantas de processamento representa uma severa ameaça aos produtos lácteos, referente à sua qualidade e prazo de validade, podendo culminar em surtos. O leite cru possui uma grande variedade de micro-organismos e dentre esses podem estar organismos deteriorantes e patógenos. Diversos fatores influenciam o desenvolvimento do biofilme dentro da indústria, como o tempo de processamento, sistemas complexos, atrasos em transporte e distribuição, microbiota do leite cru em caminhões-tanque, entre outros (Rather et al., 2021). Nesse setor, o biofilme em superfícies pode ocorrer em todas as etapas de fabricação de produtos lácteos, ou seja, desde a coleta do leite cru até o tratamento

de resíduos. Dentre os micro-organismos formadores de biofilme relatados em produtos lácteos, estão *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia* e *Pseudomonas* (Flint et al., 2020; Rather et al., 2021). *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e Enterobacteriaceae spp. são considerados psicrótrófos que têm sido correlacionados a deterioração do leite e seus derivados. A maioria desses patógenos são eliminados pela pasteurização, mas o biofilme é o responsável pela contaminação pós-processamento e consequentemente pela redução de vida útil dos produtos e doenças em consumidores (Woo et al., 2023).

Em síntese, sobre os impactos de biofilmes resistentes dentro das indústrias alimentícias, pode-se mencionar o forte impacto na economia decorrente da destruição de equipamentos utilizados no processamento de alimentos devido a corrosão e consequentemente a necessidade de substituição. Assim como contaminações recalcitrantes, mau cheiro e deterioração de alimentos, redução da vida útil de produtos, e por fim, intoxicações alimentares e surtos de doenças transmitidas por alimentos, que impactam diretamente o sistema de saúde elevando os gastos com tratamentos (Rather et al., 2021).

3.4.2- Gêneros bacterianos de importância para a saúde/ambiente hospitalar

Em 2019, a estimativa de óbitos globais em decorrência de resistência bacteriana aos antimicrobianos foi cerca de 4,95 milhões. Os seis principais patógenos associados a esses óbitos foram *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Juntos foram responsáveis por cerca de 3,57 milhões de óbitos, e somente *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) ocasionou mais de 100 mil mortes. A síndrome infecciosa mais onerosa foi infecções respiratórias inferiores, responsáveis por mais de 1,5 milhão de óbitos. As taxas de mortalidade decorrentes da resistência bacteriana aos antimicrobianos são maiores em países de baixa a média renda em comparação com aqueles de alta renda. Dessa forma, além de um grande problema de saúde global, essa resistência aos antimicrobianos

representa um problema ainda mais grave para os países mais pobres do mundo (Murray et al., 2022). Em torno de 65 a 80% das infecções bacterianas em humanos estão associadas ao biofilme, sendo esse mil vezes mais resistentes aos antibióticos do que as células planctônicas (Eze; Chenia; El Zowalaty, 2018; Jamal et al., 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a resistência antimicrobiana está entre as 10 principais ameaças globais à saúde pública (World Health Organization, 2022), e lista *A. baumannii* (resistente a carbapenêmicos), *P. aeruginosa* (resistente a carbapenêmicos), e Enterobacteriaceae (resistente a carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª geração) como patógenos de prioridade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos. Já *S. aureus* (MRSA; resistente a vancomicina), *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. (resistentes a fluoroquinolonas), são classificados como prioridade alta (World Health Organization, 2021). Portanto, os principais patógenos responsáveis pelos óbitos globais por resistência bacteriana aos antimicrobianos estão listados pela OMS como prioritários e todos são capazes de desenvolver biofilmes.

Estudos avaliando os bioaerossóis hospitalares (partículas biológicas transportadas pelo ar) vêm demonstrando que a densidade de bactérias no ar de hospitais pode ser considerada um importante fator de risco para todos os presentes no ambiente, tanto para pacientes quanto para funcionários e visitas. O gênero mais prevalente a nível mundial é *Staphylococcus* (Pertegal et al., 2023). Estudos conduzidos em dois hospitais no Irã identificaram os gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* como os mais prevalentes (Hemati et al., 2021; Maleki; Nazari, 2022). A microbiota da superfície hospitalar pode ser transmitida por meio do contato direto e também pode ser transportada para as mucosas respiratórias e outros tecidos mais profundos, podendo ocasionar infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). *Staphylococcus* e *K. pneumoniae* foram detectados em maiores porcentagens na cavidade nasal de bebês após 13 dias de internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal de um hospital em Trieste, Itália. Essas maiores porcentagens são tanto em

número de pacientes colonizados quanto em quantidade de micro-organismo e abundância relativa (Cason et al., 2021).

No Brasil, em um hospital de médio porte situado no noroeste paulista, na UTI adulta foi constatada a presença de micro-organismos viáveis e potencialmente patogênicos nos bioaerossóis do ambiente. Os gêneros isolados foram *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Klebsiella* (Cavalheiro; Kozusny-Andreani, 2021). Isso demonstra que os patógenos presentes no ambiente hospitalar são capazes de colonizar pacientes, e o risco aumenta conforme se estende o tempo de internação. Dessa forma, o monitoramento microbiológico do ambiente se mostra extremamente necessário, de forma a identificar os patógenos presentes, o risco de infecção associado a esses e quais condutas devem ser tomadas a fim de prevenir as IRAS ou infecções nosocomiais.

K. pneumoniae é um patógeno oportunista humano e uma das principais causas de infecções hospitalares, promovendo pneumonia, infecções de corrente sanguínea, infecções em recém-nascidos, abscessos hepáticos, infecções do trato urinário e em pacientes de UTI (Wang et al., 2020; World Health Organization, 2022). Os indicadores hospitalares de julho de 2022 do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas demonstraram que dentre os principais micro-organismos isolados em IRAS em diferentes setores (UTI adulto, clínica médica, clínica de precauções de adultos, rede de urgência e emergência), *K. pneumoniae* estava presente em todos eles. *Acinetobacter* estava presente na UTI adulto e na clínica de precauções de adultos, enquanto *P. aeruginosa* estava presente na clínica médica e na rede de urgência e emergência. Na clínica médica também houve presença de *E. coli* e *Staphylococcus* (Souza et al., 2022). No Hospital do Rim em São Paulo, um estudo realizado entre 2009 e 2015 identificou 86 casos de infecções decorrentes de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, com a mortalidade geral em 30 dias de 36%, mas segundo a literatura pode chegar a 42%. Esses casos ocorreram em pacientes transplantados renais e transplantados pâncreas-rim, cujos sítios de infecção mais frequentes foram a corrente sanguínea, seguido

pelo trato urinário, sítio cirúrgico e trato respiratório inferior. No entanto, a infecção do trato respiratório foi a que resultou na maior taxa de mortalidade, sendo igual a 60%, enquanto a infecção do trato urinário apresentou a menor taxa, de 15,38% (Campos Júnior et al., 2022).

Na medicina veterinária, *K. pneumoniae* é um patógeno muitas vezes negligenciado e com seu risco pouco investigado. É associado a pneumonia em animais, assim como metrite epidêmica e cervicite em éguas, septicemia em potros e mastite em bovinos. Esse patógeno foi isolado de animais domésticos, animais de vida selvagem, meio ambiente e alimentos, demonstrando multirresistência antimicrobiana na Alemanha. No contexto de Saúde Única, ou seja, aquela que une a saúde humana, animal e do meio ambiente, a presença desse patógeno com essas condições demonstra o risco de disseminação de genes de resistência entre os três componentes (Wareth; Neubauer, 2021). No Brasil, avaliando o perfil de resistência antimicrobiana para esse patógeno isolado em rebanhos leiteiros, foi encontrado três isolados (dois de infecção intramamária de vacas distintas e um de leite de tanque a granel) com dois genes (*bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV-108}) relacionados a resistência a β -lactamases de espectro estendido, sendo esses genes relatados pela primeira vez em isolados de gado leiteiro (Nobrega et al., 2021). Essa detecção em animais leiteiros é relevante, uma vez que a resistência mediada por β -lactamases de espectro estendido é de importância progressiva para a saúde pública.

Em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), *K. pneumoniae* foi relatada pela primeira vez ocasionando um surto de alta morbidade e mortalidade em massa, o que implica em uma alta perda econômica. A mortalidade de 100% afetou cerca de 90 mil peixes juvenis dentro de quatro dias em uma piscicultura comercial brasileira. Dentre os sinais clínicos observados durante o surto, há letargia, anorexia, hemorragias subcutâneas, sangramento urogenital e ascite (Vaneci-Silva et al., 2022). Esse patógeno também foi associado a um surto fatal em saguis de cativeiro decorrente de septicemia hiperaguda (Guerra et al., 2020). Pode-se inferir que atualmente *K. pneumoniae* representa um risco potencial tanto para a saúde humana quanto para a animal, e o temor

aumenta diante do surgimento de cepas hipervirulentas e multirresistentes.

A. baumannii é um patógeno oportunista de preocupação emergente para ambientes hospitalares, em razão de sua extensa resistência antimicrobiana. Dentre as drogas para qual possui resistência, os carbapenêmicos são de grande preocupação mundial. Essa classe antimicrobiana é considerada como de última escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR). Entre os problemas desencadeadas por esse patógeno, há infecções de pele e tecidos moles, infecções de feridas e do trato urinário inferior (ITUs), bacteremia, endocardite, meningite e pneumonia. Sendo que a pneumonia é a IRA mais comum, principalmente em pacientes de UTI que necessitam de ventilação mecânica, com a mortalidade variando de 40 a 70% (Ibrahim et al., 2021). O tubo endotraqueal utilizado para a intubação consiste em um fator crítico único e responsável por pneumonia com alta mortalidade. O biofilme formado nesse tubo exerce um papel marcante no desenvolvimento da pneumonia, já que favorece a resistência bacteriana, além de aumentar a patogênese e ainda ser um reservatório bacteriano persistente (Khazaal; Al-Saryi; Ibrahim, 2020). Os tubos endotraqueais feitos de poliestireno, polipropileno, politetrafluoretileno e vidro possuem excelência para a formação de biofilmes, assim como superfícies de outros dispositivos médicos como válvulas cardíacas, articulações artificiais, ventiladores, cateteres urinários ou intravasculares, e também as superfícies hospitalares em geral (Pompilio et al., 2021).

A capacidade de *Acinetobacter* em colonizar tanto superfícies bióticas quanto abióticas é extremamente útil para esse micro-organismo dentro do ambiente hospitalar, pois o mesmo pode colonizar pacientes até mesmo sem sintomas, cuidadores, superfícies ou dispositivos hospitalares aumentando as chances de IRAS (Roy et al., 2022). Na medicina veterinária, *A. baumannii* tornou-se particularmente preocupante, uma vez que tem sido crescente os relatos de sua associação com infecções em animais. Dentre as infecções, há

piodermite canina, fascíte necrosante em felinos, infecções do trato urinário, tromboflebite em equinos, infecções do trato respiratório inferior, sepse em potros, infecções sistêmicas em caninos, choque séptico em felinos, pneumonia e sepse em suínos, pneumonia e mortalidade aguda em martas, entre outros (Van der Kolk et al., 2019). Esse patógeno também foi identificado como agente infeccioso de um surto de pneumonia epidêmica que culminou no óbito de centenas de ovelhas no Paquistão. Por meio de infecção experimental as bactérias re-isoladas dos animais infectados apresentaram-se idênticas ao inóculo, atendendo os postulados de Koch (Linz et al., 2018). Logo, antes considerado como um patógeno oportunista humano, atualmente está vinculado a surtos tanto em humanos quanto em animais a nível mundial. Dessa forma, os dados indicam que *A. baumannii* evoluiu para um patógeno nosocomial veterinário (Van der Kolk et al., 2019).

E. coli causa infecção de corrente sanguínea, infecções intestinais e urogenitais, além de outros distúrbios extra-intestinais em humanos. A principal fonte de bacteremia por esse patógeno é a infecção do trato urinário, responsável por mais de 50% dos casos. No entanto nem todas as cepas são patogênicas. Existem as *E. coli* comensais que são colonizadoras gastrointestinais e fazem parte tanto da microbiota humana como de outros mamíferos de sangue quente (Bonten et al., 2021; Kobayashi et al., 2021). Essa espécie bacteriana possui uma alta capacidade em acumular genes de resistência, principalmente por meio da transferência horizontal. Dessa forma, esse patógeno adquire multirresistência e se torna um problema tanto para a medicina humana quanto para a medicina veterinária a nível mundial. Dentre os mecanismos que municiam a patogenicidade de representantes desta espécie, tem-se a aquisição de genes que conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos, pan-resistência a aminoglicosídeos, quinolonas, fluoroquinolonas e polimixinas (Poirel et al., 2018).

Do ponto de vista da saúde humana, *E. coli* pode ser classificada em três subtipos. O primeiro inclui isolados comensais que colonizam o intestino de indivíduos saudáveis, o segundo por isolados diarreicos que

se diferem conforme os fatores de patogenicidade da cepa. Por fim, o terceiro subtipo é o patogênico extra-intestinal que se assemelha aos comensais na colonização do intestino humano, no entanto pode sobreviver em ambientes extra-intestinais e desencadear graves doenças humanas (El-Shaer et al., 2021). Na medicina veterinária, *E. coli* é uma das principais causas de diarreia em animais, especialmente nos mais jovens. Em adultos, cepas extra-intestinais promovem infecções do trato urinário principalmente em animais de companhia e mastite em vacas leiteiras. Em aves, *E. coli* patogênica aviária (APEC) causa infecção no trato respiratório e progride para septicemia, pericardite e por fim o óbito (Poirel et al., 2018).

Em 2019, no Hospital das Clínicas de Pernambuco foram obtidos isolados clínicos hospitalares, e 70% deles correspondiam a *S. aureus* (MRSA), e 30% a *K. pneumoniae* carbapenemase e *P. aeruginosa* MDR (Botelho, 2019). *S. aureus* está frequentemente associado a osteomielite aguda e crônica, que é desencadeada por via exógena (dispositivos de fixação interna) e também por via hematogênica. Muitas das infecções do sistema musculoesquelético são decorrentes de biofilmes, o que consequentemente dificulta o tratamento. As infecções mais frequentes em pacientes ortopédicos são osteomielite crônica, infecção da articulação periprotética e osteomielite de ossos longos associada a implantes (Zimmerli; Sendi, 2017). Esse patógeno coloniza a pele e mucosas de cerca de 30% da população humana na forma permanente e 60% na forma transitória, respectivamente (Craft et al., 2019).

MRSA é um micro-organismo que vive de forma comensal em humanos, sendo transmitido em ambientes comunitários e de saúde, mas também é considerado uma das principais causas de bacteremia, endocardite, infecções de pele e tecidos moles, infecções ósseas e articulares, e por fim IRAS. Esse patógeno foi detectado colonizando as narinas, orofaringe, axilas, períneo, reto, região perirrretal e também o intestino humano. Representa uma ameaça clínica de alta morbidade e mortalidade, cujas cepas infectantes são correspondentes às cepas colonizadoras em cerca de 50 a 80% dos casos. Por ser um patógeno versátil, imprevisível, de alta capacidade de adaptação genética e que

origina cepas epidêmicas bem sucedidas em série, representa uma grave e complexa ameaça à saúde humana (Turner et al., 2019). Esse patógeno oportunista possui um amplo arsenal de fatores de virulência que o permite tirar vantagens de hospedeiros comprometidos de diferentes formas. A capacidade de viver em biofilmes ainda lhe confere proteção a antibióticos e ao sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, o biofilme promove aumento da complexidade de um grande problema atual, a resistência antimicrobiana. Dessa forma, MRSA é considerado atualmente como uma pandemia, que se iniciou com clones adquiridos em hospitais na década de 1960, seguido de clones adquiridos na comunidade na década de 1990, e na década de 2000 clones foram associados ao gado (Craft et al., 2019).

Para a medicina veterinária, *S. aureus* também é uma ameaça, sendo um micro-organismo colonizador e comensal de muitos animais. Frequentemente MRSA é associado a mastite bovina, uma infecção de difícil tratamento em decorrência da resistência a uma ampla gama de antibióticos β -lactâmicos, os quais são comumente utilizados para o tratamento. Esse patógeno já foi isolado de amostras de leite de quartos mamários e de tanque de resfriamento, em bezerros, novilhas, no ambiente da fazenda e também em trabalhadores de fazenda, o que demonstra que a transmissão pode ocorrer entre humanos e animais (Lienen et al., 2021). A maioria dos casos de infecções intramamárias é na forma crônica, persistente, e propensa a recidiva. Dentre as características fenotípicas associadas a essa persistência na glândula mamária, destaca-se a capacidade em formar biofilmes e invadir/sobreviver de forma intracelular (Grunert et al., 2018). Entre animais de companhia (cães e gatos) e seus proprietários há transmissão e infecções recorrentes por MRSA. Os animais são contaminados a partir de seu proprietário que constitui o reservatório primário, permitindo assim que o patógeno chegue a diferentes espécies. Os cães e gatos se tornam colonizados e também reservatório desse patógeno, podendo assim infectar humanos coabitantes. Dessa forma, esses reservatórios se tornam um perigo para a saúde pública, principalmente quando os proprietários são portadores de *S. aureus*.

MDR (Hemeg, 2021). A transmissão interespecíes também já teve casos confirmados entre suínos, humanos e bovinos, enfatizando assim a natureza zoonótica e a importância desse micro-organismo na Saúde Única (Rao et al., 2022).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista e multirresistente que frequentemente está envolvido em infecções nosocomiais em UTI. É responsável por infecções agudas e crônicas, assim como infecções fatais, principalmente em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com câncer, pós-operatórios e infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística, traumas, queimaduras, sepse e infecções graves que requerem ventilação mecânica como a COVID-19, são situações em que esse patógeno frequentemente está associado agravando o quadro (Qin et al., 2022; Thi; Wibowo; Rehm, 2020). Também promove infecções do trato urinário, úlceras da córnea, ceratite, gastroenterite em neonatos, abscessos, broncopneumonia e meningite (Spagnolo; Sartini; Cristina, 2021). Biofilmes fortemente estruturados são identificados com frequência em pacientes portadores de infecções crônicas. Esses biofilmes possuem uma grande influência em mais de 90% das infecções crônicas de feridas, o que conseqüentemente ocasiona má cicatrização e um tratamento de maior complexidade (Thi; Wibowo; Rehm, 2020). Em indivíduos saudáveis as infecções por esse patógeno são raras, geralmente leves e autolimitantes. Dessa forma, a condição geral do paciente e conseqüentemente o seu estado de saúde determina o resultado da infecção (Spagnolo; Sartini; Cristina, 2021). O diagnóstico precoce de *P. aeruginosa* é essencial para evitar desafios no tratamento e para auxiliar na conduta terapêutica (Khatami et al., 2022; Mohamed et al., 2022).

Na medicina veterinária *P. aeruginosa* tem sido considerada como a causa distinta de infecções, principalmente em cães, causando otite externa, infecções superficiais de pele, piodermite profunda crônica, abscessos perianais, infecções de feridas e do trato urinário. Semelhante ao acometimento em humanos, as infecções em animais são de tratamento complexo devido a resistência intrínseca a diferentes

antibióticos de uso comum, sendo escassas as possibilidades de escolha (Dégi et al., 2021). Para peixes consiste em um dos patógenos de maior ameaça que induzem síndrome ulcerativa e hemorragia. Apresenta comportamento oportunista compondo a microbiota normal dos peixes, mas se torna patogênico quando esses estão em condições de estresse como desnutrição e superlotação (Algammal et al., 2020). Em bovinos leiteiros *P. aeruginosa* é associada a mastite clínica e subclínica, conseguindo crescer, sobreviver e originar biofilme em tanques de leite a granel, máquinas de ordenha, dutos, camas sujas e solo úmido, o que aumenta o risco de causar infecções em outros animais, inclusive em humanos. Quanto menor a higiene no ambiente e utensílios maior será a formação de biofilme, e eventualmente mais virulento e resistente (Aziz; Mahmoud; Mohamed, 2022). Nas espécies aviárias em condições ambientais normais esse patógeno também é considerado como oportunista, que frente a condições estressantes pode se tornar patogênico, causando infecções. Essas estão relacionadas a sintomas respiratórios, diarreia, mortalidade e graves perdas para a indústria avícola (Mohamed et al., 2022).

Campilobacteriose e salmonelose representam as zoonoses de origem alimentar com a maior frequência nos países desenvolvidos. Em 2021 na União Européia ocorreram 127.840 casos humanos de campilobacteriose com mais de 10.000 hospitalizações, sendo a infecção gastrointestinal mais comum desde 2007 e o segundo agente de origem alimentar mais associado a hospitalizações, depois da salmonelose, que foi responsável por 60.050 casos e 11.785 hospitalizações (EFSA, 2022). As principais vias de transmissão desses agentes aos humanos são o consumo de alimentos e água contaminados, o contato com animais domésticos infectados e também a via oral-fecal direta. A relação entre os hospedeiros, o ambiente, as bactérias e os fatores relacionados ao manejo determinam a colonização de estirpes de *Campylobacter* e *Salmonella* em animais domésticos e não domésticos, e conseqüentemente a disseminação dessas bactérias no ambiente. Dessa forma, em locais de menor recurso com saneamento e higiene precários, a transmissão dessas infecções é

predisposta pela interação prolongada entre humanos e animais, por meio do contato direto ou indireto em ambientes contaminados com fezes. No entanto, essa interação contínua predispõe a infecção humana, mas nem sempre resulta em doença clínica (Rukambile et al., 2019). A campilobacteriose em humanos promove diarreia com sangue, febre e cólicas, podendo ocorrer náuseas e vômitos. Os sintomas iniciam geralmente com dois a cinco dias após a infecção e permanecem por cerca de uma semana, período em que a maioria das pessoas se recupera completamente, podendo haver a eliminação da bactéria nas fezes por semanas após a recuperação. A maioria dos indivíduos se recupera sem tratamento antibiótico, mas naqueles que possuem imunossupressão pode ocorrer infecção com risco de vida decorrente do acesso da bactéria a corrente sanguínea (CDC, 2023a). Essa infecção também está associada a complicações, como Síndrome de Guillain-Barré, Artrite Reativa e Síndrome do Cólon Irritável (Rodrigues et al., 2021).

Campylobacter spp. é frequentemente isolado em animais domésticos clinicamente sãos e é considerada comensal do trato gastrointestinal das aves domésticas e silvestres. Em frangos de corte está associada ao epitélio intestinal e na região do ceco e cloaca encontra-se ligada ao muco que reveste as vilosidades intestinais, não promovendo lesões (El-Saadony et al., 2023; Rukambile et al., 2019). *Campylobacter foetus* subsp. *venerealis* causa a campilobacteriose genital bovina, responsável por falhas reprodutivas, abortos e perdas econômicas (Balzan et al., 2020). Em cães e gatos *C. upsaliensis*, *C. helveticus* e *C. jejuni* são espécies comumente isoladas em amostras de fezes. Esses animais são considerados reservatórios e hospedeiros assintomáticos de *Campylobacter*, principalmente os animais jovens. A maioria dos animais apresentam infecções subclínicas e alguns desenvolvem enterite leve a moderada (Darold et al., 2021). Diante do estado de portador assintomático nesses animais têm-se o risco da campilobacteriose humana, pois cada vez mais se estreitam as relações entre seres humanos e animais domésticos, e esses passam a ser considerados como membro da família.

Salmonelose não tifoide geralmente ocasiona um quadro diarreico agudo em humanos, em que o período de incubação típico é de 12 a 96 horas, podendo ser superior a sete dias. É responsável por ocasionar cerca de 60.000 mortes anuais a nível mundial. A diarreia aguda é acompanhada de cólicas abdominais, febre e na maioria das vezes se resolve entre um e sete dias sem tratamento. No entanto, cerca de 5% dos casos evoluem para bacteremia ou infecção invasiva focal, como osteomielite, meningite, infecção endovascular e artrite séptica. Essa taxa de infecção invasiva é maior em bebês, idosos e pessoas com quadros de imunossupressão (CDC, 2023b). Muitas espécies de animais incluindo os silvestres são reservatórios dos diversos sorovares de *Salmonella* spp. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* causa infecções principalmente em animais de sangue quente, especialmente os mamíferos. Frangos, suínos e bovinos constituem reservatórios importantes desse patógeno e o consumo de sua carne contaminada é fator significativo para a infecção humana (Santos; Lopes; Maciel, 2022; Stevens; Kingsley, 2021).

Em aves, *S. Pullorum* causa a pulorose enquanto *S. Gallinarum* promove o tifo aviário, ambos de importância para a saúde animal pois não afetam humanos. Outros sorovares como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* afetam ambos, ocasionando doenças graves e morte principalmente em aves jovens (MAPA, 2022). Em suínos, *Salmonella* pode ocasionar febre transitória e doença grave dependendo da virulência da cepa, assim como a imunidade do rebanho, dose e via de infecção, sendo também frequentemente isolada de animais saudáveis (Rukambile et al., 2019). *S. Choleraesuis* é adaptada ao suíno e está relacionada a doença generalizada grave, com febre, depressão, sepse, pneumonia, meningite, artrite e diarreia, enquanto *S. Typhimurium* é associada principalmente a enterocolite mas também a quadros de septicemia. A doença é observada principalmente nas fases de creche, crescimento e terminação, e ocasionalmente na maternidade, pois nessa há a imunidade passiva via colostro (Kich; Meneguzzi; Reichen, 2017). Bovinos de qualquer idade podem sofrer salmonelose clínica sendo os mais vulneráveis bezerros jovens, com menos de seis meses de idade.

A infecção é caracterizada por diarreia aquosa ou mucoide, com fibrina e sangue, podendo evoluir para septicemia, pneumonia, perda de peso e abortos, sendo causada principalmente pelos sorovares Typhimurium e Dublin. O manejo inadequado e comorbidades constituem fatores de risco predisponentes para a infecção de bovinos. Adultos podem apresentar a infecção e ocasionalmente se tornar portadores após a recuperação, eliminando o agente no ambiente de forma contínua ou intermitente pelas fezes por anos ou ao longo de toda a vida (Molossi et al., 2021; Rukambile et al., 2019).

3.5- COMPONENTES COMUNS NA MATRIZ DO BIOFILME DE GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS

Dentre os componentes comuns na matriz de biofilmes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas destacam-se proteínas, polissacarídeos, DNAe e vesículas de membrana. Proteínas do tipo amiloide são encontradas como modulinas solúveis em fenol (*S. aureus*), curli (*E. coli*) e amiloides funcionais Fap (*Pseudomonas* spp). Fornecem integridade estrutural ao biofilme além de atuarem como canais para passagem de nutrientes e ajudarem na sua dispersão devido suas propriedades surfactantes. Já os polissacarídeos podem ser vistos como pré-requisito, diante da importância para adesão inicial e manutenção dos biofilmes maduros. O DNAe é um componente onipresente no biofilme, com papel estrutural e envolvimento no desenvolvimento de interações físico-químicas entre os componentes da EPS. Essas interações também ocorrem com os fatores expressos em superfícies bacterianas e com as superfícies abióticas (Campoccia; Montanaro; Arciola, 2021; Ruhai; Kataria, 2021).

As vesículas de membrana externa (OMVs) estão presentes em biofilmes de bactérias Gram-negativas, enquanto vesículas de membrana (MVs) estão presentes em Gram-positivas. As OMVs estão relacionadas a vesículas protetoras, que realizam transporte de toxinas, enzimas e DNA, podendo ser utilizadas para transporte de proteínas da matriz. Equivalentemente, em *S. aureus* há proteínas compartilhadas em

vesículas de membrana, cuja entrada citosólica é necessária para a citotoxicidade desse patógeno. MVs desse micro-organismo também podem realizar o transporte de β -lactamase ativa, o que consequentemente, gera resistência a antibióticos (Ruhel; Kataria, 2021).

Quanto a composição da matriz do biofilme, em *S. aureus* foi observado maior teor proteico em relação a carboidratos (Lemos et al., 2018), no entanto a composição é variável entre as diferentes cepas. *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) possui os polissacarídeos como principal componente da matriz, enquanto MRSA apresenta predominância de proteínas e DNAe. *S. aureus* isolados de carne produziram biomassa de $1,02 \pm 0,042$ rica em DNA ($47,9 \pm 4,3\%$), e com menor teor de polissacarídeos ($32 \pm 2,6\%$) e proteínas ($33,2 \pm 4,6\%$), quando comparados a isolados associados a hospital, que produziram biomassa de $1,29 \pm 0,075$, mais robustos e com maior fração proteica ($52,0 \pm 6,3\%$), DNA ($39,4 \pm 5,2\%$), e menor teor de polissacarídeos ($31,9 \pm 2,9\%$) (Ball et al., 2022). Avila-Novoa e colaboradores (2021) provaram que matrizes a base de proteínas são de suma importância para a estrutura do biofilme formado por *S. aureus*. Já em *K. pneumoniae* há uma relativa abundância e distribuição de carboidratos e proteínas, sendo a abundância percentual variável entre os isolados que afetam diferentes locais de infecção. A fração de proteínas (68,56%) foi superior a fração de carboidratos (58,27%) no biofilme de isolados de sangue, correspondendo respectivamente a degradação com proteinase K e metaperiodato de sódio (NaIO_4), enquanto a enzima DNase reduziu 28,05% da biomassa quando comparada ao controle. Essa tendência ocorreu de forma semelhante no biofilme de isolados de fezes e pus, com o efeito do NaIO_4 maior nesse último (Singh et al., 2019). Altos teores de DNAe, proteínas e polissacarídeos foram associados a biofilmes fortes de *K. pneumoniae*, cujo tratamento com DNase (46,62%) e proteinase K (72,9%) gerou redução significativa na biomassa (Desai; Sanghrajka; Gajjar, 2019).

Em biofilme de *E. coli* ATCC 11229 tratado com proteinase K houve redução de biomassa de $8,46 \pm 0,37\%$, e $10,34 \pm 0,17\%$ quando

tratado com DNase (Solis-Velazquez et al., 2021). No entanto, os principais componentes dos biofilmes de bactérias entéricas como *E. coli* e *Salmonella* são proteínas amiloides (curli), celulose (polissacarídeo), DNAe e diversas proteínas de superfície (Tursi; Tükel, 2018). A expressão de curli e celulose demonstrou ter um papel crítico sobre a adesão inicial a superfícies, agregação celular, formação de película, e consequentemente, sobre o desenvolvimento do biofilme (Adcox et al., 2016). Um estudo avaliou a natureza química do biofilme de *A. baumannii*, de pacientes hospitalizados, e evidenciou maior teor proteico em relação aos teores de DNAe e carboidratos, quando o biofilme foi tratado respectivamente com proteinase K, DNase e metaperiodato de sódio. Assim foi sugerido que o biofilme desse patógeno possui predominância de proteína, com pouca ou nenhuma fração de carboidratos e DNA em sua composição (Genteluci, 2020).

A capacidade de formar biofilmes e a sua constituição é variável entre cepas de *Campylobacter*, mas carboidratos e DNAe são reconhecidos como frações significativas de EPS em biofilmes de representantes desse gênero (Ma et al., 2022). *C. jejuni* apresentou composição de biomassa predominantemente proteica em relação aos tratamentos com proteinase K e metaperiodato de sódio, em cepas isoladas de carcaças de frango de corte de uma indústria brasileira exportadora com ciclo completo de produção (Melo, 2017). Já o biofilme de *P. aeruginosa* é rico em carboidratos, principalmente alginato, Pel e Psl, todos polissacarídeos extracelulares. No entanto, há combinações distintas desses componentes entre cepas e isolados clínicos (Alshraideh et al., 2020; Rybtke et al., 2021). *P. aeruginosa* PAO1 produz Pel e Psl, enquanto isolados clínicos de *P. aeruginosa* mucoide produz principalmente o alginato (Rybtke et al., 2021). No estudo de Alba (2018), o biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 15442 apresentou composição predominantemente de polissacarídeos, quando tratado com metaperiodato de sódio e proteinase K.

No geral, a matriz do biofilme é composta principalmente de carboidratos e proteínas, mas as porcentagens oscilam de acordo com a espécie microbiana e suas vias genéticas e metabólicas. Essas vias são

moduladas de acordo com as diferentes fontes de carbono ou nitrogênio no meio de cultura ou ambiente em que o biofilme se desenvolve (Nouha et al., 2018).

3.6- COMPOSTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.6.1- Base quaternária

Os compostos de amônio quaternário (QACs) são uma classe de produtos químicos, amplamente utilizados como conservantes, agentes antimicrobianos e antiestáticos e para outras funções na limpeza, desinfecção, produtos de cuidados pessoais e produtos de bens de consumo duráveis. Esses compostos possuem um átomo de nitrogênio com ligações covalentes a quatro resíduos, tornando o nitrogênio carregado positivamente. O nitrogênio se liga a uma cadeia de alquil, com extensão entre C5 e C18, a dois grupos metil e a quatro resíduos sobre os quais as categorias são construídas. A natureza dos substituintes ligados e a extensão da cadeia de alquil influenciam na função, desempenho, destino ambiental e toxicidade dos QACs (Arnold et al., 2023; Christen et al., 2017).

A utilização dos QACs como agentes antibacterianos é interessante pois possuem uma eficaz atividade biocida e longa durabilidade (Song; Kong; Jang, 2011). Essa atividade depende da extensão da cadeia hidrofóbica de alquil, que rompe fisicamente as membranas da célula alvo. As cadeias longas podem desfazer as propriedades físicas e bioquímicas das membranas e o nitrogênio carregado permanece na superfície da membrana interrompendo a distribuição de carga. Além disso, compostos de amônia quaternária também podem atuar intracelularmente e se ligar ao DNA (Christen et al., 2017).

No entanto, já foi relatado que algumas espécies bacterianas Gram-negativas como *P. aeruginosa* podem apresentar certa resistência aos QACs e alguns antibióticos. Os mecanismos de resistência inclui modificação de estruturas da membrana celular usando bombas de

efluxo para expulsar os biocidas das células, além de outras táticas, como a formação de biofilmes (Mohapatra et al., 2023). Em outras espécies, dependendo de qual composto está ligado à base quaternária, é possível ter resultados positivos na redução da multiplicação bacteriana e possuir efeitos antibiofilmes, como constado em estudo conduzido por Daood et al. (2020). Os autores observaram efeito significativo de silano de amônia quaternário na diminuição de crescimento microbiano, destruição da membrana bacteriana e inibição da formação de biofilmes por *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*.

Os QACs têm atraído atenção pelas excelentes propriedades de limpeza e desodorização de superfícies duras e ampla atividade antimicrobiana. Podem ter contato com a pele humana e são caracterizados pela forte ação biocida mesmo em concentrações muito baixas, além de apresentar baixa toxicidade. Acredita-se que os QACs atuam sobre os biofilmes bacterianos por meio do efeito lítico nas células bacterianas, no entanto, há mecanismos alternativos, como o cloreto de dequalínio entre 8,11 a 256 µg/mL, que apesar de não causar lesão primária na membrana celular, se difunde nas células e provoca a morte bacteriana e a destruição do biofilme. Da mesma forma, pilaresarenos catiônicos inibiram efetivamente a montagem do biofilme sem comprometer as membranas bacterianas. A penetração dos QACs nos biofilmes é retardada pela presença de EPS carregadas negativamente e pelos genes de resistência. A atividade desses compostos contra biofilmes maduros permanece em um nível baixo. Assim a modificação da molécula QAC, o uso de combinação de QACs em sinergia com agentes desestabilizadores da matriz do biofilme, assim como com nanopartículas metálicas, são estratégias que vem sendo estudadas para aumentar a potência da ação biocida sobre os biofilmes, assim como, desenvolver biocidas de nova geração (Saverina et al., 2023).

3.6.2- Ácido fosfórico

O ácido fosfórico possui em sua estrutura três átomos de hidrogênio (H) ligados a um átomo de fósforo (P) e quatro átomos de oxigênio (O), com fórmula química representada por H_3PO_4 . Esse composto pode ser encontrado naturalmente em pequena proporção (0,1-0,5%) em leite, carnes, ovos e nozes, sendo também frequentemente utilizado na produção de fertilizantes, tratamento de superfícies metálicas e como aditivo alimentar. A forma mais comum de apresentação do ácido fosfórico é em solução aquosa de 75 a 85%, que é incolor, inodoro, viscoso e não volátil (Spainhour, 2014).

A atividade antimicrobiana do ácido fosfórico pode estar relacionada à diminuição do pH do meio, o que torna o ambiente impróprio para os micro-organismos, causando morte celular (Chaves et al., 2020). Embora poucos estudos sejam encontrados na literatura relatando os efeitos do ácido fosfórico agindo em diferentes bactérias, Arias-Moliz et al. (2008) avaliaram a concentração bactericida mínima de soluções de ácido fosfórico e ácido cítrico contra *Enterococcus faecalis* e demonstraram que o ácido fosfórico apresentou atividade bactericida em menos tempo que o ácido cítrico. Outro estudo, conduzido por Prado et al. (2015) concluiu que o efeito antimicrobiano de solução de ácido fosfórico contra *Candida albicans*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Actinomyces meyeri*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens* foi maior quando comparando com outros agentes irrigantes testados em endodontia.

3.6.3- D-limoneno vegetal

O D-limoneno (DL) é um terpeno monocíclico, muito produzido na natureza como um metabólito secundário em plantas, um ingrediente bioativo em cascas de frutas cítricas, volátil e aromático, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas e muitos efeitos promotores da saúde. Em temperatura ambiente, o DL é um líquido oleoso incolor, com solubilidade muito baixa em água (13,8 mg/L a 25 °C) e um ponto de ebulição de 176 °C (Akhavan-mahdavi et al., 2022). Adicionalmente, o DL pode inibir significativamente bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo aquelas deteriorantes como *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*, além de agir contra fungos, como *Aspergillus niger*. Já o Limoneno (1-metil-4-(1-metiletenil) é bastante encontrado em óleos de várias plantas (pimenta preta, limão e laranja, entre outras) e também pode ser aplicado na preservação de alimentos por possuir atividade bactericida de amplo espectro, ser seguro e possuir baixa toxicidade (Han; Sun; Chen, 2020).

Acredita-se que o modo de atuação como agente antimicrobiano dos terpenos e seus compostos, incluindo o limoneno, se dá pela ruptura das membranas citoplasmáticas, levando a morte celular, teoria já constatada em *E. coli* (Gupta; Jeyakumar; Lawrence, 2021; Masood et al., 2023). Outro estudo conduzido por Han e colaboradores (2020) indicou que o limoneno, além de causar danos à membrana celular, pode impedir a síntese de ATP por inibir a atividade do complexo respiratório e ATPase; e as diferentes expressões de proteínas na cadeia respiratória confirmaram que o limoneno afetou a respiração e o metabolismo energético da bactéria *Listeria monocytogenes*.

Em relação ao uso do limoneno como agente antibiofilme bacteriano, um estudo conduzido por Gambino et al. (2022) avaliou a ação dessa substância em biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, formados em três superfícies distintas: policarbonato, polipropileno e aço inoxidável. Os autores verificaram que quando adicionado durante a formação de biofilmes em concentrações inferiores a inibitória mínima, o limoneno inibiu o crescimento bacteriano em cerca de 2 ciclos log, nos três materiais. A capacidade de erradicação foi equivalente, quando adicionado aos biofilmes maduros mono e polimicrobianos. Esse tratamento fez com que houvesse diferentes níveis de expressão de genes associados biofilmes. Ademais, quando o biofilme cresceu sob tensão de cisalhamento, o limoneno demonstrou eficiência, causando danos expressivos e irreversíveis à estrutura do biofilme.

3.6.4- Ácido hipocloroso

O ácido hipocloroso é um cloro oxoácido cuja fórmula química é HClO, que atua como agente oxidante e é considerado um ácido fraco e instável, que se forma quando o cloro se dissolve na água (NCBI, 2023). É muito utilizado na produção de desinfetantes e contém vários efeitos desejados como fácil manuseio, baixo custo, bom perfil de segurança, possibilidade de ser usado para desinfetar rapidamente grandes áreas, além de possuir efeito bactericida e viricida frente a vários micro-organismos. Adicionalmente, é também uma substância encontrada no organismo de todos os mamíferos e é produzido por neutrófilos, eosinófilos, fagócitos mononucleares e linfócitos B em resposta a lesão e infecção (Block; Rowan, 2020).

Em relação à atividade antimicrobiana, o ácido hipocloroso possui efeito bactericida dependente da natureza dos componentes do meio, de variações no tempo de reação e exposição e também da temperatura de aplicação (Ashby et al., 2020). No entanto, os mecanismos de ação do HClO ainda não estão totalmente elucidados, mas acredita-se que seja uma combinação de fatores como: agregação de proteínas induzida por oxidação, diminuição do ATP celular e inativação de chaperonas bacterianas excretadas pelos micro-organismos em resposta ao estresse (Goemans; Collet, 2019).

Palau e colaboradores (2022) demonstraram que em células planctônicas de isolados multirresistentes de *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Candida* spp. e *Aspergillus fumigatus*, HClO apresentou efeito antimicrobiano rápido e intenso. Adicionalmente, ao avaliar a ação do ácido hipocloroso contra biofilmes que cresceram em discos de silicone, observou-se que ele foi capaz de penetrar nas camadas mais profundas do biofilme, erradicando-o completamente.

3.6.5- Protease e amilase

As enzimas são catalizadores biológicos, responsáveis por importantes papéis, podendo inclusive ser incorporadas propositalmente a alimentos como forma de inibir micro-organismos, agir como

antioxidante, melhorar propriedades físico-químicas, entre outros. As principais classes de enzimas são oxidoredutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase, e a atuação de cada uma depende de condições específicas de pH, temperatura, concentração e atividade da água. A hidrolase é considerada uma das enzimas mais importantes quanto à atuação biológica, incluindo ação em matriz de biofilmes, por possuir subclasses, como a protease e a amilase (Motta et al., 2023). A atividade antibiofilme de hidrolases pode ser decorrente da hidrólise de substratos relacionados com a adesão bacteriana, e também da capacidade de degradar a EPS (Abo-Kamer et al., 2023).

As proteases são enzimas presentes em plantas, animais e micro-organismos, capazes de hidrolisar a ligação peptídica presente na cadeia de polipeptídeos dos aminoácidos, além de apresentar alta especificidade de substrato e atividade catalítica. Essas enzimas são capazes de regular processos fisiológicos pelo controle da atividade, formação e renovação de proteínas (Razzaq et al., 2019). No entanto, já foi descrito que as proteases são capazes de contribuir para a morte bacteriana, por comprometer a integridade da parede celular, além de destruir fatores de virulência, afetando então a patogênese das bactérias (Chen et al., 2021). Proteinase K é uma serina protease ativa contra biofilmes de diferentes espécies bacterianas, como *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* (Fleming; Rumbaugh, 2017), *C. jejuni* (Melo, 2017), *A. baumannii* (Genteluci, 2020) e *K. pneumoniae* (Singh et al., 2019). Tripsina é uma serina protease pancreática atuante contra biofilmes de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, entre outros (Fleming; Rumbaugh, 2017). Aureolisina (Aur), estafoína A e B (ScpA e SspB) são proteases que apresentaram capacidade de dispersar o biofilme de *S. aureus* (Fleming; Rumbaugh, 2017).

As amilases, por sua vez, são capazes de digerir ligações glicosídicas encontradas em amido. Essas enzimas também são isoladas de diversas fontes e desempenham um importante papel no metabolismo de carboidratos. As amilases podem ser classificadas em endoamilases e exoamilases, de acordo com a forma que a ligação glicosídica é atacada. As α -amilases são importantes endoamilases,

capazes de quebrar ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna da molécula de amido, e que podem ser aplicadas em vários processos industriais como na indústria de alimentos, detergentes, têxteis e de papel, hidrolisando amido. Já as exoamilases atuam nos resíduos externos de glicose da amilose ou amilopectina e, dessa forma, produzem glicose, maltose e β -dextrina limite (El-Fallal et al., 2012). Entretanto, diferente da protease que demonstra ação antimicrobiana, estudos demonstram que a amilase pancreática é capaz de proteger *C. jejuni* de condições de estresse *in vitro*, além de promover a formação de biofilmes por essas bactérias (Jowiya et al., 2015). Já a α -amilase de *B. subtilis* parcialmente purificada degradou componentes da EPS do biofilme pré-formado de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e também apresentou efeito inibitório sobre a formação do biofilme dessas cepas (Lahiri et al., 2021). Da mesma forma α -amilase purificada de *Bacillus cereus* apresentou atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa*, reduzindo 84% do biofilme pré-formado, enquanto a enzima comercial (*Bacillus amyloliquefaciens*) reduziu 80%, respectivamente. Logo, α -amilase de *B. cereus* e *B. subtilis* é considerada como agente inibidor de biofilme passível de uso em aplicações clínicas (Abo-Kamer et al., 2023).

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Biofilmes de patógenos multirresistentes é um problema mundial responsável por altas perdas econômicas nas indústrias alimentícias, assim como infecções persistentes com tratamentos difíceis, podendo evoluir para óbito nos ambientes hospitalares. Assim, o conhecimento da composição dos biofilmes e o desenvolvimento de compostos com atividade antibiofilme direcionadas pela respectiva composição possuem grande relevância em inibir a formação e destruir o biofilme maduro desses ambientes. Portanto, a pesquisa e o desenvolvimento de produtos com ação sobre o biofilme de diferentes espécies bacterianas são constantemente requeridos diante dos efeitos danosos dessa estrutura e da dificuldade de remoção do ambiente após atingir maturação.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, Gedif Meseret. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2020, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1155/2020/1705814.
- ABO-KAMER, Amal M.; ABD-EL-SALAM, Ibrahim S.; MOSTAFA, Faten A.; MUSTAFA, Abd El Rahman A.; AL-MADBOLY, Lamiaa A. A promising microbial α -amylase production, and purification from *Bacillus cereus* and its assessment as antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* pathogen. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 22, n. 141, p. 1–27, 2023. DOI: 10.1186/s12934-023-02139-6.
- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2023**. 2023. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2023.
- ADCOX, Haley E.; VASICEK, Erin M.; DWIVEDI, Varun; HOANG, Ky V; TURNER, Joanne; GUNN, John S. *Salmonella* Extracellular Matrix Components Influence Biofilm Formation and Gallbladder Colonization. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 84, n. 11, p. 3243–3251, 2016. DOI: 10.1128/IAI.00532-16.
- AHMED, Syed A. K. Shifa.; RUDDEN, Michelle; ELIAS, Sabrina M.; SMYTH, Thomas J.; MARCHANT, Roger; BANAT, Ibrahim M.; DOOLEY, James S. G. *Pseudomonas aeruginosa* PA80 is a cystic fibrosis isolate deficient in RhlRI quorum sensing. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 5729, p. 1–15, 2021. DOI: 10.1038/S41598-021-85100-0.
- AKHAVAN-MAHDAVI, Sahar; SADEGHI, Rohollah; ESFANJANI, Afshin Faridi; HEDAYATI, Sara; SHADDEL, Rezvan; DIMA, Cristian; MALEKJANI, Narjes; BOOSTANI, Sareh; JAFARI, Seid Mahdi. Nanodelivery systems for d-limonene; techniques and applications. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 384, p. 132479, 2022. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2022.132479.
- ALBA, Sonia Fernández. **Analysis and characterization of planctonic and biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* in water systems**. 2018. Universität Heidelberg, [S. l.], 2018. DOI:

<https://doi.org/10.11588/heidok.00026348>. Disponível em: <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/26348>. Acesso em: 28 ago. 2023.

ALGAMMAL, Abdelazeem M.; MABROK, Mahmoud; SIVARAMASAMY, Elayaraja; YOUSSEF, Fatma M.; ATWA, Mona H.; EL-KHOLY, Ali W.; HETTA, Helal F.; HOZZEIN, Wael N. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and bla TEM, bla CTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 15961, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-72264-4.

ALSHRAIEDEH, Nid'a H.; KELLY, Stephen A.; THOMPSON, Thomas P.; FLYNN, Padrig B.; TUNNEY, Michael M.; GILMORE, Brendan F. Extracellular polymeric substance-mediated tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to atmospheric pressure nonthermal plasma treatment. **Plasma Processes and Polymers**, [S. l.], v. 17, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1002/ppap.202000108.

ARIAS-MOLIZ, María Teresa; FERRER-LUQUE, Carmen María; ESPIGARES-RODRÍGUEZ, Elena; LIÉBANA-UREÑA, José; ESPIGARES-GARCÍA, Miguel. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, [S. l.], v. 106, n. 2, p. e84–e89, 2008. DOI: 10.1016/j.tripleo.2008.04.002.

ARNOLD, William et al. Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging Concern. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 57, n. 20, p. 7645–7665, 2023. DOI: 10.1021/ACS.EST.2C08244.

ASAE - AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÔMICA. **Escherichia coli**. 2023a. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>. Acesso em: 9 maio. 2023.

ASAE - AUTORIDADE DE SEGURANÇA ALIMENTAR E ECONÔMICA. **Salmonella**. 2023b. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/salmonella.aspx>. Acesso em: 9 maio. 2023.

ASHBY, Louisa V.; SPRINGER, Reuben; HAMPTON, Mark B.; KETTLE, Anthony J.; WINTERBOURN, Christine C. Evaluating the bactericidal action of

hypochlorous acid in culture media. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 159, n. 1, p. 119–124, 2020. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.07.033.

AVILA-NOVOA, María Guadalupe; GONZÁLEZ-GÓMEZ, Jean Pierre; GUERRERO-MEDINA, Pedro Javier; CARDONA-LÓPEZ, Marco Antonio; IBARRA-VELAZQUEZ, Luz María; VELAZQUEZ-SUAREZ, Noemi Yolanda; MORALES-DEL RÍO, Juan Alfredo; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, Melesio. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from dairy products: Relationship of ica-dependent/independent and components of biofilms produced in vitro. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 119, p. 1–9, 2021. DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2021.105066.

AZAM, Mohd W.; KHAN, Asad U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019. DOI: 10.1016/J.DRUDIS.2018.07.003.

AZEREDO, Joana et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 313–351, 2016. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146.

AZIZ, Sahar Abdel Aleem Abdel; MAHMOUD, Rehab; MOHAMED, Manar Bahaa El Din. Control of biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy farm using Virokill silver nano-based disinfectant as an alternative approach. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 9452, p. 1–10, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-13619-x.

BALL, Ashley L.; AUGENSTEIN, Emilee D.; WIENCLAW, Trevor M.; RICHMOND, Bradley C.; FREESTONE, Courtney A.; LEWIS, Jessica M.; THOMPSON, Jared S.; PICKETT, Brett E.; BERGES, Bradford K. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms via crystal violet binding and biochemical composition assays of isolates from hospitals, raw meat, and biofilm-associated gene mutants. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 167, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1016/J.MICPATH.2022.105554.

BALZAN, Cláudia; ZIECH, Rosangela Estel; GRESSLER, Letícia Trevisan; PALMIRA, Agueda; DE VARGAS, Castagna. Bovine genital

campylobacteriosis: main features and perspectives for diagnosis and control. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1590/0103-8478cr20190272.

BLOCK, Michael S.; ROWAN, Brian G. Hypochlorous Acid: A Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 78, n. 9, p. 1461–1466, 2020. DOI: 10.1016/j.joms.2020.06.029.

BLOUNT, Zachary D. The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife**, [S. l.], v. 4, n. e05826, p. 1–12, 2015. DOI: 10.7554/ELIFE.05826.

BONTEN, Marc et al. Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 72, n. 7, p. 1211–1219, 2021. DOI: 10.1093/cid/ciaa210.

BOTELHO, L. F. **Identificação de isolados clínicos bacterianos com perfil de resistência aos agentes antimicrobianos e produtores de biofilme**. 2019. Universidade Federal de Pernambuco, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/33849/1/BOTELHO%2CLARISSA FARIAS.pdf>. Acesso em: 7 out. 2022.

CAMPOCCIA, Davide; MONTANARO, Lucio; ARCIOLA, Carla Renata. Extracellular DNA (eDNA). A major ubiquitous element of the bacterial biofilm architecture. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, p. 1–21, 2021. DOI: 10.3390/ijms22169100.

CAMPOS JÚNIOR, Salmito de Almeida; FORESTO, Renato D.; VIANA, Laila Almeida; REQUIÃO-MOURA, Lúcio Roberto; TEDESCO-SILVA JUNIOR, Helio; MEDINA-PESTANA, Jose Osmar. Infecção por *Klebsiella pneumoniae* Produtora de Carbapenemase em Receptores de Transplante Renal. **Brazilian Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 1–8, 2022. DOI: 10.53855/bjt.v25i3.436_pt.

CARRASCOSA, Conrado; RAHEEM, Dele; RAMOS, Fernando; SARAIVA, Ariana; RAPOSO, António. Microbial Biofilms in the Food Industry-A Comprehensive Review. **International Journal of Environmental Research**

and Public Health, [S. l.], v. 18, p. 1–31, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18042014.

CASON, Carolina et al. Microbial Contamination in Hospital Environment Has the Potential to Colonize Preterm Newborns' Nasal Cavities. **Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–17, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10050615.

CAVALHEIRO, Tharinne O. S.; KOZUSNY-ANDREANI, Dora I. Avaliação dos Microrganismos Viáveis Potencialmente Patogênicos em Bioaerossóis em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Contexto & Saúde**, [S. l.], v. 21, n. 43, p. 256–270, 2021. DOI: 10.21527/2176-7114.2021.43.9729.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.

Campylobacter (Campylobacteriosis): Questions and Answers. 2023a.

Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html>. Acesso em: 7 jun. 2023.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.

Salmonellosis, Nontyphoidal: CDC Yellow Book 2024. 2023b. Disponível

em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>. Acesso em: 7 jun. 2023.

CENTELEGHE, Isabella; NORVILLE, Philip; HUGHES, Louise; MAILLARD, Jean-Yves. *Klebsiella pneumoniae* survives on surfaces as a dry biofilm.

American Journal of Infection Control, [S. l.], p. 1–6, 2023. DOI: 10.1016/J.AJIC.2023.02.009.

CHADHA, Jatin; HARJAI, Kusum; CHHIBBER, Sanjay. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 2630–2656, 2021. DOI: 10.1111/1462-2920.15784.

CHAVES, Ana Paula; ZEFERINO, Rubieli Carla Frezza; OLIVEIRA, Gustavo de Pinho; ZAMBIAZI, Eliziane Tais; ENDERLE, Mirian Cristina; KEMPKA, Aniela Pinto; MORONI, Liziane Schittler. Atividade antimicrobiana do urucum, ácido fosfórico e Biomax D® contra *Listeria Monocytogenes* em salsicha. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 90084–90096, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n11-426.

CHEN, Shaorong; ZHANG, Dongmei; ROBERTS, Alexandria Jade; LU, Hsueh Chung; CANNON, Carolyn L.; QIN, Qing Ming; FIGUEIREDO, Paul De. Host protease activity on bacterial pathogens promotes complement and antibiotic-directed killing. **Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1–8, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10111506.

CHRISTEN, Verena; FALTERMANN, Susanne; BRUN, Nadja Rebecca; KUNZ, Petra Y.; FENT, Karl. Cytotoxicity and molecular effects of biocidal disinfectants (quaternary ammonia, glutaraldehyde, poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride PHMB) and their mixtures in vitro and in zebrafish eleuthero-embryos. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 586, p. 1204–1218, 2017. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2017.02.114.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How the bacteria stick. **Scientific American**, [S. l.], v. 238, n. 1, p. 86–95, 1978.

CRAFT, Kelly M.; NGUYEN, Johny M.; BERG, Lawrence J.; TOWNSEND, Steven D. Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **MedChemComm**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019. DOI: 10.1039/c9md00044e.

CRAMER, Nina; KLOCKGETHER, Jens; TÜMMMLER, Burkhard. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the airways of people with cystic fibrosis. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 83, n. 102328, p. 1–8, 2023. DOI: 10.1016/J.COI.2023.102328.

DAOOD, Umer; MATINLINNA, Jukka P.; RAO PICHKA, Malikarjuna; MAK, Kit-Kay; NAGENDRABABU, Venkateshbabu; FAWZY, Amr S. A quaternary ammonium silane antimicrobial triggers bacterial membrane and biofilm destruction. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-67616-z.

DAROLD, Gabriela Molinari; BARROS, Isabelle Cristina; SILVA, Glaucenyra Cecília Pinheiro Da; TRETTENE, Lorraine Gabriela; KEMPER, Daniella Aparecida Godoi; LUNARDI, Michele. Campilobacterioses em Cães e Gatos: Revisão de Literatura. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 275–288, 2021. DOI: 10.17921/1415-

6938.2021v25n3p275-288.

DÉGI, János; MOȚCO, Oana Alexandra; DÉGI, Diana Maria; SUICI, Tiana; MAREȘ, Mihai; IMRE, Kalman; CRISTINA, Romeo Teodor. Antibiotic susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa* canine isolates from a multicentric study in Romania. **Antibiotics**, [S. l.], v. 10, n. 846, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10070846.

DESAI, Siddhi; SANGHRAJKA, Kinjal; GAJJAR, Devarshi. High Adhesion and Increased Cell Death Contribute to Strong Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, [S. l.], v. 8, n. 277, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3390/pathogens8040277.

DINGES, Martin M.; ORWIN, Paul M.; SCHLIEVERT, Patrick M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 16–34, 2000. DOI: 10.1128/CMR.13.1.16-34.2000.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 1–273, 2022. DOI: 10.2903/J.EFSA.2022.7666. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2022.7666?src=getfr>. Acesso em: 15 maio. 2023.

EL-FALLAL, Amira; DOBARA, Mohammed Abou; EL-SAYED, Ahmed; OMAR, Noha. Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. In: **Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. [s.l.] : IntechOpen, 2012. p. 459–488. DOI: 10.5772/51571.

EL-SAADONY, Mohamed T. et al. Avian Campylobacteriosis, Prevalence, Sources, Hazards, Antibiotic Resistance, Poultry Meat Contamination and Control Measures: A Comprehensive Review. **Poultry Science**, [S. l.], v. 102, n. 9, p. 1–30, 2023. DOI: 10.1016/J.PSJ.2023.102786.

EL-SHAER, Soha; ABDEL-RHMAN, Shaymaa H.; BARWA, Rasha; HASSAN, Ramadan. Genetic characterization of extended-spectrum β -Lactamase- And carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from Egyptian hospitals

and environments. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 1–21, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0255219.

EZE, Emmanuel C.; CHENIA, Hafizah Y.; EL ZOWALATY, Mohamed E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and Drug Resistance**, [S. l.], v. 11, p. 2277–2299, 2018. DOI: 10.2147/IDR.S169894.

FLEMING, Derek; RUMBAUGH, Kendra P. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. **Microorganisms**, [S. l.], v. 5, n. 15, p. 1–16, 2017. DOI: 10.3390/microorganisms5020015.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost; SZEWZYK, Ulrich; STEINBERG, Peter; RICE, Scott A.; KJELLEBERG, Staffan. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.

FLINT, Steve; BREMER, Phil; BROOKS, John; PALMER, Jon; SADIQ, Faizan Ahmed; SEALE, Brent; TEH, Koon Hoong; WU, Shuyan; MD ZAIN, Siti Norbaizura. Bacterial fouling in dairy processing. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 101, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104593.

GAMBINO, Edvige; MAIONE, Angela; GUIDA, Marco; ALBARANO, Luisa; CARRATURO, Federica; GALDIERO, Emilia; ONOFRIO, Valeria Di. Evaluation of the Pathogenic-Mixed Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus* and Treatment with Limonene on Three Different Materials by a Dynamic Model. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 1–12, 2022. DOI: 10.3390/ijerph19063741.

GEDEFIE, Alemu; DEMSIS, Wondmagegn; ASHAGRIE, Melaku; KASSA, Yeshimebet; TESFAYE, Melkam; TILAHUN, Mihret; BISETEGN, Habtye;

SAHLE, Zenawork. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. **Infection and Drug Resistance**, [S. l.], v. 14, p. 3711–3719, 2021. DOI: 10.2147/IDR.S332051.

GENTELUCI, Gabrielle Limeira. **RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE *Acinetobacter baumannii***. 2020. Fundação Oswaldo Cruz, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/47231>. Acesso em: 28 jul. 2023.

GIAOURIS, Efstathios et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 841, p. 1–26, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00841.

GIAOURIS, Efstathios; SIMOES, Manuel; DUBOIS-BRISSENET, Florence. The Role of Biofilms in the Development and Dissemination of Microbial Resistance within the Food Industry. **Foods**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–5, 2020. DOI: 10.3390/FOODS9060816.

GOEMANS, Camille V; COLLET, Jean-François. Stress-induced chaperones: a first line of defense against the powerful oxidant hypochlorous acid. **F1000Research**, [S. l.], v. 8, n. F1000 Faculty Rev, p. 1–9, 2019. DOI: 10.12688/f1000research.19517.1.

GÓMEZ, Natacha C.; RAMIRO, Juan M. P.; QUECAN, Beatriz X. V.; FRANCO, Bernadette D. G. de Melo. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 863, p. 1–15, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00863.

GRAF, Alexander C. et al. Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1036–1053, 2019. DOI: 10.1074/MCP.RA118.001120.

GRUNERT, Tom; STESSL, Beatrix; WOLF, Franz; SORDELLI, Daniel O.; BUZZOLA, Fernanda R.; EHLING-SCHULZ, Monika. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine

intramammary infections. **Scientific Reports**, [S. I.], v. 8, n. 15968, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-34371-1.

GUERRA, Juliana Mariotti et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* as unexpected cause of fatal outbreak in captive marmosets, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. I.], v. 26, n. 12, p. 3039–3043, 2020. DOI: 10.3201/eid2612.191562.

GUO, Jing; YUAN, Shaojun; JIANG, Wei; LV, Li; LIANG, Bin; PEHKONEN, Simo O. Polymers for Combating Biocorrosion. **Frontiers in Materials**, [S. I.], v. 5, n. 10, p. 1–15, 2018. DOI: 10.3389/fmats.2018.00010.

GUO, Na; BAI, Xue; SHEN, Yong; ZHANG, Tiehua. Target-based screening for natural products against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. I.], v. 63, n. 14, p. 2216–2230, 2023. DOI: 10.1080/10408398.2021.1972280.

GUPTA, Akshi; JEYAKUMAR, Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, [S. I.], v. 11, n. 1, p. 13816, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-92843-3.

HAN, Yingjie; SUN, Zhichang; CHEN, Wenxue. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. **Molecules**, [S. I.], v. 25, n. 1, p. 33, 2020. DOI: 10.3390/molecules25010033.

HEMATI, Sara et al. Simultaneous monitoring of SARS-CoV-2, bacteria, and fungi in indoor air of hospital: a study on Hajar Hospital in Shahrekord, Iran. **Environmental Science and Pollution Research International**, [S. I.], v. 28, n. 32, p. 43792–43802, 2021. DOI: 10.1007/S11356-021-13628-9.

HEMEG, Hassan A. Determination of phylogenetic relationships among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from infected humans and Companion Animals. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. I.], v. 28, n. 4, p. 2098–2101, 2021. DOI: 10.1016/J.SJBS.2021.01.017.

IBRAHIM, Susan; AL-SARYI, Nadal; AL-KADMY, Israa M. S.; AZIZ, Sarah Naji. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in

hospitals. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 48, n. 10, p. 6987–6998, 2021. DOI: 10.1007/s11033-021-06690-6.

JAMAL, Muhsin et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [S. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

JIANG, Qian; CHEN, Jiashun; YANG, Chengbo; YIN, Yulong; YAO, Kang. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2019, n. 2015978, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1155/2019/2015978.

JOWIYA, Waheed et al. Pancreatic Amylase Is an Environmental Signal for Regulation of Biofilm Formation and Host Interaction in *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 83, n. 12, p. 4884–4895, 2015. DOI: 10.1128/IAI.01064-15.

KAMARUZZAMAN, Nor Fadhilah; TAN, Li Peng; YAZID, Khairun Anisa Mat; SAEED, Shamsaldeen Ibrahim; HAMDAN, Ruhil Hayati; CHOONG, Siew Shean; WONG, Weng Kin; CHIVU, Alexandru; GIBSON, Amanda Jane. Targeting the Bacterial Protective Armour; Challenges and Novel Strategies in the Treatment of Microbial Biofilm. **Materials**, [S. l.], v. 11, n. 1705, p. 1–27, 2018. DOI: 10.3390/ma11091705.

KHATAMI, Seyyed Hossein et al. Aptamer-based biosensors for *Pseudomonas aeruginosa* detection. **Molecular and Cellular Probes**, [S. l.], v. 66, n. 101865, p. 1–9, 2022. DOI: 10.1016/J.MCP.2022.101865.

KHAZAAL, Saba Saadoon; AL-SARYI, Nadal; IBRAHIM, Susan A. Immunomodulation by *Acinetobacter baumannii* of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia. **Meta Gene**, [S. l.], v. 24, n. 100672, p. 1–5, 2020. DOI: 10.1016/J.MGENE.2020.100672.

KICH, Jalusa Deon; MENEGUZZI, Mariana; REICHEN, Caroline. **O aumento da frequência de *Salmonella* clínica no Brasil**. 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/168430/1/final8740.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2023.

KOBAYASHI, Tatsuya; IKEDA, Mahoko; OKADA, Yuta; HIGURASHI, Yoshimi; OKUGAWA, Shu; MORIYA, Kyoji. Clinical and Microbiological Characteristics of Recurrent *Escherichia coli* Bacteremia. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1128/Spectrum.01399-21.

LAHIRI, Dibyajit; NAG, Moupriya; SARKAR, Tanmay; DUTTA, Bandita; RAY, Rina Rani. Antibiofilm Activity of α -Amylase from *Bacillus subtilis* and Prediction of the Optimized Conditions for Biofilm Removal by Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Network (ANN). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 193, n. 6, p. 1853–1872, 2021. DOI: 10.1007/S12010-021-03509-9.

LÉCUYER, Frédéric; BOURASSA, Jean-Sébastien; GÉLINAS, Martin; CHARRON-LAMOUREUX, Vincent; BURRUS, Vincent; BEAUREGARD, Pascale B. Biofilm Formation Drives Transfer of the Conjugative Element ICE Bs1 in *Bacillus subtilis*. **mSphere**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1128/MSPHERE.00473-18.

LEMOS, A. S. O. et al. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Psychorubrin, a Pyranonaphthoquinone Isolated From *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 724, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00724.

LIENEN, Tobias; SCHNITT, Arne; CUNY, Christiane; MAURISCHAT, Sven; TENHAGEN, Bernd Alois. Phylogenetic tracking of LA-MRSA ST398 intra-farm transmission among animals, humans and the environment on german dairy farms. **Microorganisms**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9061119.

LINZ, Bodo; MUKHTAR, Nadia; SHABBIR, Muhammad Zubair; RIVERA, Israel; IVANOV, Yury V.; TAHIR, Zarfshan; YAQUB, Tahir; HARVILL, Eric T. Virulent Epidemic Pneumonia in Sheep Caused by the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 2616, p. 1–10, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02616.

LIU, Zi Han; WU, Qi Ying; XU, Feng; ZHANG, Xian; LIAO, Xiao Bo. Biofunction and clinical potential of extracellular vesicles from methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 266, n. 127238, 2023. DOI: 10.1016/J.MICRES.2022.127238.

MA, Luyao; FENG, Jinsong; ZHANG, Jingbin; LU, Xiaonan. Campylobacter biofilms. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 264, n. 127149, p. 1–12, 2022. DOI: 10.1016/J.MICRES.2022.127149.

MALEKI, Ramin; NAZARI, Sepideh. Investigation of type and density of bacterial bioaerosols in the air of Imam Hossein hospital in Tehran in 2018. **Journal of Air Pollution and Health**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 61–68, 2022. DOI: 10.18502/japh.v7i1.8920.

MALISHEV, Ravit; SALINAS, Nir; GIBSON, James; LANDAU, Meytal; BITAN, Gal; JELINEK, Raz. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm-forming functional amyloid by molecular tweezers. **Cell Chemical Biology**, [S. l.], v. 28, n. 9, p. 1310–1320, 2021. DOI: 10.1016/J.CHEMBIOL.2021.03.013.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA**. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/anuario-dipoa-v4/view>. Acesso em: 14 maio. 2023.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **SALMONELAS**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>. Acesso em: 7 jun. 2023.

MASOOD, Asad; AHMED, Naeem; WEE, M. F. Mohd Razip; PATRA, Anuttam; MAHMOUDI, Ebrahim; SLOW, Kim S. Atmospheric Pressure Plasma Polymerisation of D-Limonene and Its Antimicrobial Activity. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 307, 2023. DOI: 10.3390/POLYM15020307.

MELO, Roberta Torres De. **EMERGÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* NO SETOR AVÍCOLA E NA SAÚDE PÚBLICA DO BRASIL**. 2017. Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/21282/1/EmergênciaCampylobac>

terJejuni.pdf. Acesso em: 20 jun. 2023.

MENOITA, Elsa; SANTOS, Vítor; TESTAS, Carlos; GOMES, Cláudia; SANTOS, Ana Sofia. BIOFILMS: KNOWING THE ENTITY. **Journal of Aging and Innovation**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 23–32, 2012. Disponível em: <https://www.journalofagingandinnovation.org/wp-content/uploads/3-Biofilmes-conhecer-a-Entidade.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2022.

MICHAELIS, Claudia; GROHMANN, Elisabeth. Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. **Antibiotics**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 328, 2023. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS12020328.

MOHAMED, Hams M. A.; ALNASSER, Sulaiman Mohammed; ABD-ELHAFEZ, Hanan H.; ALOTAIBI, Meshal; BATIHA, Gaber El Saber; YOUNIS, Waleed. Detection of β -Lactamase Resistance and Biofilm Genes in *Pseudomonas* Species Isolated from Chickens. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 1975, p. 1–19, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10101975.

MOHAPATRA, Sanjeeb; YUTAO, Lin; GOH, Shin Giek; NG, Charmaine; LUHUA, You; TRAN, Ngoc Han; GIN, Karina Yew Hoong. Quaternary ammonium compounds of emerging concern: Classification, occurrence, fate, toxicity and antimicrobial resistance. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 445, p. 130393, 2023. DOI: 10.1016/J.JHAZMAT.2022.130393.

MOLOSSI, Francieli Adriane et al. Epidemiological and pathological aspects of salmonellosis in cattle in southern Brazil. **Ciencia Rural**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200459.

MOTTA, Jean Paul; WALLACE, John L.; BURET, André G.; DERAISON, Céline; VERGNOLLE, Nathalie. Gastrointestinal biofilms in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 314–334, 2021. DOI: 10.1038/s41575-020-00397-y.

MOTTA, Joyce Fagundes Gomes; FREITAS, Bárbara Catarina Bastos De; ALMEIDA, Alex Fernando De; MARTINS, Glêndara Aparecida de Souza; BORGES, Soraia Vilela. Use of enzymes in the food industry: a review. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 43, p. 1–14, 2023. DOI:

10.1590/FST.106222.

MUHAMMAD, Musa Hassan; IDRIS, Aisha Lawan; FAN, Xiao; GUO, Yachong; YU, Yiyan; JIN, Xu; QIU, Junzhi; GUAN, Xiong; HUANG, Tianpei. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. 928, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00928.

MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [S. l.], v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
PubChem Compound Summary for CID 24341, Hypochlorous Acid. 2023.
Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hypochlorous-Acid>.
Acesso em: 8 jun. 2023.

NGUYEN, Minh Thu; LUQMAN, Arif; BITSCHAR, Katharina; HERTLEIN, Tobias; DICK, Johannes; OHLSEN, Knut; BRÖKER, Barbara; SCHITTEK, Birgit; GÖTZ, Friedrich. Staphylococcal (phospho)lipases promote biofilm formation and host cell invasion. **International Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 308, n. 6, p. 653–663, 2018. DOI: 10.1016/J.IJMM.2017.11.013.

NIE, Dan; HU, Yue; CHEN, Zhou; LI, Mingkai; HOU, Zheng; LUO, Xiaoxing; MAO, Xinggang; XUE, Xiaoyan. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 27, n. 26, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1186/s12929-020-0617-7.

NOBREGA, Diego Borin; CALARGA, Aline Parolin; NASCIMENTO, Leandro Costa; VASCONCELOS, Carla Gasparotto Chande; LIMA, Eliane Martins De; LANGONI, Helio; BROCCCHI, Marcelo. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 7210–7224, 2021. DOI: 10.3168/JDS.2020-19569.

NOUHA, Klai; KUMAR, Ram Saurabh; BALASUBRAMANIAN, Sellamuthu; TYAGI, Rajeshwar Dayal. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. **Journal of Environmental Sciences**, [S. l.], v. 66, p. 225–245, 2018. DOI: 10.1016/J.JES.2017.05.020.

OLIVEIRA, Diana; BORGES, Anabela; SIMÕES, Manuel. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1–19, 2018. DOI: 10.3390/toxins10060252.

PALAU, Marta et al. In Vitro and In Vivo Antimicrobial Activity of Hypochlorous Acid against Drug-Resistant and Biofilm-Producing Strains. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–14, 2022. DOI: 10.1128/SPECTRUM.02365-22.

PANDIT, A.; ADHOLEYA, A.; CAHILL, D.; BRAU, L.; KOCHAR, M. Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 199–211, 2020. DOI: 10.1111/JAM.14609.

PENG, Pai; BALDRY, Mara; GLESS, Bengt H.; BOJER, Martin S.; ESPINOSA-GONGORA, Carmen; BAIG, Sharmin J.; ANDERSEN, Paal S.; OLSEN, Christian A.; INGMER, Hanne. Effect of Co-inhabiting Coagulase Negative Staphylococci on *S. aureus* agr Quorum Sensing, Host Factor Binding, and Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 2212, p. 1–14, 2019. DOI: 10.3389/FMICB.2019.02212.

PERTEGAL, Víctor; LACASA, Engracia; CAÑIZARES, Pablo; RODRIGO, Manuel A.; SÁEZ, Cristina. Understanding the influence of the bioaerosol source on the distribution of airborne bacteria in hospital indoor air. **Environmental Research**, [S. l.], v. 216, n. 1, p. 1–8, 2023. DOI: 10.1016/J.ENVRES.2022.114458.

POIREL, Laurent; MADEC, Jean-Yves; LUPO, Agnese; SCHINK, Anne-Kathrin; KIEFFER, Nicolas; NORDMANN, Patrice; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 1–27, 2018. DOI: 10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0026-2017/FORMAT/EPUB.

POMPILIO, Arianna; SCRIBANO, Daniela; SARSHAR, Meysam; DI BONAVENTURA, Giovanni; PALAMARA, Anna Teresa; AMBROSI, Cecilia. Gram-Negative Bacteria Holding Together in a Biofilm: The *Acinetobacter baumannii* Way. **Microorganisms**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 1–33, 2021. DOI: 10.3390/MICROORGANISMS9071353.

PRADO, Maíra; SILVA, Emmanuel J. N. L. Da; DUQUE, Thais M.; ZAIA, Alexandre A.; FERRAZ, Caio C. R.; ALMEIDA, José F. A. De; GOMES, Brenda P. F. de A. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. **Journal of Applied Oral Science**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 158–163, 2015. DOI: 10.1590/1678-775720130691.

PREDA, Veronica Georgiana; SĂNDULESCU, Oana. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. **Discoveries**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. e10, 2019. DOI: 10.15190/D.2019.13.

PULAMI, Dipen; KÄMPFER, Peter; GLAESER, Stefanie P. High diversity of the emerging pathogen *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in raw manure, biogas plants digestates, and rural and urban wastewater treatment plants with system specific antimicrobial resistance profiles. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 859, n. 1, p. 1–19, 2023. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2022.160182.

QIN, Shugang; XIAO, Wen; ZHOU, Chuanmin; PU, Qinqin; DENG, Xin; LAN, Lefu; LIANG, Haihua; SONG, Xiangrong; WU, Min. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 7, n. 199, p. 1–27, 2022. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1.

RAO, Sangeeta; LINKE, Lyndsey; MAGNUSON, Roberta; JAUCH, Linzy; HYATT, Doreene R. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* collected from livestock, poultry and humans. **One Health**, [S. l.], v. 15, n. 100407, p. 1–7, 2022. DOI: 10.1016/J.ONEHLT.2022.100407.

RATHER, Muzamil A.; GUPTA, Kuldeep; BARDHAN, Pritam; BORAH, Munmi;

SARKAR, Anupama; ELDIEHY, Khalifa S. H.; BHUYAN, Shuvam; MANDAL, Manabendra. Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of Basic Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 380–395, 2021. DOI: 10.1002/JOBM.202000678.

RAZZAQ, Abdul; SHAMSI, Sadia; ALI, Arfan; ALI, Qurban; SAJJAD, Muhammad; MALIK, Arif; ASHRAF, Muhammad. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. 110, p. 1–20, 2019. DOI: 10.3389/FBIOE.2019.00110.

RENDUELES, Olaya; GHIGO, Jean-Marc. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 972–989, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.

ROBERTSON, Sara R.; MCLEAN, Robert J. C. Beneficial biofilms. **AIMS Bioengineering**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 437–448, 2015. DOI: 10.3934/bioeng.2015.4.437.

RODRIGUES, Carla S.; ARMENDARIS, Paulo M.; CORDEIRO DE SÁ, Claudia V. G.; HADDAD, João Paulo A.; MELO, Cristiano B. De. Prevalence of *Campylobacter* spp. in Chicken Carcasses in Slaughterhouses from South of Brazil. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 78, p. 2242–2250, 2021. DOI: 10.1007/s00284-021-02478-w.

ROSA, Taciéli F.; FOLETTO, Vitória S.; SERAFIN, Marissa B.; BOTTEGA, Angelita; HORNER, Rosmari. Estratégias emergentes para tratamento de ESKAPE. **Revista Saúde**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.5902/2236583443061.

ROSSI, D. A.; MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P. **Biofilms of Salmonella and Campylobacter in the poultry industry**. 2017. DOI: 10.5772/65254. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/52216>.

ROY, Subhasree; CHOWDHURY, Goutam; MUKHOPADHYAY, Asish K.; DUTTA, Shanta; BASU, Sulagna. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. **Frontiers in Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 793615, p. 1–32, 2022. DOI:

10.3389/fmed.2022.793615.

RUHAL, Rohit; KATARIA, Rashmi. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 251, n. 126829, p. 1–8, 2021. DOI: 10.1016/J.MICRES.2021.126829.

RUKAMBILE, Elpidius; SINTCHENKO, Vitali; MUSCATELLO, Gary; KOCK, Richard; ALDERS, Robyn. Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. **Zoonoses and Public Health**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 562–578, 2019. DOI: 10.1111/ZPH.12611.

RYBTKE, Morten; JENSEN, Peter Ø.; NIELSEN, Claus H.; TOLKER-NIELSEN, Tim. The Extracellular Polysaccharide Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Is a Determinant of Polymorphonuclear Leukocyte Responses. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 1–15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00631-20>.

SANTOS, Eliege J. E.; LOPES, Amanda T. S.; MACIEL, Bianca M. *Salmonella* in Wild Animals: A Public Health Concern. In: **Enterobacteria**. IntechOpen: IntechOpen, 2022. p. 136. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.102618. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/80459>. Acesso em: 7 jun. 2023.

SAVERINA, Evgeniya A.; FROLOV, Nikita A.; KAMANINA, Olga A.; ARLYAPOV, Vyacheslav A.; VERESHCHAGIN, Anatoly N.; ANANIKOV, Valentine P. From Antibacterial to Antibiofilm Targeting: An Emerging Paradigm Shift in the Development of Quaternary Ammonium Compounds (QACs). **ACS Infectious Diseases**, [S. l.], v. 9, p. 394–422, 2023. DOI: 10.1021/acsinfecdis.2c00469.

SHARAH, Javad Yasbolaghi; AZIMI, Taher; SHARIATI, Aref; SAFARI, Hossein; TEHRANI, Melika Khanzadeh; HASHEMI, Ali. Advanced strategies for combating bacterial biofilms. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 234, p. 14689–14708, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28225.

SINGH, Ashish Kumar et al. Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation

of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content.

Frontiers in Microbiology, [S. l.], v. 10, n. 669, p. 1–23, 2019. DOI: 10.3389/FMICB.2019.00669.

SOLIS-VELAZQUEZ, Oscar Alberto; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, Melesio; GUERREO-MEDINA, Pedro Javier; ROSAS-GARCÍA, María de Lourdes; IÑIGUEZ-MORENO, Maricarmen; AVILA-NOVOA, María Guadalupe. Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, [S. l.], v. 54, p. 1038–1047, 2021. DOI: 10.1016/J.JMII.2020.07.002.

SONG, Jooyoung; KONG, Hyeyoung; JANG, Jyongsik. Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 651–656, 2011. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2010.10.027.

SOUZA, B. G.; SCHAUN, D. N.; RIBEIRO, E. H.; BICCA, F. V.; CHIUCHETTA, F. S.; THUROW, M. R. B.; SAVIAN, M. B.; MILLER, R. G.; GIELOW, S. **Indicadores Hospitalares: Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sul/he-ufpel/aceso-a-informacao/indicadores-hospitalares/2022-2/relatorio-julho.pdf/view>. Acesso em: 7 out. 2022.

SPAGNOLO, Anna Maria; SARTINI, Marina; CRISTINA, Maria Luisa. *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. **Reviews in Medical Microbiology**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 169–175, 2021. DOI: 10.1097/mrm.0000000000000271.

SPAINHOUR, C. B. Phosphoric Acid. In: **Encyclopedia of Toxicology**. [s.l.] : Elsevier, 2014. v. 3p. 916–919. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00904-0.

STALLBAUM, Letícia Roloff; PRUSKI, Beatriz Bohns; AMARAL, Suelen Cavalheiro; DE FREITAS, Stella Buchhorn; WOZEAK, Daniela Rodriguero; HARTWIG, Daiane Drawanz. Phenotypic and molecular evaluation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) isolates obtained from a hospital of Pelotas, RS, Brazil. **Journal of medical microbiology**, [S. l.],

v. 70, n. 11, 2021. DOI: 10.1099/JMM.0.001451.

STEVENS, Mark P.; KINGSLEY, Robert A. Salmonella pathogenesis and host-adaptation in farmed animals. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 63, p. 52–58, 2021. DOI: 10.1016/J.MIB.2021.05.013.

THI, Minh Tam Tran; WIBOWO, David; REHM, Bernd H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 22, p. 1–25, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228671.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

TRENTIN, Danielle da Silva; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, [S. l.], v. 14, n. 22, p. 113–238, 2013. Disponível em: <https://revista.liberato.com.br/index.php/revista/article/view/229>. Acesso em: 28 ago. 2023.

TURHAN, Emel Unal; ERGINKAYA, Zerrin; KORUKLUOGLU, Mihriban; KONURAY, Gozde. Beneficial Biofilm Applications in Food and Agricultural Industry Emel. **Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies**, [S. l.], p. 445–469, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-24903-8_15.

TURNER, Nicholas A.; SHARMA-KUINKEL, Batu K.; MASKARINEC, Stacey A.; EICHENBERGER, Emily M.; SHAH, Pratik P.; CARUGATI, Manuela; HOLLAND, Thomas L.; FOWLER, Vance G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0147-4.

TURSI, Sarah A.; TÜKEL, Çagla. Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition, Immune Recognition, and Disease Implications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. e00028-18, 2018. DOI: 10.1128/MMBR.00028-18.

VALLE, Jaione; FANG, Xianyang; LASA, Iñigo. Revisiting Bap Multidomain

Protein: More Than Sticking Bacteria Together. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. 613581, p. 1–9, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.613581.

VAN DER KOLK, J. H.; ENDIMIANI, A.; GRAUBNER, C.; GERBER, V.; PERRETEN, V. *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 16, p. 59–71, 2019. DOI: 10.1016/J.JGAR.2018.08.011.

VANECCI-SILVA, Daiane; ASSANE, Inácio Mateus; ALVES, Lindomar de Oliveira; GOMES, Fernando Cardoso; MORO, Evandro Bilha; KOTZENT, Suzana; PITONDO-SILVA, André; PILARSKI, Fabiana. *Klebsiella pneumoniae* causing mass mortality in juvenile Nile tilapia in Brazil: Isolation, characterization, pathogenicity and phylogenetic relationship with other environmental and pathogenic strains from livestock and human sources. **Aquaculture**, [S. l.], v. 546, p. 1–7, 2022. DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737376.

WANG, Guoying; ZHAO, Guo; CHAO, Xiaoyu; XIE, Longxiang; WANG, Hongju. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 17, n. 6278, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17176278.

WARETH, Gamal; NEUBAUER, Heinrich. The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 52, n. 16, p. 1–14, 2021. DOI: 10.1186/s13567-020-00875-w.

WARMATE, Dein; ONARINDE, Bukola A. Food safety incidents in the red meat industry: A review of foodborne disease outbreaks linked to the consumption of red meat and its products, 1991 to 2021. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 398, n. 110240, p. 1–16, 2023. DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110240.

WEST, Korbin H. J.; GAHAN, Curran G.; KIERSKI, Patricia R.; CALDERON, Diego F.; ZHAO, Ke; CZUPRYNSKI, Charles J.; MCANULTY, Jonathan F.; LYNN, David M.; BLACKWELL, Helen E. Sustained Release of a Synthetic

Autoinducing Peptide Mimetic Blocks Bacterial Communication and Virulence In Vivo. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 61, n. e202201798, p. 1–9, 2022. DOI: 10.1002/ANIE.202201798.

WICKRAMASINGHE, Nirmani N.; HLAING, Mya M.; RAVENSDALE, Joshua T.; COOREY, Ranil; CHANDRY, P. Scott; DYKES, Gary A. Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 16457, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-73612-0.

WOO, Jung Ha; GUK, Jae Ho; YI, Saehah; LEE, Junbum; SONG, Hyekeun; KIM, Woo Hyun; CHO, Seongbeom. Effect of biofilm formation by antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in cold storage on survival in dairy processing lines. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 386, n. 110019, p. 1–9, 2023. DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.110019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development**. Geneva: World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>. Acesso em: 26 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2022 : Monitoring health of the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <http://apps.who.int/bookorders>. Acesso em: 10 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Foodborne diseases**. 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2. Acesso em: 10 maio. 2023.

YONEMOTO, Keigo; CHIBA, Akio; SUGIMOTO, Shinya; SATO, Chikara; SAITO, Mitsuru; KINJO, Yuki; MARUMO, Keishi; MIZUNOE, Yoshimitsu. Redundant and Distinct Roles of Secreted Protein Eap and Cell Wall-Anchored Protein SasG in Biofilm Formation and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1128/IAI.00894-18/FORMAT/EPUB.

ZHANG, Shuxin et al. In-sewer decay and partitioning of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and implications for their wastewater surveillance.

Water Research, [S. l.], v. 233, p. 1–9, 2023. DOI:

10.1016/J.WATRES.2023.119737.

ZHU, Qiongfang; XU, Jie; CHEN, Xu; REN, Yalu; ZHAO, Lina. Risk Factors and Molecular Epidemiology of Bloodstream Infections Due to Carbapenem-

Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious**

Disease, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 1–23, 2023. DOI:

10.1016/J.DIAGMICROBIO.2023.115955.

ZIMMERLI, Werner; SENDI, Parham. Orthopaedic biofilm infections. **Journal of**

Pathology, Microbiology and Immunology, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 353–364,

2017. DOI: 10.1111/APM.12687.

ZOBELL, Claude E. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity.

Journal of Bacteriology, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 39–56, 1943. DOI:

10.1128/jb.46.1.39-56.1943.

CAPÍTULO II

Efeito de agentes químicos específicos otimizados sobre a matriz extracelular de biofilmes bacterianos

Artigo a ser publicado no periódico

Food Control

FI: 6, Qualis: A1

Normas para publicação:

<https://www.elsevier.com/journals/food-control/0956-7135/guide-for-authors>

(Anexo I)

Efeito de agentes químicos específicos otimizados sobre a matriz extracelular de biofilmes bacterianos

Jéssica Laura Miranda Peixoto^{1*}; Rosanne Aparecida Capanema Ribeiro¹; Gabriella Rayane Aparecida Ferreira¹; Belchiolina Beatriz Fonseca²; Roberta Torres de Melo¹; Daise Aparecida Rossi¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

*Autor-correspondente: jessicalmpeixoto@hotmail.com

Resumo

Controlar a presença de biofilmes associados a patógenos de importância em saúde única requer o entendimento acerca da sua ultraestrutura e da maneira de atuação de diferentes agentes sanitizantes. Nossa abordagem incluiu avaliar a organização tridimensional e a composição das matrizes de biofilmes de oito espécies bacterianas multirresistentes isoladas de ambientes hospitalares e da indústria alimentícia e três cepas de referência, além de determinar o efeito de produtos químicos inovadores na inibição da formação de biofilmes e na degradação da matriz extracelular. A Microscopia Eletrônica de Varredura determinou a ultraestrutura dos biofilmes e a Microscopia de fluorescência forneceu o parâmetro qualitativo de caracterização das frações proteicas e de carboidratos da matriz extracelular. O método enzimático foi utilizado na determinação das frações de carboidratos, ácido desoxirribonucleico extracelular (DNAe) e proteínas da matriz. A fração de maior teor na biomassa das cepas alternou-se entre proteína e carboidratos. Maiores teores percentuais de carboidratos foram identificados em *Salmonella* Enteritidis (SE), *Pseudomonas aeruginosa* (PAO) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de *carbapenemase* (KPC), com valores de 61,5%, 50,5% e 48,3%, respectivamente. A biomassa de maior teor de DNAe foi encontrada em SE (57,3%), enquanto o maior teor de proteína foi observado em *Salmonella* Choleraesuis (SC) (77,1%). Foram desenvolvidos e testados quatro produtos: P1- Start Solvquat, P2- Start Tensoacid, P3- Start Tensoenzim e P4- Ácido Hipocloroso. De forma geral os produtos foram mais eficazes em inibir a formação do que degradar o biofilme maduro. P4 apresentou a maior porcentagem de inibição da formação do biofilme de todas as cepas, com a maior taxa em PAO (93,7%), *Campylobacter jejuni* (CJ) (89,6%), *E. coli* APEC (APEC) (89,3%) e SE (89,2%). P2 apresentou maiores taxas em PAO, KPC e *C. jejuni*, sendo 90%, 78,3% e 60%, respectivamente. P1 inibiu principalmente *E. coli* ATCC 25922 (EC), APEC, SC e *Acinetobacter baumannii* (AB) em 79,8%, 76,6%, 74% e 72,3%, respectivamente, e P3 inibiu EC, MRSA, SC e CJ, em 71%, 67,6%, 67% e 65,5%, respectivamente. A capacidade de degradar o biofilme maduro foi cepa dependente. P1 demonstrou ação em biofilmes de sete cepas em porcentagens 3,9 a 50,5%, com o maior percentual verificado em *S. aureus* ATCC 25923 (SA) e P2 em seis cepas em porcentagens 5 a 46%, sendo a maior taxa em PAO. P3 demonstrou ação em biofilmes de seis cepas em porcentagens 37,8 a 81%, com a maior taxa em SA (81%), e P4 em sete cepas em porcentagens 4,6 a 70%, com a maior taxa verificada em KPC. Conclui-se que independente dos perfis de composição da matriz a ação dos produtos foi cepa dependente.

Palavras-chave: biomassa; inibição, contaminação; multirresistência; saúde única

1- Introdução

As doenças provocadas por infecções bacterianas resistentes causam graves prejuízos econômicos e representam uma das principais ameaças à saúde humana em todo o mundo, provocando cerca de 700.000 mortes a cada ano, podendo atingir cerca de 10 milhões até 2050, tornando-se assim mais fatal que o câncer (O'Neill, 2016). Adicionalmente, o número de cepas bacterianas patogênicas resistentes a diferentes tipos de antibióticos e sanitizantes vem crescendo e já se tornou um problema mundial, uma vez que se trata de um fenômeno natural e está relacionado ao caráter evolutivo intrínseco e de adaptabilidade dos micro-organismos (González-Bello, 2017).

Um dos mecanismos de resistência bacteriana é a formação de biofilmes, que são microcomunidades organizadas, onde há a formação de uma matriz extracelular, composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Essa matriz atua como uma barreira de proteção para a bactéria, interferindo na resposta imune do hospedeiro ou à presença de substâncias capazes de destruí-la ou inibir seu desenvolvimento. Desse modo, as bactérias planctônicas são de 10 a 1.000 vezes mais susceptíveis à antimicrobianos que àquelas em biofilmes (Birk et al., 2021).

Como agravante, ainda há o fato de que os biofilmes são capazes de se desenvolver em diferentes superfícies bióticas e abióticas, podendo ser encontrados em ambientes alimentares, médicos, industriais e naturais. Em indústrias, os alimentos e as superfícies de processamento tornam o ambiente propício para a formação de biofilme, pois dispõem de nutrientes suficientes para o crescimento e fixação microbiana. Estas estruturas podem se desenvolver em borracha, polipropileno, plástico, vidro, aço, entre outros, o que pode levar a contaminação cruzada e impactar o processo de higienização, levando perigos à segurança alimentar e saúde humana (Abebe, 2020; Carrascosa et al., 2021).

Os biofilmes também podem ser formados em dispositivos médicos, causando infecções de difícil tratamento. Acredita-se que das infecções microbianas crônicas no corpo humano, aproximadamente 80% estão relacionadas à formação de biofilmes (Evstigneeva et al., 2023). Esses dados ressaltam a necessidade de se prevenir a contaminação e formação dessas estruturas, bem como sua eliminação dos ambientes industriais e de saúde. Para isso, a utilização de desinfetantes é primordial, porém, a falta de gestão científica e planejamento adequado da utilização desses agentes levou a maior abundância de genes de resistência, além de a exposição contínua de bactérias aos sanitizantes promover a adaptabilidade e tolerância, o que ameaça a saúde humana e o ecossistema (Tong et al., 2021).

Diante disso, observa-se a necessidade de desenvolver novos compostos desinfetantes que utilizem de tecnologia avançada e que possam resultar no aumento da potência e da ação biocida sobre os biofilmes de diferentes espécies bacterianas.

Assim, este trabalho objetivou caracterizar a matriz extracelular de biofilmes de diferentes gêneros/espécies bacterianas classificadas como multirresistentes e de importância para a indústria alimentícia e/ou ambiente hospitalar para basear o desenvolvimento industrial de agentes antimicrobianos e testar sua capacidade para inibir a formação e degradar o biofilme maduro.

2- Material e Métodos

2.1- Cepas

Foram utilizadas três cepas previamente isoladas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina – MRSA, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase - KPC e *Pseudomonas aeruginosa* - PAO), uma cepa isolada no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (*Acinetobacter baumannii* - AB), e quatro cepas obtidas em indústrias avícolas exportadoras brasileiras (*Campylobacter jejuni* - CJ, *Escherichia coli* patogênica para aves – APEC, *Salmonella* Choleraesuis – SC e *Salmonella* Typhimurium - ST). Também utilizamos três cepas ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922 – EC, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 - SE e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – SA).

2.2- Formação do biofilme e Índice de Formação de Biofilme (IFB)

As cepas, com exceção de CJ, foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI - Kasvi®) com incubação por 24 horas a 37°C, seguida de repique em ágar triptona de soja (TSA – Oxoid®) com incubação nas mesmas condições. Três colônias de cada placa foram transferidas para 20 mL de caldo triptona de soja (TSB - Oxoid®), com incubação por 24 horas a 37°C sob agitação orbital a 100 rpm. Após, a formação do biofilme ocorreu como descrito por Naves et al. (2008) e Kudirkiene et al. (2012), com modificações. Resumidamente, 200 µL da suspensão bacteriana contendo 10^7 UFC/mL (DO_{600} DNM-9602 Microplate Reader= 0,22 a 0,28) em caldo TSB foram adicionados em placas de poliestireno de 96 poços, e para a formação da biomassa, as placas foram incubadas nas mesmas condições já descritas.

CJ foi reativada diretamente em ágar CCDA (Blood free *Campylobacter* Selectivity Agar Base - Neogen®) e incubada em microaerofilia (Microaerobac - Probac®) por 48 horas a 37°C. Após, o conteúdo de uma placa de CCDA foi transferido para 19 mL de caldo Mueller Hinton (MH - Kasvi®) e 1 mL de *chicken juice*, incubado em microaerofilia por 48 horas a 37°C. O biofilme foi formado com suspensão bacteriana contendo 10^4 UFC/mL (DO_{600} = 0,22 a 0,28).

O índice de formação de biofilme (IFB) foi determinado pela fórmula: $IFB = BA - PC/BS$, sendo BA a densidade óptica determinada na mistura de bactérias aderidas, PC o valor de absorbância nos poços de controle sem micro-organismos e BS, a DO_{600} das culturas suspensas. Os biofilmes foram classificados como: Forte $\geq 1,10$, Médio: 0,7 – 1,10, Fraco: 0,35 – 0,69 ou Inexistente: $<0,35$ (Naves et al., 2008).

Todos os testes foram realizados em oito réplicas e três repetições.

2.3- Análise de composição dos biofilmes

Com o biofilme formado, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL das soluções de Proteinase K - INLAB® (1 mg/mL/poço), DNase - PROMEGA® (20 U/poço) e Metaperiodato de sódio - S1878 – SIGMA® (100 mM/poço). Nos poços de controle, foi adicionado caldo TSB, e somente para CJ, TSB foi substituído por MH. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C, sob agitação a 100 rpm, com exceção das de CJ, que foi incubada em microaerofilia e sem agitação. Após a incubação, retirou-se todo o sobrenadante da placa e essa foi colocada em uma estufa a 55°C a 15 minutos para completa secagem. A biomassa foi quantificada após a coloração com cristal violeta (Chaignon et al., 2007).

A coloração por cristal violeta foi realizada de acordo com Kudirkiene et al. (2012), com modificações. Na placa experimental seca, 200 µL da solução de cristal violeta 1% (LaborClin®) foram adicionados em todos os poços, e após 10 minutos realizou-se lavagem cuidadosamente com 200 µL de água ultrapura, seguida de eluição com 200 µL de metanol. Realizou-se homogeneização por 20 segundos e transferência de 100 µL dessa solução para uma nova placa de 96 poços para a leitura de absorbância (DO₆₀₀). Essa coloração é considerada como um ensaio preciso para determinar a quantidade de biomassa do biofilme (Müsken et al., 2010).

2.4- Microscopia de fluorescência

Os biofilmes de CJ, APEC, PAO, SC e MRSA foram submetidos à análise de fluorescência para avaliar qualitativamente a composição da matriz extracelular. As cepas foram reativadas e suplementadas com 5% de *chicken juice* e os biofilmes formados por 72 horas a 37°C em placas de 24 poços respeitando os mesmos procedimentos já descritos. A análise de fluorescência ocorreu de acordo com Windham et al. (2018), com modificações. Resumidamente, retirou-se todo o sobrenadante dos poços e adicionou-se 1 mL de formol a 10% durante 10 minutos. Após, realizou-se cuidadosamente duas lavagens com 1 mL água ultrapura, e protegido da luz, adicionou-se o FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (ThermoFisher Scientific®), conforme instruções do fabricante. Em seguida, realizou-se duas novas lavagens com água ultrapura, seguido da adição do Calcofluor White Stain (SIGMA®) diluído em água ultrapura na proporção 1:10, de forma que todo o fundo do poço fosse coberto. Aguardou-se 30 minutos e realizou-se três lavagens com 1 mL de água ultrapura e adicionou-se mais 1 mL de água ultrapura. A leitura e captura das imagens foi realizada em microscópio de fluorescência Evos – Thermo Fisher Scientific®.

2.5- Tratamentos com produtos químicos específicos

A capacidade inibitória da formação e de degradar o biofilme pré-formado de todas as cepas foram avaliadas com quatro produtos desenvolvidos pela empresa parceira START QUÍMICA®, sendo eles: P1- Start Solvquat (solvente d-limoneno vegetal + quaternário), P2- Start Tensoacid (base quaternário + ácido fosfórico), P3- Start Tensoenzim (blend de enzimas: protease + amilase) e P4- Ácido Hipocloroso. P1, P2 e P3 foram utilizados na concentração de 10% e P4 de 0,4%, conforme indicação do fabricante. A capacidade inibitória da formação de biofilme de cada produto foi avaliada em biofilmes formados como descrito anteriormente, porém adicionando-se o tratamento ao mesmo tempo que o inóculo. As placas foram incubadas nas mesmas condições já descritas e a biomassa quantificada após a coloração com cristal violeta.

2.6- Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A determinação da ultra-estrutura dos biofilmes foi realizada pela MEV nas mesmas cepas avaliadas na microscopia de fluorescência, com e sem tratamento com os agentes inovadores. As cepas foram reativadas e suplementadas como anteriormente descrito e os biofilmes foram formados em placa de poliestireno de 24 poços contendo uma esfera de vidro de 5mm de diâmetro e incubadas por 72 horas a 37°C sob agitação a 100 rpm. Somente a

placa com CJ foi incubada em microaerofilia sem agitação. Após, seguiu-se o protocolo recomendado por Brown et al. (2014), com modificações. Retirou-se todo o conteúdo dos poços e realizou-se lavagem com 1 mL de cacodilato e posterior fixação com 1 mL de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído (Solução de Karnovsky) em tampão PBS 0,1M (pH 7,4), seguida de armazenagem refrigerada a 4°C overnight. Em seguida, removeu-se o fixador e realizou-se três lavagens com 1 mL de cacodilato, adição de 1 mL de tetróxido de ósmio a 1% (EMS®), seguido de armazenagem refrigerada durante uma hora. Decorrido esse tempo, realizou-se três lavagens com cacodilato e após, iniciou-se a desidratação das esferas de vidro em 1mL de uma série de soluções de álcool etílico a 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% durante 20 minutos e três vezes em álcool a 100%. As esferas foram secas em PCS (ponto crítico de secagem) (CPD 030, BALTEC, 261 Alemanha) utilizando dióxido de carbono líquido como fluido de transição. Posteriormente, as amostras secas receberam 20 nm de ouro (SCD 050, BALTEC, Germany), e foram visualizadas em MEV VP Zeiss supra 55 SEM FEG operando a 20 kV.

O mesmo procedimento foi realizado para os biofilmes tratados com o produto de maior degradação percentual sobre o biofilme pré-formado das respectivas cepas. Esse recebeu o tratamento após as 72 horas de incubação, por 2 horas a 37°C e sob agitação (100 rpm), com exceção de CJ, realizado sem agitação. O biofilme pré-formado de CJ foi tratado com P2 a 10%, assim como o de APEC e PAO. Já o biofilme de SC foi tratado com o P4 a 0,4% e MRSA com o P1 a 10%. As amostras foram visualizadas em VEGA3 Tescan operando a 20 kV.

2.7- Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos à avaliação da normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, e de acordo com a distribuição gaussiana foi aplicada ANOVA a fim de se determinar a similaridade entre as repetições e posteriormente o efeito de cada tratamento em cada patógeno na forma séssil e seu efeito na composição e formação da matriz. Os testes foram realizados no programa GraphPadPrism 8.0.1, com intervalo de confiança de 95%.

3- Resultados

3.1- Análise de composição do biofilme

O IFB classificou todas as onze cepas como fortes formadoras de biofilmes, com média de $2,852 \pm 0,215$ (Tabela 1). Os tratamentos enzimáticos com proteinase K, DNase e metaperiodato de sódio caracterizaram respectivamente as frações de proteína, DNA e carboidratos que compõem a matriz do biofilme. Os efeitos desses tratamentos estão demonstrados na figura 1, e os respectivos percentuais dessas frações na biomassa total estão descritos na tabela 1.

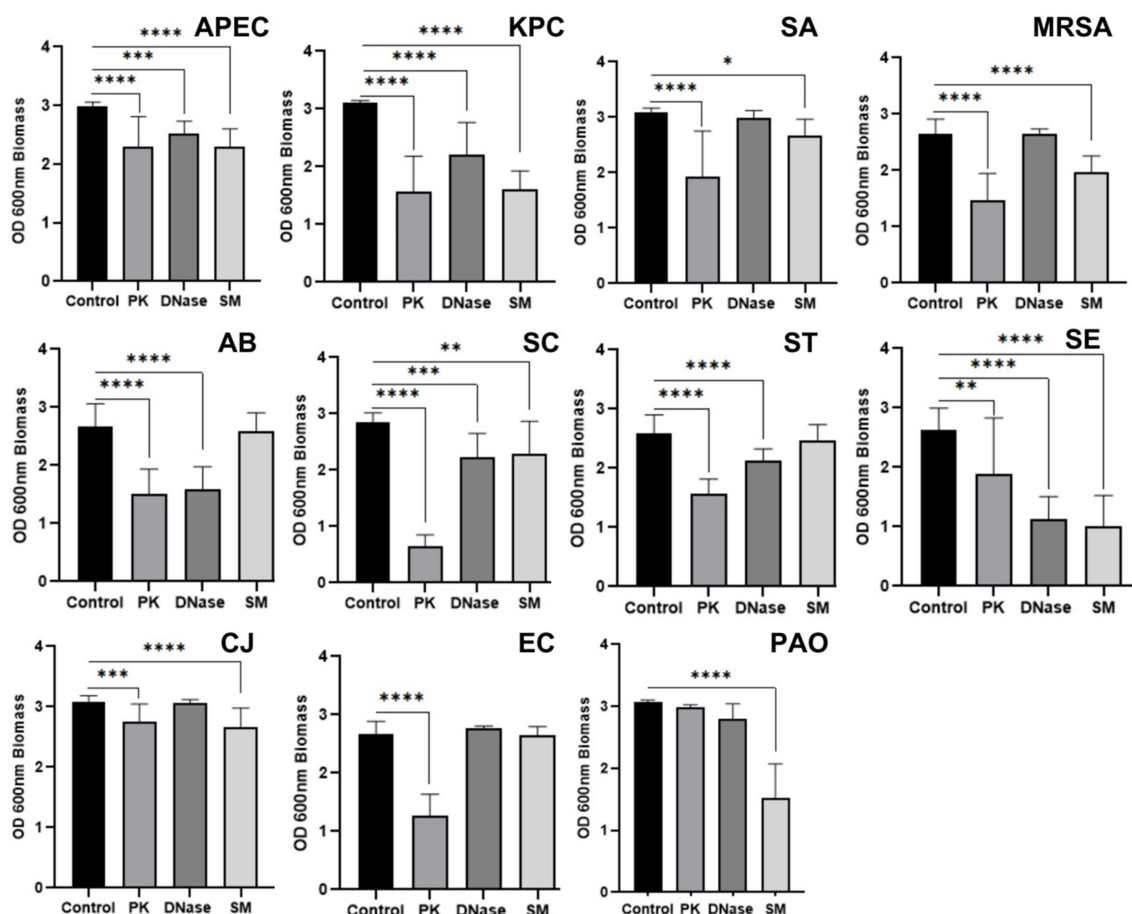


FIGURA 1 – Efeito do tratamento com proteinase K (PK), DNase e Metaperiodato de sódio (SM) nos biofilmes de APEC - *E. coli* patogênica para aves, KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, SA - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, AB - *Acinetobacter baumannii*, SC - *Salmonella Choleraesuis*, ST - *Salmonella* Typhimurium, SE - *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, CJ - *Campylobacter jejuni*, EC - *E. coli* ATCC 25922, PAO - *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados representam a média e o desvio (barra de erro) de quatro experimentos independentes usando one way Anova ($p < 0.05$).

Identificamos seis perfis de composições para a matriz extracelular considerando as frações de proteínas, carboidratos e DNA (I-VI – Tabela 1). A maioria das cepas apresentou biofilme constituído principalmente por fração proteica, seguido da fração de carboidratos, e o DNA como a fração de menor teor ou inexistente (APEC, KPC, SA, MRSA). Para as cepas AB, SC e ST identificamos uma composição mais rica em proteínas seguida por DNA. Outras composições observadas foram a maior fração de carboidratos, seguida de DNA e proteína (SE), somente carboidratos e proteína (CJ), exclusivamente proteica (EC) e apenas a fração de carboidratos (PAO). Logo, o componente de maior teor na biomassa total das cepas alternou-se entre proteína e carboidratos (tabela 1).

TABELA 1 – Produção média de biomassa por cepa com as respectivas frações proteica, de DNA e carboidratos.

Perfil	CEPAS	BIOMASSA	PROTEÍNA	DNA	CARBOIDRATOS
I	APEC	2.992 ± 0.0678	0.702 (23.5%) p < 0.0001	0.469 (15.7%) p=0.0004	0.694 (23.2%) p < 0.0001
	KPC	3.106 ± 0.0427	1.530 (49.3%) p < 0.0001	0.890 (28.7%) p < 0.0001	1.499 (48.3%) p < 0.0001
	SA	3.082 ± 0.0846	1.152 (37.4%) p < 0.0001	0.098 (3.2%) p=0.8890	0.404 (13.1%) p=0.0107
	MRSA	2.654 ± 0.2592	1.185 (44.6%) p < 0.0001	0.004 (0.2%) p > 0.9999	0.686 (25.8%) p < 0.0001
Média					
II	AB	2.663 ± 0.4003	1.144 (43%) p < 0.0001	1.080 (40.6%) p < 0.0001	0.063 (2.4%) p=0.9737
	SC	2.844 ± 0.1720	2.193 (77.1%) p < 0.0001	0.617 (21.7%) p=0.0009	0.553 (19.4%) p=0.0033
	ST	2.582 ± 0.3191	1.007 (39%) p < 0.0001	0.452 (17.5%) p < 0.0001	0.103 (4%) p=0.6009
Média					
III	SE	2.624 ± 0.3707	0.739 (28.2%) p=0.0086	1.503 (57.3%) p < 0.0001	1.613 (61.5%) p < 0.0001
IV	CJ	3.079 ± 0.1029	0.333 (10.8%) p=0.0008	0.007 (0.2%) p=0.9998	0.408 (13.2%) p < 0.0001
V	EC	2.679 ± 0.2058	1.411 (52.7%) p < 0.0001	2.679 (0%) p=0.9508	0.022 (0.8%) p=0.9988
VI	PAO	3.068 ± 0.0378	0.080 (2.6%) p=0.8575	0.263 (8.6%) p=0.0767	1.548 (50.5%) p < 0.0001

APEC - *E. coli* patogênica para aves, KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de *carbapenemase*, SA - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, AB – *Acinetobacter baumannii*, SC - *Salmonella Choleraesuis*, ST - *Salmonella* Typhimurium, SE - *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, CJ – *Campylobacter jejuni*, EC - *E. coli* ATCC 25922, PAO - *Pseudomonas aeruginosa*. Os percentuais das frações proteica, de DNA e carboidratos se referem à diferença entre a média do controle e a média de cada tratamento enzimático.

3.2- Microscopia de fluorescência e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise qualitativa da composição da matriz dos biofilmes deixou evidente a existência das frações proteica e de carboidratos na biomassa de todas as cepas avaliadas. A figura 2 demonstra as micrografias de CJ, APEC e PAO, e a figura 3 as micrografias de SC e MRSA. O tratamento com FilmTracer SYPRO Ruby cora a matriz do biofilme marcando as proteínas e quando excitado pelo comprimento de onda emite a cor vermelha, enquanto o calcofluor white se liga à exopolissacarídeos e especificamente a celulose (carboidrato) emitindo a cor azul ao ser excitado (Auria, 2023; Bandeira et al., 2017).

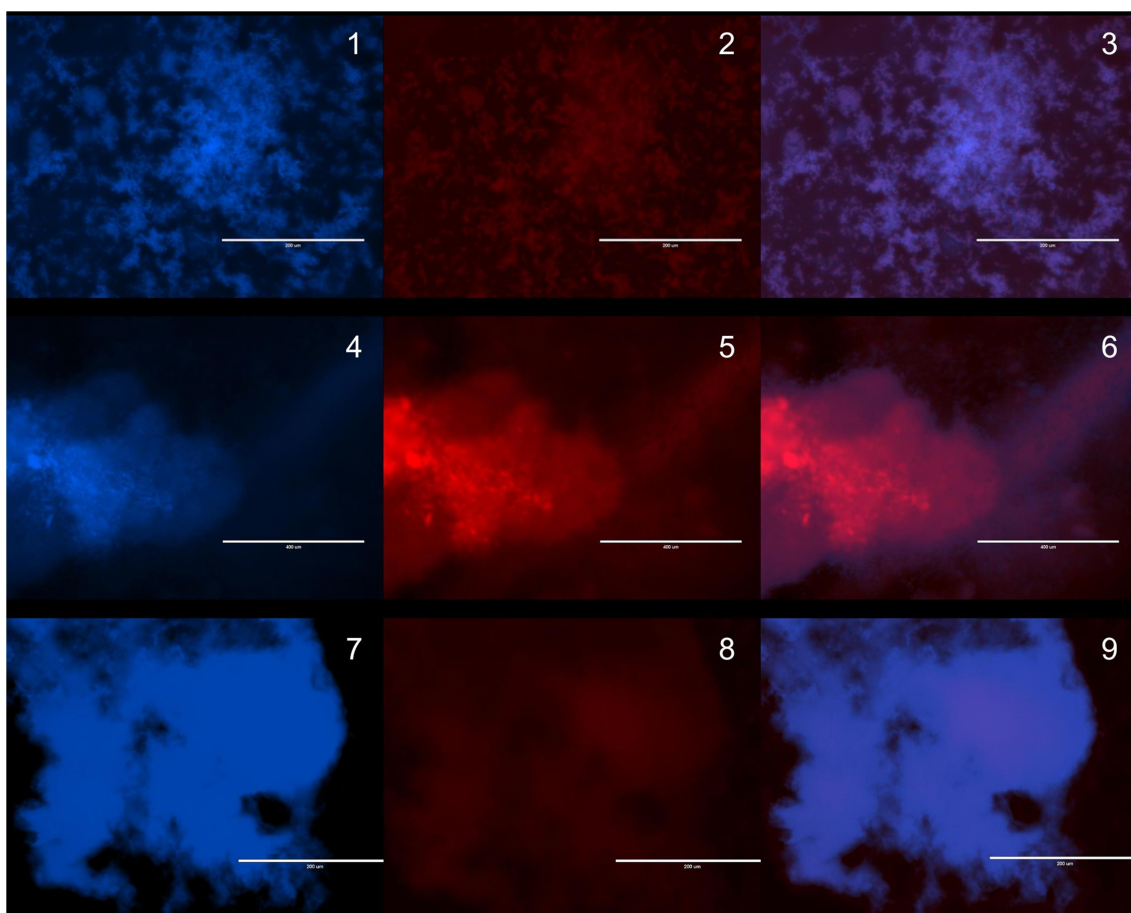


FIGURA 2 – Micrografias de Microscopia de fluorescência do biofilme monoespécie de *Campylobacter jejuni*: 1-Tratamento com calcofluor, 2- Tratamento com SYPRO Ruby, 3- Sobreposição de 1 e 2; escala de barra branca indica 200 μm . *E. coli* APEC: 4- Calcofluor, 5- SYPRO Ruby, 6- Sobreposição de 4 e 5; escala de 400 μm . *Pseudomonas aeruginosa*: 7- Calcofluor, 8- SYPRO Ruby, 9- Sobreposição de 7 e 8; escala de 200 μm .

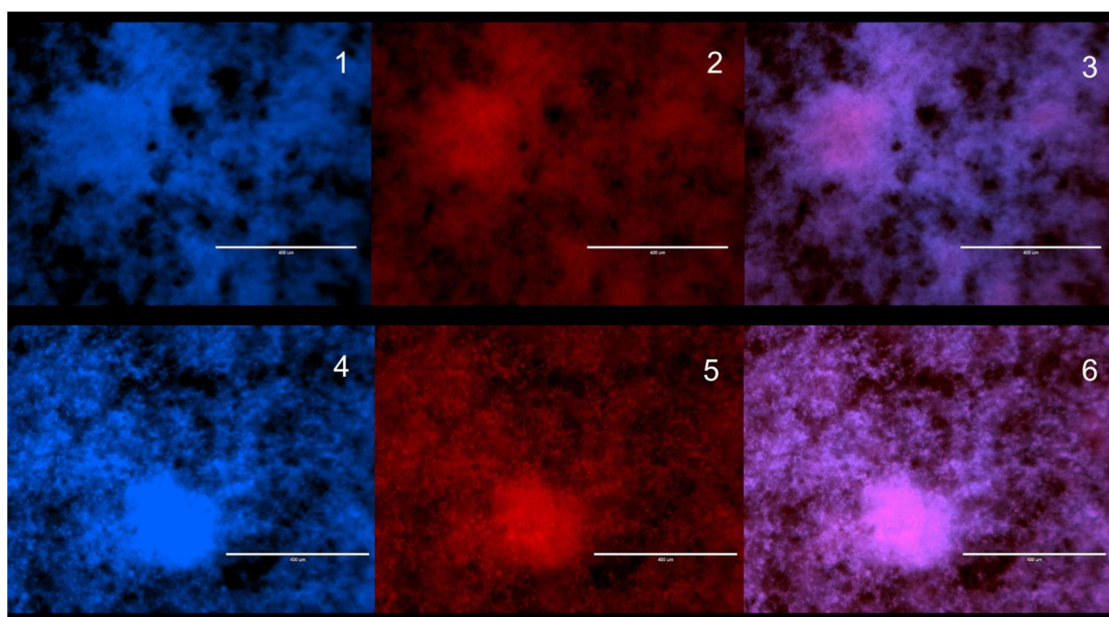


FIGURA 3 - Micrografias de Microscopia de fluorescência do biofilme monoespécie de *Salmonella Choleraesuis*: 1- Tratamento com calcofluor, 2- Tratamento com SYPRO Ruby, 3-

Sobreposição de 1 e 2, e *Staphylococcus aureus* MRSA: 4- Calcofluor, 5- SYPRO Ruby, 6- Sobreposição de 4 e 5, com a escala de barra branca indicando 400 μm .

A análise de MEV demonstrou a ultra-estrutura da matriz dos biofilmes, sendo possível observar a robustez e a estrutura tridimensional (figuras 4 e 5).

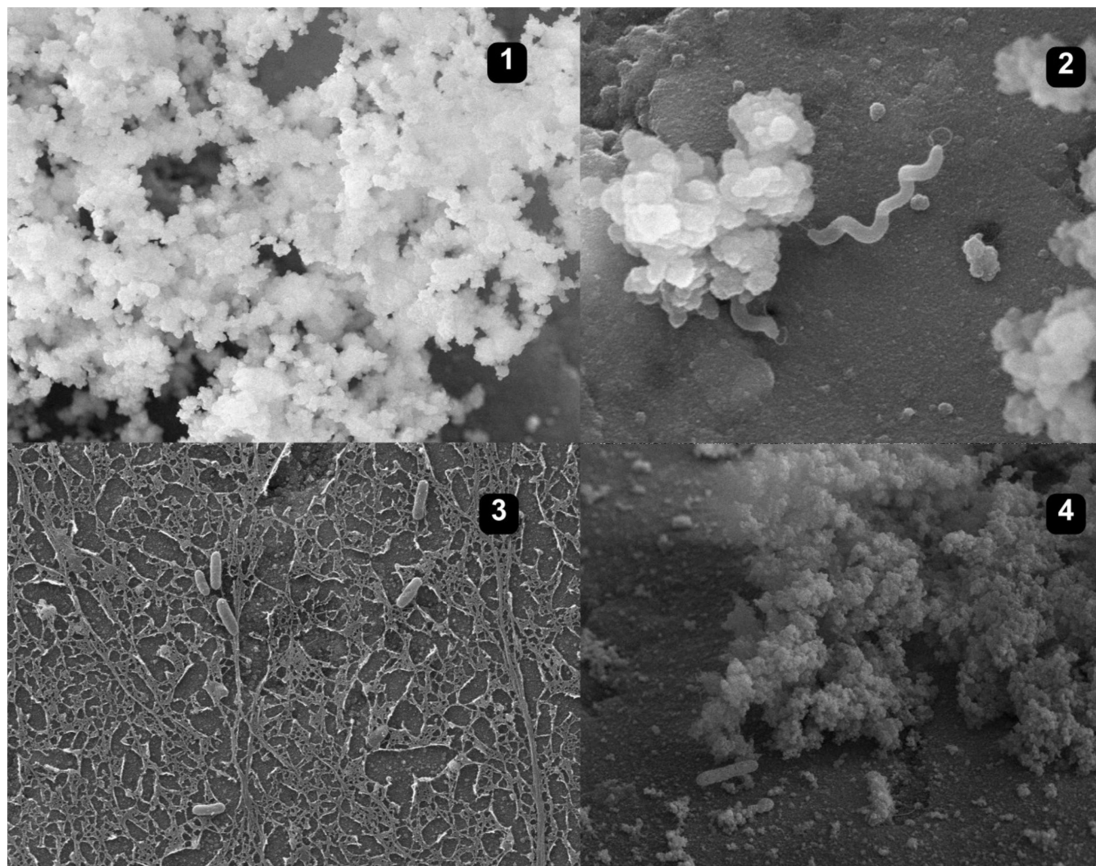


FIGURA 4- Imagens por MEV de biofilmes de *Campylobacter jejuni* (1: 2 μm e 2: 1 μm), *E. coli* APEC (3: 1 μm) e *Salmonella Choleraesuis* (4: 2 μm).

Na figura 4 a primeira imagem (1) refere-se ao biofilme maduro de CJ, em que se observa uma matriz densa e de natureza compacta, enquanto a segunda imagem demonstra a bactéria em sua forma espiralada característica. A terceira imagem demonstra o biofilme de APEC, em que é possível observar a bactéria em uma fase inicial de produção da matriz do biofilme. Já a quarta imagem demonstra a SC com a matriz do biofilme evidente e de aparência esponjosa.

A primeira e segunda imagem da figura 5 é referente ao biofilme de PAO. É possível observar o início da formação do biofilme, que as bactérias em forma de bacilo já se encontram aderidas sobre a superfície e início da produção da matriz. Já a terceira e quarta imagem se referem ao biofilme de MRSA, sendo possível observar a bactéria em forma de cocos e uma matriz mais densa e compacta.

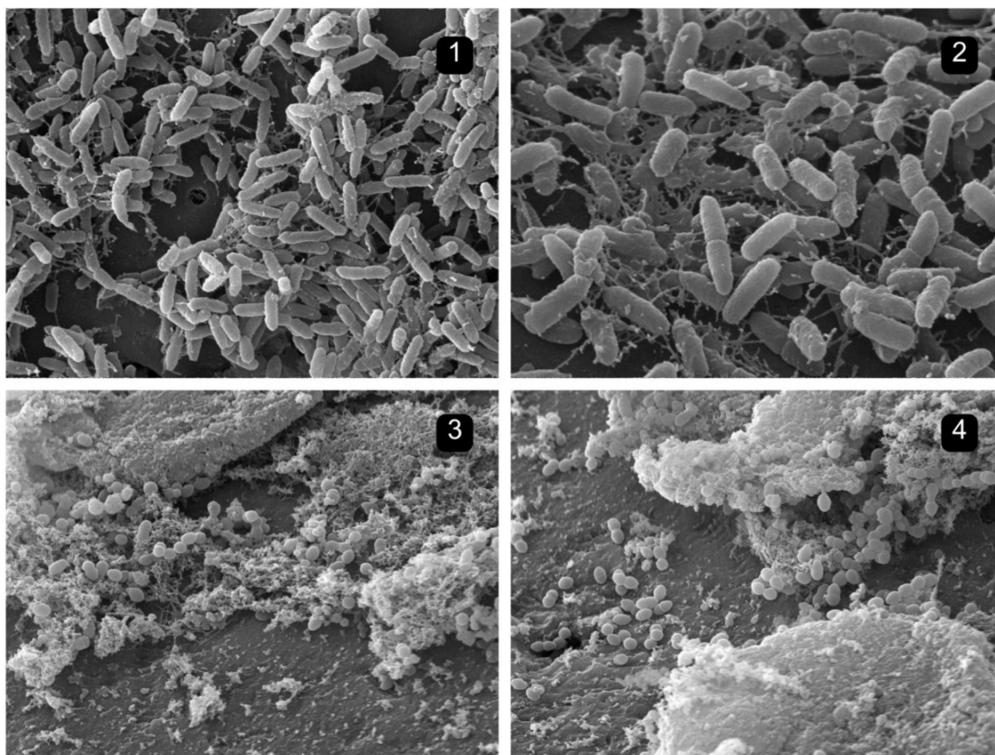


FIGURA 5 - Imagens por MEV de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (1: 2 μm e 2: 1 μm) e *Staphylococcus aureus* MRSA (3 e 4: 2 μm).

As imagens das figuras 6 e 7 demonstram o efeito do tratamento com os produtos previamente descritos sobre o biofilme formado das respectivas cepas analisadas por MEV.

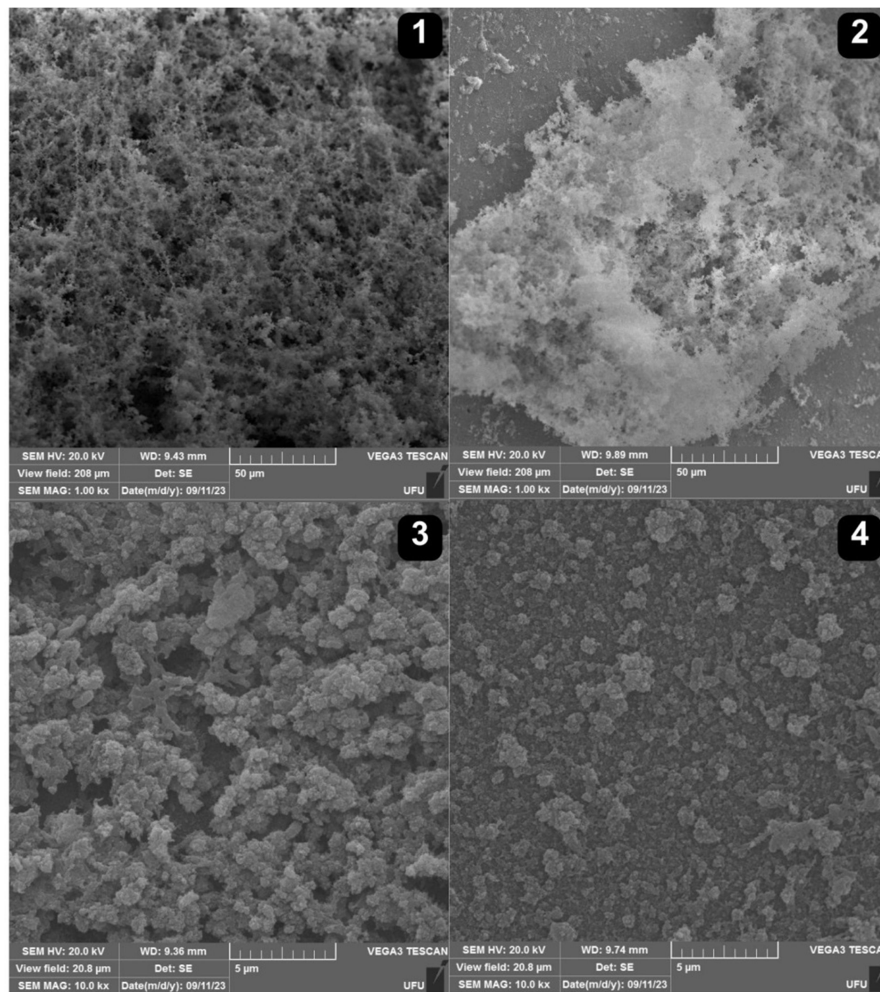


FIGURA 6 - Imagens por MEV de biofilmes de *Campylobacter jejuni*, controle (1) e uso do P2 - Start Tensoacid (2); *Salmonella Choleraesuis*, controle (3) e uso do P4 - Ácido Hipocloroso (4).

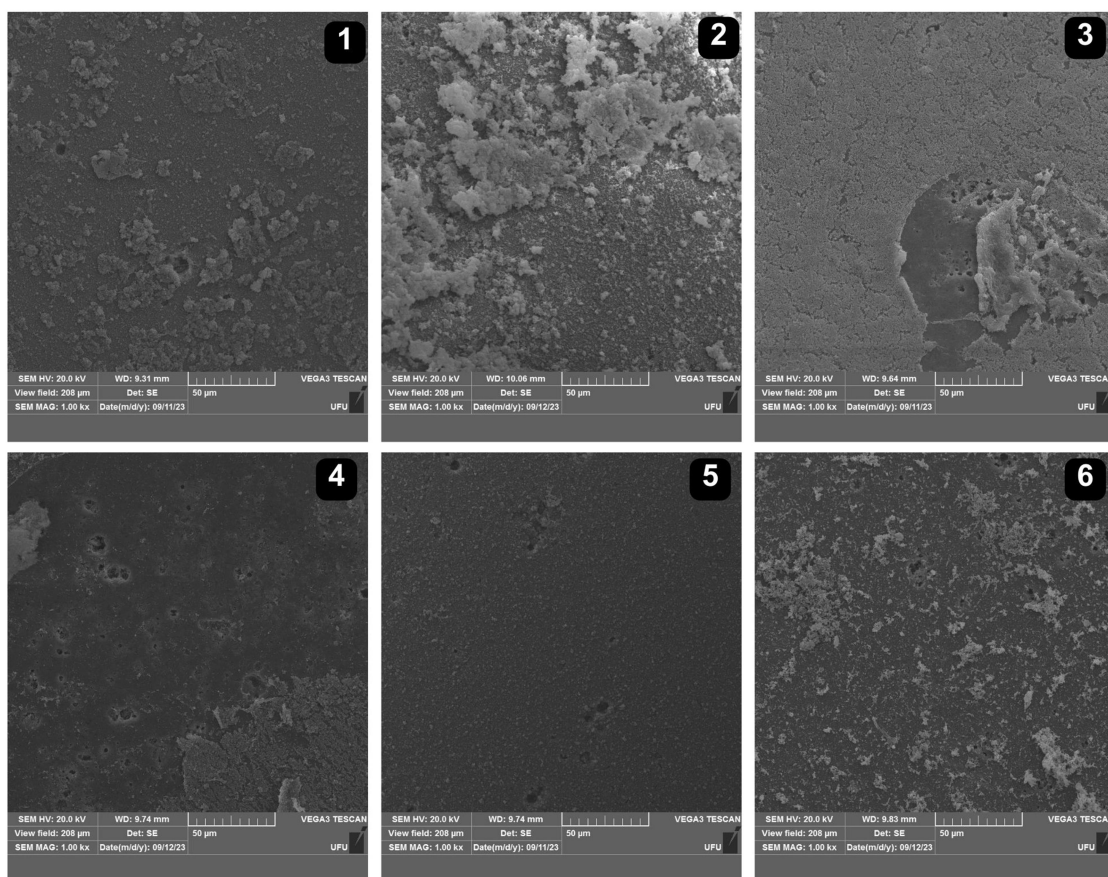


FIGURA 7 - Imagens por MEV de biofilme de *E. coli* APEC, controle (1) e uso do P2 – Start Tensoacid (2); *Pseudomonas aeruginosa*, controle (3) e uso do P2 – Start Tensoacid (4); *Staphylococcus aureus* MRSA, controle (5) e uso do P1 – Start Solvquat (6).

3.3- Atividade antibiofilme dos produtos químicos

A efetividade individual de cada produto em inibir a formação e dispersar/degradar os biofilmes estão nas figuras 8 e 9, respectivamente. A tabela 2 demonstra o impacto desses tratamentos sobre a biomassa do biofilme em porcentagem.

A avaliação da ação de cada produto em inibir a formação do biofilme (Figura 8), demonstrou que de forma geral, P4 foi capaz de inibir todas as cepas, com os maiores percentuais de inibição para a formação de biofilmes. Os percentuais variaram de 67,4% em ST a 93,7% em PAO. P1 também foi capaz de inibir significativamente todas as cepas em percentuais de inibição variáveis, de 6,5% em KPC a 79,8% em EC. P3 inibiu a formação de biofilmes por todas as cepas, também em percentuais bastante variáveis, em taxas de 9,4% em AB a 71% em EC. Já P2 foi o produto que demonstrou a menor capacidade de inibição, pois foi efetivo em somente 5/11 (45,45%) das cepas, nas quais os percentuais foram de 28,1% em SC a 90% em PAO. Em SE, ST e MRSA este produto teve ação inversa, favorecendo a formação de biofilmes em porcentagens de 56%, 132% e 8,16%, respectivamente.

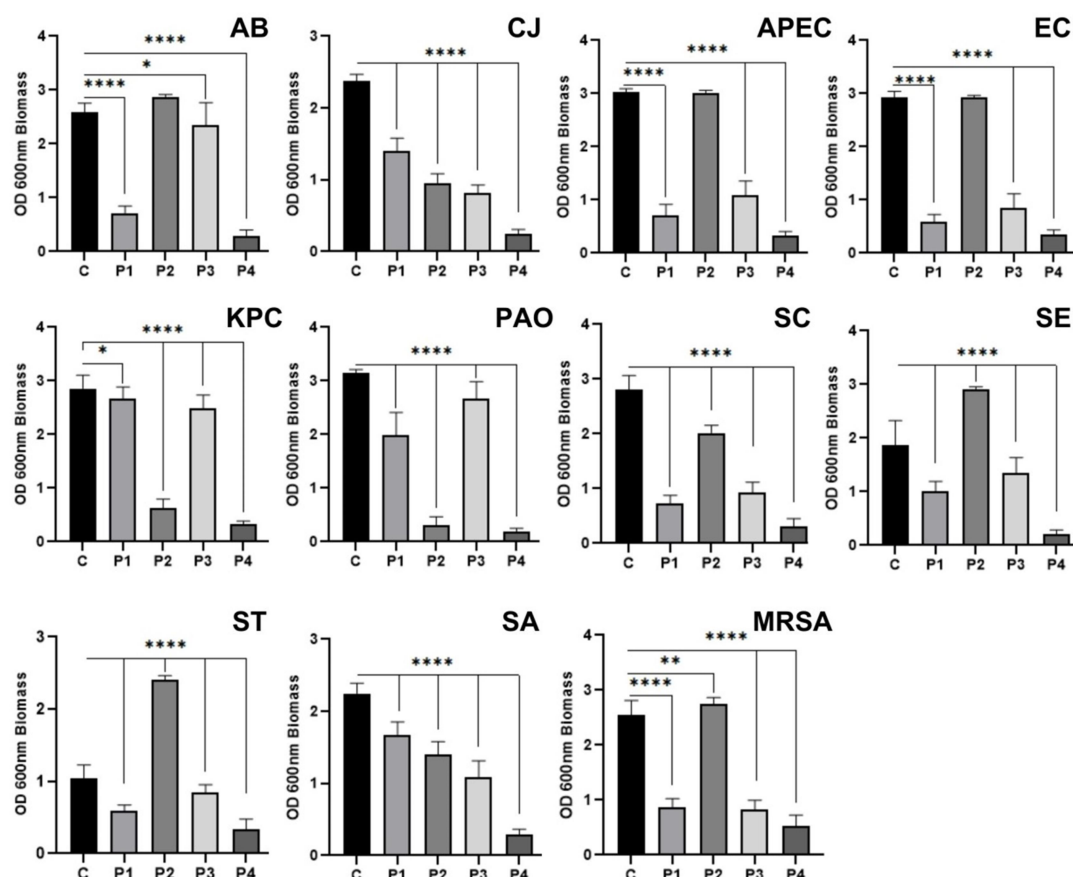


FIGURA 8 – Capacidade de inibir a formação do biofilme: Start Solvquat (P1), Start Tensoacid (P2), Start Tensoenzim (P3) e Ácido Hipocloroso (P4). AB – *Acinetobacter baumannii*, CJ – *Campylobacter jejuni*, APEC – *E. coli* patogênica para aves, EC – *E. coli* ATCC 25922, KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de *carbapenemase*, PAO – *Pseudomonas aeruginosa*, SC – *Salmonella Choleraesuis*, SE – *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, ST – *Salmonella* Typhimurium, SA – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Resultados representam a média e o desvio (barra de erro) de cinco experimentos independentes usando one way Anova ($p < 0,05$).

A ação dos produtos sobre os biofilmes pré-formados estão na figura 9 e tabela 2. Em geral, a capacidade do produto em inibir a formação da estrutura séssil não foi acompanhada pela sua eficiência em degradar o biofilme já formado e nenhum produto foi capaz de dispersar a matriz extracelular de todas as cepas. A influência de cada produto em degradar os biofilmes recém formados pelas cepas agrupadas em cada perfil foi avaliada e não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

P1 atuou significativamente na matriz de 7/11 (63,64%) cepas, com porcentagens que variaram de 3,9% ($p=0.0112$) em APEC e 50,5% em SA ($p<0.0001$) e degradação não significativa em EC, PAO, SC e ST. As cepas em que P1 apresentou ação na matriz em sua maioria pertencem ao perfil I (tabela 1).

P2 degradou os biofilmes de 6/11 cepas (54,55%) em porcentagens que variaram de 5% ($p=0.0005$) em APEC a 46% ($p<0.0001$) em PAO, sem ação em EC, ST e MRSA. Este composto mostrou efeito contrário, ou seja, aumentou a biomassa dos biofilmes formados por SC e SE, em 10 e 67%, respectivamente.

Dentre as onze cepas, a atividade de P3 foi constatada em biofilmes de 6 (54,55%), com reduções na biomassa de 37,8% em AB a 81% em SA. Em 4 (36,36%), a redução foi não significativa, e em CJ, a biomassa foi aumentada em 29% ($p < 0.0001$).

A degradação dos biofilmes por P4 foi observado em 7/11 (63,64%) cepas, mas a redução foi não significativa em quatro (CJ, APEC, SA e MRSA). APEC, SA e MRSA pertencem ao perfil I (tabela 1). Os percentuais de redução da biomassa variaram de 4,6 ($p = 0.0020$) em PAO a 70% ($p < 0.0001$) em KPC. Dentre as cepas em que P4 degradou eficientemente a matriz dos biofilmes, em 4/7 (57,14%), a redução percentual foi menor que 40%.

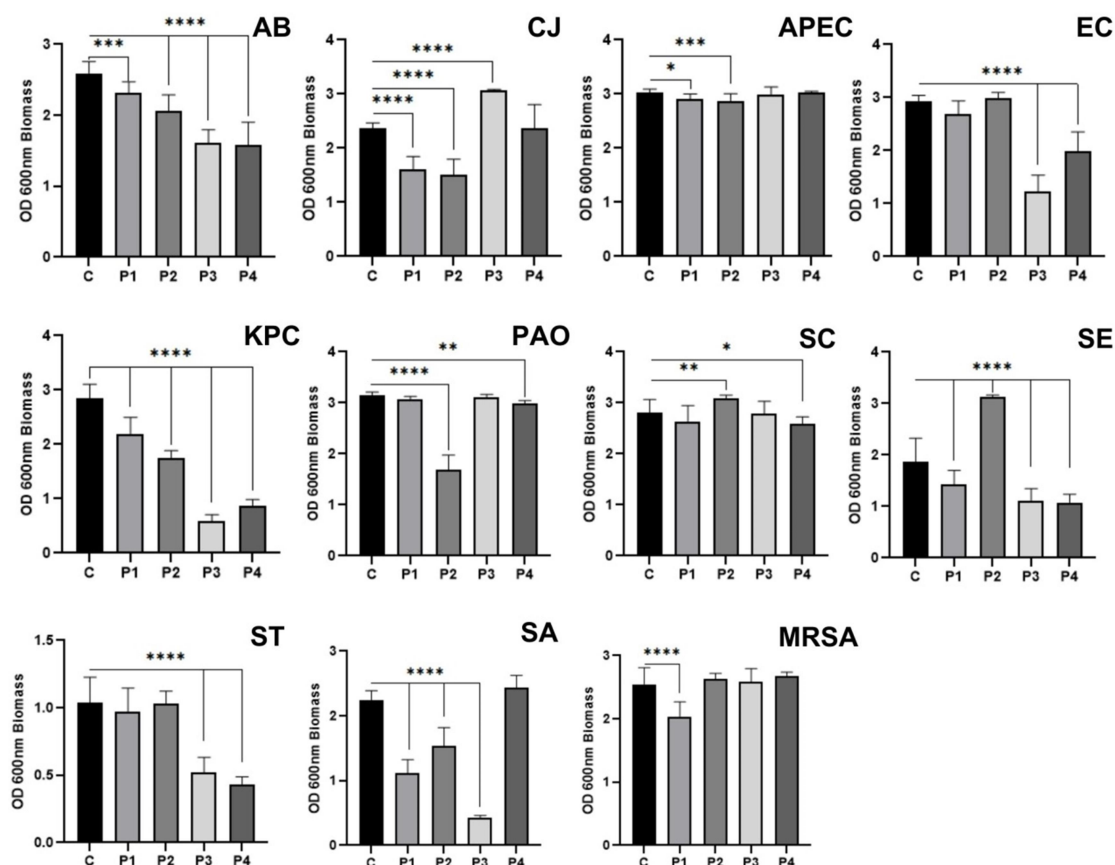


FIGURA 9 – Efeito do tratamento com Start Solvquat (P1), Start Tensoacid (P2), Start Tensoenzim (P3) e Ácido Hipocloroso (P4) no biofilme pré-formado de AB – *Acinetobacter baumannii*, CJ – *Campylobacter jejuni*, APEC – *E. coli* patogênica para aves, EC – *E. coli* ATCC 25922, KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, PAO – *Pseudomonas aeruginosa*, SC – *Salmonella Choleraesuis*, SE – *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, ST – *Salmonella* Typhimurium, SA – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Resultados representam a média e o desvio (barra de erro) de cinco experimentos independentes usando one way Anova ($p < 0,05$).

Em ordem decrescente, a capacidade de reduzir significativamente a matriz dos biofilmes pré-formados de cada uma das cepas pelos diferentes produtos foram: AB (P4>P3>P2>P1); CJ (P2>P1); APEC (P2>P1); EC (P3>P4); KPC (P3>P4>P2>P1); PAO (P2>P4); SC (P4); SE (P4>P3>P1); ST (P4>P3); SA (P3>P1>P2) e MRSA (P1). Destacamos a cepa APEC, em que P2 e P1 reduziram a biomassa em 5,0 ($p = 0.0005$) e 3,9% ($p = 0.0112$), a cepa SC com ação de

somente P4 em 8,1% ($p=0.0448$), e MRSA com redução somente por P1 em 20% ($p<0.0001$). As respectivas porcentagens de degradação cada tratamento estão expressas na tabela 2.

TABELA 2 – Efeito do tratamento com Start Solvquat (P1), Start Tensoacid (P2), Start Tensoenzim (P3) e Ácido Hipocloroso (P4) sobre o biofilme pré-formado (P1-P4) e a capacidade de inibir a formação do biofilme (P1-P4).

CEPAS	CONTROLE	DISPERSÃO DOS BIOFILMES				INIBIÇÃO DOS BIOFILMES			
		P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
AB	2.593±0.1654	0.283 (11%) p=0.0004	0.527 (20.3%) p < 0.0001	0.981 (37.8%) p < 0.0001	1.009 (39%) p < 0.0001	1.876 (72.3%) p < 0.0001	NS	0.244 (9.4%) p=0.0134	2.306 (89%) p < 0.0001
CJ	2.371±0.0980	0.766 (32.3%) p < 0.0001	0.854 (36%) p < 0.0001	-0.697 (-29%) p < 0.0001	NS	0.968 (40.8%) p < 0.0001	1.413 (60%) p < 0.0001	1.553 (65.5%) p < 0.0001	2.124 (89.6%) p < 0.0001
APEC	3.027±0.0652	0.117 (3.9%) p=0.0112	0.150 (5%) p=0.0005	NS	NS	2.318 (76.6%) p < 0.0001	NS	1.934 (64%) p < 0.0001	2.704 (89.3%) p < 0.0001
EC	2.922±0.1191	NS	NS	1.687 (57.7%) p < 0.0001	0.928 (31.7%) p < 0.0001	2.332 (79.8%) p < 0.0001	NS	2.072 (71%) p < 0.0001	2.582 (88.4%) p < 0.0001
KPC	2.856±0.2526	0.658 (23%) p < 0.0001	1.106 (38.7%) p < 0.0001	2.272 (80%) p < 0.0001	1.995 (70%) p < 0.0001	0.187 (6.5%) p=0.0468	2.235 (78.3%) p < 0.0001	0.361 (12.6%) p < 0.0001	2.534 (88.7%) p < 0.0001
PAO	3.141±0.0712	NS	1.448 (46%) p < 0.0001	NS	0.145 (4.6%) p=0.0020	1.148 (36.5%) p < 0.0001	2.826 (90%) p < 0.0001	0.471 (15%) p < 0.0001	2.945 (93.7%) p < 0.0001
SC	2.810±0.2540	NS	-0.282 (-10%) p=0.0033	NS	0.227 (8.1%) p=0.0448	2.081 (74%) p < 0.0001	0.790 (28.1%) p < 0.0001	1.884 (67%) p < 0.0001	2.496 (88.8%) p < 0.0001
SE	1.870±0.4553	0.440 (23.5%) p < 0.0001	-1.254 (-67%) p < 0.0001	0.754 (40.3%) p < 0.0001	0.793 (42.4%) p < 0.0001	0.859 (46%) p < 0.0001	-1.048 (-56%) p < 0.0001	0.521 (27.9%) p < 0.0001	1.669 (89.2%) p < 0.0001
ST	1.039±0.1878	NS	NS	0.516 (49.6%) p < 0.0001	0.605 (58.2%) p < 0.0001	0.447 (43%) p < 0.0001	-1.372 (-132%) p < 0.0001	0.188 (18%) p < 0.0001	0.701 (67.4%) p < 0.0001
SA	2.248±0.1430	1.135 (50.5%) p < 0.0001	0.717 (32%) p < 0.0001	1.824 (81%) p < 0.0001	NS	0.569 (25.3%) p < 0.0001	0.852 (38%) p < 0.0001	1.156 (51.4%) p < 0.0001	1.958 (87%) p < 0.0001
MRSA	2.548±0.2640	0.509 (20%) p < 0.0001	NS	NS	NS	1.677 (65.8%) p < 0.0001	-0.208 (-8.16) p=0.0098	1.722 (67.6%) p < 0.0001	2.026 (79.5%) p < 0.0001

AB – *Acinetobacter baumannii*, CJ - *Campylobacter jejuni*, APEC - *Escherichia coli* patogênica para aves, EC - *Escherichia coli* ATCC 25922, KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, PAO – *Pseudomonas aeruginosa*, SC - *Salmonella Choleraesuis*, SE - *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, ST - *Salmonella* Typhimurium, SA - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; NS = p > 0,05 Anova. P1 (solvente d-limoneno vegetal + quaternário), P2 (base quaternário + ácido fosfórico), P3 (blend de enzimas: protease + amilase) e P4 (Ácido Hipocloroso).

4- Discussão

Os resultados dos componentes da matriz extracelular permitem inferir que possivelmente a composição da matriz extracelular seja cepa-dependente.

Nossos resultados para APEC, SC, SE e ST corroboram o estudo de Tursi; Tükel (2018), que afirmam que bactérias entéricas como *E. coli* e *Salmonella* apresentam biofilme constituído principalmente por proteínas amiloides (curli), polissacarídeo (celulose) e DNAe. No entanto, a composição da biomassa de EC diferiu das demais por não apresentar DNAe e somente 0,8% de carboidratos na matriz do biofilme.

Kim & Kim (2022) demonstraram que a capacidade de formação e a composição das EPS (Substâncias Poliméricas Extracelulares) de *S. Enteritidis* ATCC 13076 variaram em relação a disponibilidade de nutrientes e determinaram que biofilmes produzidos na presença de TSB possuíam maior composição de carboidratos e proteína em relação a DNAe. Nossos resultados para esta cepa confirmam esta afirmação. A expressão de proteínas amilóides (curli) e celulose possuem papel crítico sobre o desenvolvimento do biofilme, pois influenciam na adesão inicial a superfícies, agregação celular e formação de película (Adcox et al., 2016).

DNAe é um componente quase onipresente na EPS do biofilme, e devido a sua importância e interações com os demais componentes da matriz dos biofilmes, está sendo visto como de impacto crítico na patogênese de infecções crônicas. É um elemento estrutural do biofilme que coordena a arquitetura de automontagem e une uma ampla diversidade de compostos secretados pelas bactérias. Assim, vêm sendo indicado como o melhor alvo para estratégias anti-biofilme (Adcox et al., 2016; Campoccia et al., 2021). Nossos resultados mostraram que SE e AB apresentaram biomassa com maior teor de DNA, no entanto, não representou o componente de maior teor na biomassa total. O tratamento com DNase em biofilme de EC não reduziu a biomassa, indicando que não ocorreu nenhuma degradação de DNA. Em contrapartida, o mesmo tratamento em APEC resultou em 15,7% de DNA na composição da biomassa. Campoccia e colaboradores (2021) destacaram que há menor vulnerabilidade a degradação pela DNase nos biofilmes em estágio de maturação devido a interação protetora de outros componentes da EPS, principalmente de proteínas amiloidogênicas e DNABII. Assim, apesar de o biofilme de EC e APEC terem sido formados nas mesmas condições de tempo, temperatura e nutricionais, inferimos que EC estava em um estágio de maturação mais avançado, o que pode justificar este resultado. Sharma & Singh (2018) também observaram redução na vulnerabilidade a DNase I em biofilmes envelhecidos e relataram que esse fato indica a menor dependência dos biofilmes em DNAe, ou seja, este pode ser um dos fatores que dificultam a degradação de biofilmes maduros.

Em nosso estudo, AB apresentou biomassa rica em proteína e DNA, concordando com Genteluci (2020), que sugeriu a predominância de proteína com pouca ou nenhuma fração de carboidratos e DNA na composição do biofilme desse patógeno. No estudo de Solis-Velazquez et al. (2021), *A. baumannii* apresentou uma biomassa com $25,91 \pm 2,34\%$ de proteína e $10,80 \pm 0,98\%$ de DNAe, cuja relação de componentes também vão de acordo com nossos achados. Diversas proteínas de superfície estão envolvidas na etapa inicial da formação do biofilme, correspondente a ligação das células planctônicas às superfícies bióticas ou abióticas. Dentre elas, a OmpA é a principal proteína de membrana externa que desempenha funções essenciais para a sobrevivência e patogênese de AB, possuindo também atividade emulsificante. Também são atribuídas a essa proteínas as funções de manutenção da

integridade da membrana celular, mediação de resistência a drogas, iniciação da formação do biofilme, modulação da resposta imune do hospedeiro e adesão as células epiteliais, além de estimular a apoptose da célula hospedeira (Nie et al., 2020; Yamabe et al., 2022). Semelhante a *S. aureus*, AB também possui a Bap, uma grande proteína hidrofóbica de superfície celular que auxilia na formação do biofilme em superfícies de células humanas e em superfícies abióticas clinicamente relevantes (poliestireno, polipropileno, titânio), originando um biofilme maduro com arranjo multidimensional e canais de água no interior. Já o DNAe desempenha função crucial para a manutenção do biofilme (Upmanyu; Haq; Singh, 2022).

O biofilme de KPC isolada em hospital humano demonstrou alto teor proteico e de carboidratos, assim como de DNA. Resultados semelhantes foram encontrados por Singh et al. (2019a) em isolados de sangue humano, com a fração de proteínas (68,6%) superior a de carboidratos (58,3%) e DNA (28,05%). Os altos teores desses componentes estão associados a fortes biofilmes desse patógeno (Desai et al., 2019). Bandeira et al. (2017) também sugeriram a proteína como o principal componente do biofilme desse patógeno e demonstraram que apesar de se tratar de um membro da família Enterobacteriaceae, que tem como característica possuir curli fimbriae e celulose como os principais componentes da EPS, *K. pneumoniae* não os apresentou.

PAO apresentou biomassa composta majoritariamente por carboidratos. Os principais polissacarídeos extracelulares que compõem a matriz do biofilme desse patógeno são alginato, Pel e Psl (Alshraideh et al., 2020; Rybtke et al., 2021). O alginato é produzido em grande quantidade por cepas mucoides, o que confere maior tolerância frente a produtos antimicrobianos como antibióticos e sanitizantes, fato também observado em nosso estudo. Somente P2 e P4 tiveram capacidade de dispersar o EPS dessa cepa em 46 e 4,6%, respectivamente. Já as cepas não mucoides utilizam Pel e Psl como polissacarídeos estruturais da matriz (Alshraideh et al., 2020; Colvin et al., 2012).

Nós determinamos maior abundância de proteínas frente a carboidratos na biomassa do biofilme de ambas as cepas de *S. aureus* (SA e MRSA), concordando com Lemos et al. (2018). Isolados de hospitais como MRSA produzem biofilmes de maior robustez quando comparados a isolados de carne e possuem como principal constituinte a fração proteica (Ball et al., 2022). As proteínas de maior abundância na matriz extracelular são associadas principalmente a fatores de virulência, como hemolisinas, leucotoxinas, lipases, proteína de aderência extracelular e amilóides funcionais. Esse último consiste em dois tipos: as modulinas solúveis em fenol na forma de pequenos peptídeos com tendência de se agregar em fibras amiloides, e os amiloides facultativos, que são proteínas de superfície como a Bap presentes em algumas cepas. As fibras amiloides geram estabilidade ao biofilme e contribuem para sua maturação, enquanto a Bap promove a formação do biofilme, sendo relacionada a cepas fortes formadores de biofilme (Graf et al., 2019; Matilla-Cuenca et al., 2020).

Sobre a biomassa de *C. jejuni*, nossos achados demonstraram que carboidratos e proteínas são componentes significativos. Melo et al. (2017) demonstraram que a fração proteica parece ser o componente predominante da matriz, mas Ma et al. (2022) afirmam que carboidratos e DNAe também são reconhecidos como frações significativas no EPS de *Campylobacter* e que sua composição é variável entre as cepas. Nós não detectamos DNAe, e em contraste, Brown et al. (2015), demonstraram que o DNAe também é um componente importante do biofilme de *C. jejuni* e que a DNase I (Fermentas®) foi capaz de degradar e

dispersar o biofilme cultivado em meio de Brucella por 48 horas a 37°C em condições aeróbicas.

Considerando a natureza proteica e de carboidratos dos biofilmes, é possível que a associação de potentes proteolíticos e oxidantes aos sanitizantes seja uma estratégia pertinente e adequada para a sua prevenção e erradicação. Apesar de o DNAe estar sendo considerado como o melhor alvo para as estratégias antibiofilme (Campoccia et al., 2021), nossos resultados demonstraram que proteínas e carboidratos são os principais constituintes dos biofilmes dos diferentes gêneros bacterianos avaliados. Esses componentes interagem com o DNAe e o protegem da degradação (Campoccia et al., 2021), assim, estratégias que consigam quebrar a barreira de proteína e carboidratos da matriz do biofilme e ainda atingir o DNAe e degradá-lo são as mais pertinentes para destruir o biofilme pré-formado, pois esse é de difícil erradicação após a formação no ambiente. As imagens de MEV (figuras 4, 5, 6 e 7) deixam evidentes as características da matriz do biofilme das diferentes cepas, que com o decorrer do tempo resulta na maturação e apresentação de uma matriz cada vez mais densa, robusta e abundante. Essa por sua vez, implica em proteção, e consequentemente, dificuldade de remoção do ambiente.

As estratégias principais para combater a forma séssil consistem em prevenir a sua formação ou destruir os já formados. Modificar a superfície visando dificultar a adesão dos micro-organismos, adequada limpeza e sanitização, assim como impedir a maturação por processos rigorosos de higienização são formas de prevenir a formação do biofilme no ambiente. Estratégias que destruam a estrutura do biofilme e induza o seu desprendimento por meio físico ou químico podem erradicar um biofilme maduro da superfície. Aminoácidos e peptídeos antimicrobianos, quelantes de metais, inibidores de detecção de *quorum*, surfactantes e outros agentes antibiofilmes como compostos de amônio quaternário (QACs) podem ser utilizados efetivamente contra essas estruturas em diferentes estágios (Saverina et al., 2023).

A ação dos produtos desenvolvidos pela empresa parceira sobre a inibição da formação e degradação dos biofilmes pré-formados, de forma geral, foram mais eficazes em inibir a formação do que destruir o biofilme pré-formado (tabela 2). Esses resultados concordam com a literatura, que discorre que biofilmes já estabelecidos são extremamente difíceis de eliminar em virtude da maior resistência a detergentes e desinfetantes (Nunez et al., 2023).

A presença de biofilmes e a consequente dificuldade de higienização implica em graves problemas tanto para ambientes hospitalares quanto para indústrias alimentícias. A presença de biofilmes secos multiespécies já foi demonstrada em diversas superfícies hospitalares (Ledwoch et al., 2018) e *S. aureus*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são os patógenos mais prevalentes nas superfícies hospitalares como grades de leitos, apoios de braços e botões de chamada de enfermeiras, que são frequentemente tocadas por médicos e presentes em UTI (Nunez et al., 2023). *K. pneumoniae* e *E. coli* estão frequentemente envolvidas em infecções hospitalares de alta morbidade e mortalidade, principalmente quando produtoras de β -lactamase de espectro estendido (Gasser et al., 2019). Quanto às indústrias alimentícias, os biofilmes bacterianos são responsáveis por contaminação cruzada e deterioração dos alimentos, assim como danos em equipamentos e problemas de segurança alimentar, que culminam em grandes perdas econômicas e geram um impacto em nível global incalculável

(Guo et al., 2023). *C. jejuni*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. enterica* e *S. aureus* são patógenos relevantes para os ambientes de processamento de alimentos (Carrascosa et al., 2021).

P1 inibiu significativamente a formação do biofilme de todas as cepas ($p < 0.0001$), com menor taxa de inibição em KPC ($p = 0.0468$), mas não foi capaz de degradar significativamente a matriz extracelular com a mesma eficiência. Nossos resultados confirmam que a associação em comunidades sésseis fornece proteção à produtos químicos (Nunez et al., 2023). O D-limoneno é um monoterpene cíclico, presente na casca de frutas cítricas, que apresenta atividade antimicrobiana oriunda principalmente da atuação sobre a membrana citoplasmática acarretando danos ao LPS, e consequentemente alterando permeabilidade, culminando na ruptura da célula. Esse mecanismo de atuação já foi constatado em *E. coli*, mas o limoneno também gera danos a membrana celular de bactérias Gram-positivas acarretando a sua morte (Gupta et al., 2021). Esse composto também foi capaz de afetar a respiração e o metabolismo energético da *L. monocytogenes*, impedindo a síntese de ATP por inibir a atividade do complexo respiratório e ATPase (Han et al., 2019).

CAQs apresentam eficaz atividade biocida e longa durabilidade (Song et al., 2011), mas essa atividade depende da extensão da cadeia hidrofóbica de alquil, que rompe fisicamente as membranas da célula alvo. As cadeias longas podem desfazer as propriedades físicas e bioquímicas das membranas e o nitrogênio carregado permanece na superfície da membrana interrompendo a distribuição de carga. Além disso, compostos de amônia quaternária também podem atuar intracelularmente e se ligar ao DNA (Christen et al., 2017). A capacidade do P1 inibir a formação do biofilme provavelmente é decorrente da atuação sobre a membrana celular das bactérias, provocando o seu rompimento e consequentemente impedindo a adesão à superfície e o desenvolvimento do biofilme. Já sobre o biofilme maduro/pré-formado, P1 apresentou percentuais inferiores quanto a capacidade de degradação quando comparado a capacidade de inibir a sua formação, exceto para SA e KPC, ambas pertencentes ao perfil I. Nessas cepas ocorreu o comportamento inverso, em que o P1 foi mais eficiente sobre o biofilme pré-formado do que sobre a inibição da formação, provavelmente por atuar em proteínas e carboidratos específicos dessas cepas, que são os principais constituintes da EPS, e também por interferir no *quorum sensing* (QS). Ray & Pattnaik (2023) relataram que o limoneno extraído de várias fontes cítricas apresentou notável eficiência contra o biofilme formado de diferentes gêneros bacterianos, e que monoterpene possuem ação anti *quorum sensing*. Interagir com o QS implica em afetar o processo de comunicação das bactérias e consequentemente o desenvolvimento do biofilme e sua virulência (Lahiri et al., 2022).

No estudo de Gambino et al. (2022), o uso do limoneno em concentrações inferiores a inibitória mínima durante a formação do biofilme de *P. aeruginosa* e *S. aureus* inibiu o biofilme em dois log e demonstrou ter atividade bacteriostática. A capacidade de erradicação dos biofilmes maduros mono e polimicrobianos manteve a mesma ordem de magnitude, gerando danos significativos e irreversíveis na estrutura do biofilme. No entanto, nossos resultados para PAO diferem desse estudo, pois a ordem de magnitude não se manteve entre a inibição da formação e a erradicação do biofilme maduro.

P2 degradou significativamente o biofilme maduro de AB e APEC, mas foi incapaz de inibir sua formação e ainda estimulou a formação destas estruturas em relação ao controle em SE, ST e MRSA. P2 é composto por CAQs, que atuam principalmente sobre a membrana celular, e por ácido fosfórico (H_3PO_4) cuja atividade antimicrobiana parece estar relacionada a redução do pH do meio, tornando-o impróprio aos micro-organismos e ocasionando a morte

celular (Chaves et al., 2020). Compostos de carga positiva, como amônia quaternária, podem interagir com bactérias ou seu biofilme que são carregados negativamente por meio de interações eletrostáticas e promover o aumento da penetrabilidade de agentes antimicrobianos, gerando assim uma entrega direcionada, e consequentemente melhora no desempenho (Lv et al., 2023).

Poucos estudos são encontrados na literatura relatando o efeito antimicrobiano do ácido fosfórico sobre os diferentes gêneros bacterianos. Em *E. faecalis* o ácido fosfórico apresentou atividade bactericida, exercendo-a em menor tempo quando comparado ao ácido cítrico (Arias-Moliz et al., 2008). Também apresentou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Actinomyces meyeri*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens* (Prado et al., 2015). Ácido fosfórico juntamente com propilenoglicol constituíram um aditivo químico que utilizado em conjunto com cloro resultou em maior controle, comparado a ação isolada, da contaminação cruzada por *Salmonella* e *Campylobacter* no resfriamento por imersão de carcaças de frango de corte (Schambach et al., 2014). Diante desses dados acreditamos que a avaliação do ácido fosfórico quanto a capacidade de inibir e degradar biofilmes bacterianos seja recente e que nosso estudo esteja entre os primeiros a abordar essa perspectiva.

P3 apresentou atividade inibitória sobre a formação do biofilme por todas as cepas, mas foi incapaz de degradar o biofilme pré-formado de APEC, PAO, SC e MRSA. As porcentagens de degradação da EPS foram relativamente altas, superiores a 37%. Protease e amilase são as constituintes do P3, e provavelmente a boa efetividade na degradação, deve-se à matriz dos biofilmes serem formados predominantemente por proteínas e carboidratos. A protease promove a morte bacteriana por comprometer a integridade da parede celular e também é capaz de destruir fatores de virulência, afetando assim a patogênese das bactérias (Chen et al., 2021), além de dispersar o biofilme por clivagem de proteínas de superfície, retirando a proteção física do mesmo (El-Hamid et al., 2020). Lahiri et al. (2021) demonstraram que a α -amilase de *B. subtilis* parcialmente purificada promoveu melhor degradação dos componentes da EPS do biofilme pré-formado de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, comparado às enzimas brutas e comerciais puras. A capacidade de inibir a formação do biofilme também foi avaliada e resultou na inibição em altas porcentagens em *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, o que concorda com nossos resultados para inibição. Em relação à degradação do biofilme pré-formado, P3 promoveu dispersão somente em SA.

Sobre o biofilme pré-formado de CJ, não observamos ação de P3 na degradação, e ainda, resultou no aumento do teor de biomassa em 29% superior ao controle. Esse achado está de acordo com Jowiya e colaboradores (2015), que demonstraram que a amilase pancreática é capaz de proteger *C. jejuni* de condições de estresse *in vitro* e ainda promover a formação de biofilmes. O uso de proteases e amilases consiste em estratégias antibiofilme alternativas às abordagens convencionais e apresentam maior eficiência sobre a prevenção da formação podendo ou não ser eficazes sobre o biofilme pré-formado (Sharma & Singh, 2018). Os autores deixaram evidente a atuação dessas enzimas sobre a inibição da formação do biofilme de todas as cepas avaliadas e também a efetividade sobre o biofilme pré-formado de algumas cepas pertencentes a Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae e Moraxellaceae. Em nosso estudo P3 inibiu a formação e degradou eficientemente biofilmes pré-formados de SA, mas não de MRSA, indicando que a característica é cepa dependente.

Ácido hipocloroso (P4) foi o produto que resultou em termos percentuais na maior atividade inibitória sobre a formação do biofilme de todas as cepas e com as menores variações, mas não foi capaz de degradar significativamente a matriz de biofilmes de CJ, APEC, SA E MRSA. O ácido hipocloroso (HOCl) apresenta atividade bactericida dependente da natureza dos componentes do meio, das variações no tempo de reação e exposição, assim como a temperatura de aplicação (Ashby et al., 2020). O uso do HOCl como biocida tem se tornado interessante devido a resiliência aos mecanismos de resistência conhecidos, no entanto, esse composto é instável por períodos prolongados (Mohamed et al., 2023). Embora os mecanismos de ação do HOCl contra os micro-organismos ainda não estejam totalmente elucidados, acredita-se que seja uma combinação de fatores como: agregação de proteínas induzida por oxidação, diminuição do ATP celular e inativação de chaperonas bacterianas excretadas em resposta ao estresse (Goemans & Collet, 2019). Trata-se de um agente com atividade diretamente tóxica e de amplo espectro (Del Rosso & Bhatia, 2018). Ashby e colaboradores (2020) afirmam que o destino do HOCl adicionado a meios complexos é ser diretamente eliminado, não promovendo nenhum efeito celular ou ser convertido em outra espécie reativa, que por sua vez poderá ser eliminada ou atuar sobre as bactérias. O biofilme maduro também compreende uma composição altamente complexa, e consequentemente, implica em dificuldade de atuação pelo HOCl, fato constatado em nosso estudo.

Palau e colaboradores (2022) demonstraram que em células planctônicas de isolados multirresistentes de *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Candida* spp. e *A. fumigatus*, HOCl apresentou efeito antimicrobiano rápido e intenso. Em biofilmes que cresceram em discos de silicone observaram que o HOCl foi capaz de penetrar nas camadas mais profundas do biofilme, erradicando-o completamente, mas isso não foi observado em nosso estudo em que os biofilmes se desenvolveram em placas de poliestireno. Raval et al. (2021) sugeriram que HOCl exerce atividade semelhante entre bactérias planctônicas e biofilme. No entanto, nossos resultados mostram diferentes porcentagens de redução na inibição da formação e degradação do biofilme pré-formado.

Nossos resultados demonstram a dificuldade de degradação dos biofilmes pré-formados de APEC, SC e MRSA por todos os produtos desenvolvidos. A prevenção e controle dessas estruturas são um desafio para os responsáveis pelo controle de qualidade de indústrias, equipes de combate a infecções hospitalares e desenvolvedores de produtos. Enfatizam também, a necessidade de focar em procedimentos que previnam sua formação, já que a destruição de biofilmes maduros é uma tarefa árdua e não facilmente realizável sem a aplicação de métodos abrasivos (Li et al., 2020).

5- Conclusões

Nossos resultados deixam evidente que tanto a composição dos biofilmes como a ação dos compostos químicos desenvolvidos na inibição e degradação dos biofilmes são características cepas dependente.

Há predominância de proteínas e carboidratos na composição da matriz extracelular, além de DNAe, que está presente em porcentagens inferiores em biofilmes pré-formados na maioria das cepas.

Em geral, o uso de um só produto não é eficaz para inibir/degradar biofilmes de diferentes espécies/cepas bacterianas. A eficiência dos quatro produtos em inibir a formação

do biofilme pelas cepas multirresistentes demonstrou que o uso do ácido hipocloroso resultou em maior atividade inibitória percentual. Já maiores percentuais de degradação variaram, sendo o Start Solvquat (solvente d-limoneno vegetal + quaternário) mais efetivo em MRSA, Start Tensoacid (base quaternário + ácido fosfórico) em CJ, APEC e PAO, Start Tensoenzim (blend de enzimas: protease + amilase) em EC, KPC e SA e Ácido Hipocloroso em AB, SC, SE e ST.

A comparação dos resultados de inibição da formação e degradação do biofilme permitem concluir que há proteção aos sanitizantes mediada pela matriz de biofilmes já formados, e assim, é mais efetivo o uso de procedimentos preventivos que corretivos para mitigação dos seus diferentes efeitos danosos à saúde pública e economia.

Financiamento

Projeto de inovação MAI-DAI do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, processo 403556/2020-1. Agradecemos também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para a execução deste estudo.

CRedit author statement

Jéssica Laura Miranda Peixoto: Análise estatística, Conceitualização, Metodologia, Investigação, Redação - Rascunho original

Rosanne Aparecida Capanema Ribeiro: Investigação, Metodologia, Redação – Revisão e Edição.

Gabriella Rayane Aparecida Ferreira: Investigação, Metodologia.

Belchiolina Beatriz Fonseca: Investigação, Metodologia.

Roberta Torres de Melo: Supervisão, Redação – Revisão e Edição, Administração de Projetos, Aquisição de financiamento.

Daise Aparecida Rossi: Supervisão, Redação – Revisão e Edição, Administração de Projetos, Aquisição de financiamento.

Declaration of competing interest

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou relações pessoais conhecidas que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Referências

- Abebe, G. M. (2020). The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- Adcox, H. E., Vasicek, E. M., Dwivedi, V., Hoang, K. V, Turner, J., & Gunn, J. S. (2016). *Salmonella* Extracellular Matrix Components Influence Biofilm Formation and Gallbladder Colonization. *Infection and Immunity*, 84(11), 3243–3251. <https://doi.org/10.1128/IAI.00532-16>
- Alshraideh, N. H., Kelly, S. A., Thompson, T. P., Flynn, P. B., Tunney, M. M., & Gilmore, B. F. (2020). Extracellular polymeric substance-mediated tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to atmospheric pressure nonthermal plasma treatment. *Plasma Processes and Polymers*, 17, 1–8. <https://doi.org/10.1002/ppap.202000108>
- Arias-Moliz, M. T., Ferrer-Luque, C. M., Espigares-Rodríguez, E., Liébana-Ureña, J., & Espigares-García, M. (2008). Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 106(2), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.04.002>
- Ashby, L. V., Springer, R., Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (2020). Evaluating the bactericidal action of hypochlorous acid in culture media. *Free Radical Biology and Medicine*, 159(1), 119–124. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.07.033>
- Auria, E., Deschamps, J., Briandet, R., Dupuy, B. (2023). Extracellular succinate induces spatially organized biofilm formation in *Clostridioides difficile*. *Biofilm*, 5, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100125>
- Ball, A. L., Augenstein, E. D., Wienclaw, T. M., Richmond, B. C., Freestone, C. A., Lewis, J. M., Thompson, J. S., Pickett, B. E., & Berges, B. K. (2022). Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms via crystal violet binding and biochemical composition assays of isolates from hospitals, raw meat, and biofilm-associated gene mutants. *Microbial Pathogenesis*, 167, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105554>
- Bandeira, M., Borges, V., Gomes, J. P., Duarte, A., & Jordao, L. (2017). Insights on *Klebsiella pneumoniae* biofilms assembled on different surfaces using phenotypic and genotypic approaches. *Microorganisms*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020016>
- Birk, S. E., Boisen, A., & Nielsen, L. H. (2021). Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 174, 30–52. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.005>
- Brown, H. L., Hanman, K., Reuter, M., Betts, R. P., & van Vliet, A. H. M. (2015). *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00699>
- Brown, H. L., Reuter, M., Salt, L. J., Cross, K. L., Betts, R. P., & van Vliet, A. H. M. (2014). Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 7053–7060. <https://doi.org/10.1128/AEM.02614-14>
- Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2021). Extracellular DNA (eDNA). A major ubiquitous element of the bacterial biofilm architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22169100>

- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. B., & Jabbouri, S. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 125–132. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0790-y>
- Chaves, A. P., Zeferino, R. C. F., Oliveira, G. de P., Zambiasi, E. T., Enderle, M. C., Kempka, A. P., & Moroni, L. S. (2020). Atividade antimicrobiana do urucum, ácido fosfórico e biomax D® contra *Listeria Monocytogenes* em salsicha / antimicrobial activity of urucum, phosphoric acid and biomax D® against *Listeria Monocytogenes* in sausage. *Brazilian Journal of Development*, 6(11), 90084–90096. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-426>
- Chen, S., Zhang, D., Roberts, A. J., Lu, H. C., Cannon, C. L., Qin, Q. M., & Figueiredo, P. de. (2021). Host protease activity on bacterial pathogens promotes complement and antibiotic-directed killing. *Pathogens*, 10(11), 1–8. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111506>
- Christen, V., Faltermann, S., Brun, N. R., Kunz, P. Y., & Fent, K. (2017). Cytotoxicity and molecular effects of biocidal disinfectants (quaternary ammonia, glutaraldehyde, poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride PHMB) and their mixtures in vitro and in zebrafish eleuthero-embryos. *Science of The Total Environment*, 586, 1204–1218. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.02.114>
- Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., Howell, P. L., Wozniak, D. J., Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol*, 14(8), 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>
- Del Rosso, J. Q & Bhatia, N. (2018). Status Report on Topical Hypochlorous Acid: Clinical Relevance of Specific Formulations, Potential Modes of Action, and Study Outcomes. *JOURNAL OF CLINICAL AND AESTHETIC DERMATOLOGY*, 11(11), 36–39.
- Desai, S., Sanghrajka, K., & Gajjar, D. (2019). High Adhesion and Increased Cell Death Contribute to Strong Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 8(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040277>
- El-Hamid, M. I. A., El-Naenaeey, E.-S. Y., Kandeel, T. M., Hegazy, W. A. H., Mosbah, R. A., Nassar, M. S., Bakhrebah, M. A., Abdulaal, W. H., Alhakamy, N. A., & Bendary, M. M. (2020). Promising Antibiofilm Agents: Recent Breakthrough against Biofilm Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(667), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics9100667>
- Evstigneeva, S. S., Chumakov, D. S., Tumskiy, R. S., Khlebtsov, B. N., & Khlebtsov, N. G. (2023). Detection and imaging of bacterial biofilms with glutathione-stabilized gold nanoclusters. *Talanta*, 264(May), 124773. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124773>
- Gambino, E., Maione, A., Guida, M., Albarano, L., Carraturo, F., Galdiero, E., & Onofrio, V. Di. (2022). Evaluation of the Pathogenic-Mixed Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus* and Treatment with Limonene on Three Different Materials by a Dynamic Model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijerph19063741>

- Gasser, M., Zingg, W., Cassini, A., & Kronenberg, A. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in Switzerland. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 17–18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30708-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30708-4)
- Genteluci, G. L. (2020). RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DE *Acinetobacter baumannii*. In *PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ*.
- Goemans, C. V., & Collet, J. F. (2019). Stress-induced chaperones: A first line of defense against the powerful oxidant hypochlorous acid [version 1; peer review: 4 approved]. *F1000Research*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19517.1>
- González-Bello, C. (2017). Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(18), 4221–4228. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027>
- Graf, A. C., Leonard, A., Schäuble, M., Rieckmann, L. M., Hoyer, J., Maass, S., Lalk, M., Becher, D., Pané-Farré, J., & Riedel, K. (2019). Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(6), 1036–1053. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA118.001120>
- Guo, N., Bai, X., Shen, Y., & Zhang, T. (2023). Target-based screening for natural products against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(14), 2216–2230. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1972280>
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021). Journey of limonene as an antimicrobial agent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3), 1094–1110. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.01>
- Jowiya, W., Brunner, K., Abouelhadid, S., Hussain, H. A., Nair, S. P., Sadiq, S., Williams, L. K., Trantham, E. K., Stephenson, H., Wren, B. W., Bajaj-Elliott, M., Cogan, T. A., Laws, A. P., Wade, J., Dorrell, N., & Allan, E. (2015). Pancreatic Amylase Is an Environmental Signal for Regulation of Biofilm Formation and Host Interaction in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 83(12), 4884–4895. <https://doi.org/10.1128/IAI.01064-15>
- Kim, M. J., & Kim, J. S. (2022). Enhanced inactivation of *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms on the stainless steel surface by proteinase K in the combination with chlorine. *Food Control*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108519>
- Kudirkiene, E., Cohn, M. T., Stabler, R. A., Strong, P. C. R., Serniene, L., Wren, B. W., Nielsen, E. M., Malakauskas, M., & Brøndsted, L. (2012). Phenotypic and genotypic characterizations of *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler meat production process. *Current Microbiology*, 65(4), 398–406. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0170-z>
- Lahiri, D., Nag, M., Dey, A., Pandit, S., Joshi, S., Upadhye, V. J., & Ray, R. R. (2022). Citrus Essential Oils: a Treasure Trove of Antibiofilm Agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(10), 4625–4638. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04033-0>
- Lahiri, D., Nag, M., Sarkar, T., Dutta, B., & Ray, R. R. (2021). Antibiofilm Activity of α -Amylase from *Bacillus subtilis* and Prediction of the Optimized Conditions for Biofilm Removal by Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Network (ANN). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(6), 1853–1872. <https://doi.org/10.1007/S12010->

021-03509-9

- Ledwoch, K., Dancer, S. J., Otter, J. A., Kerr, K., Roposte, D., Rushton, L., Weiser, R., Mahenthiralingam, E., Muir, D. D., & Maillard, J. Y. (2018). Beware biofilm! Dry biofilms containing bacterial pathogens on multiple healthcare surfaces; a multi-centre study. *Journal of Hospital Infection*, 100(3), e47–e56. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.028>
- Lemos, A. S. O., Campos, L. M., Melo, L., Guedes, M. C. M. R., Oliveira, L. G., Silva, T. P., Melo, R. C. N., Rocha, V. N., Aguiar, J. A. K., Apolônio, A. C. M., Scio, E., & Fabri, R. L. (2018). Antibacterial and Antibiofilm Activities of Psychorubrin, a Pyranonaphthoquinone Isolated From *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *Frontiers in Microbiology*, 9(724), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00724>
- Li, Y., Xiao, P., Wang, Y., & Hao, Y. (2020). Mechanisms and control measures of mature biofilm resistance to antimicrobial agents in the clinical context. *ACS Omega*, 5(36), 22684–22690. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>
- Lv, X., Wang, L., Mei, A., Xu, Y., Ruan, X., Wang, W., Shao, J., Yang, D., & Dong, X. (2023). Recent Nanotechnologies to Overcome the Bacterial Biofilm Matrix Barriers. *Small*, 19(6), 1–17. <https://doi.org/10.1002/sml.202206220>
- Ma, L., Feng, J., Zhang, J., & Lu, X. (2022). *Campylobacter bio* 2 *lms*. 264(June).
- Matilla-Cuenca, L., Gil, C., Cuesta, S., Rapún-Araiz, B., Žiemytė, M., Mira, A., Lasa, I., & Valle, J. (2020). Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75929-2>
- Melo, R. T., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Siqueira, M. C., Pereira, C. B., Peres, P. A. B. M., Fernandez, H., & Rossi, D. A. (2017). Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>
- Mohamed, A., Raval, Y. S., Gelston, S., Tibbits, G., Ay, S. U., Flurin, L., Greenwood-Quaintance, K. E., Patel, R., & Beyenal, H. (2023). Antibiofilm Activity of a Tunable Hypochlorous Acid-Generating Electrochemical Bandage Controlled by a Wearable Potentiostat. *Advanced Engineering Materials*, 25(1). <https://doi.org/10.1002/adem.202200792>
- Müsken, M., Di Fiore, S., Römling, U., & Häussler, S. (2010). A 96-well-plate-based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application to susceptibility testing. *Nature Protocols*, 5(8), 1460–1469. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.110>
- Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M. C., & Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 585–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x>
- Nie, D., Hu, Y., Chen, Z., Li, M., Hou, Z., Luo, X., Mao, X., & Xue, X. (2020). Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *Journal of Biomedical Science*, 27(26), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-0617-7>
- Nunez, C., Kostoulas, X., Peleg, A., Short, F., & Qu, Y. (2023). A comprehensive comparison of biofilm formation and capsule production for bacterial survival on hospital surfaces. *Biofilm*, 5(January). <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100105>

- O'Neill, J. (2016). Book review: Tackling drug-resistant infections globally. In *Review on Antimicrobial Resistance* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- Palau, M., Muñoz, E., Lujan, E., Larrosa, N., Gomis, X., Márquez, E., ... & Gavalda, J. (2022). *In Vitro* and *In Vivo* Antimicrobial Activity of Hypochlorous Acid against Drug-Resistant and Biofilm-Producing Strains. *Microbiology Spectrum*, 10(5). https://doi.org/10.11250/chemotherapy1953.36.Supplement8_13
- Prado, M., Silva, E. J. N. L. da, Duque, T. M., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., Almeida, J. F. A. de, & Gomes, B. P. F. de A. (2015). Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *Journal of Applied Oral Science*, 23(2), 158–163. <https://doi.org/10.1590/1678-775720130691>
- Raval, Y. S., Flurin, L., Mohamed, A., Greenwood-Quaintance, K. E., Beyenal, H., & Patel, R. (2021). *In vitro* antibacterial activity of hydrogen peroxide and hypochlorous acid, including that generated by electrochemical scaffolds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(5), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01966-20>
- Ray, R. R., & Pattnaik, S. (2023). Contribution of phytoextracts in challenging the biofilms of pathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 48(September 2022), 102642. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102642>
- Rybtke, M., Jensen, P. Ø., Nielsen, C. H., & Tolker-Nielsen, T. (2021). The Extracellular Polysaccharide Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Is a Determinant of Polymorphonuclear Leukocyte Responses. *Infection and Immunity*, 89(1), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/IAI.00631-20>
- Saverina, E. A., Frolov, N. A., Kamanina, O. A., Arlyapov, V. A., Vereshchagin, A. N., & Ananikov, V. P. (2023). From Antibacterial to Antibiofilm Targeting: An Emerging Paradigm Shift in the Development of Quaternary Ammonium Compounds (QACs). *ACS Infectious Diseases*, 9, 394–422. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00469>
- Schambach, B. T., Berrang, M. E., Harrison, M. A., & Meinersmann, R. J. (2014). Chemical additive to enhance antimicrobial efficacy of chlorine and control cross-contamination during immersion chill of broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 77(9), 1583–1587. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-092>
- Sharma, K., & Pagedar Singh, A. (2018). Antibiofilm effect of DNase against single and mixed species biofilm. *Foods*, 7(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods7030042>
- Singh, A. K., Yadav, S., Chauhan, B. S., Nandy, N., Singh, R., Neogi, K., Roy, J. K., Srikrishna, S., Singh, R. K., & Prakash, P. (2019). Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Frontiers in Microbiology*, 10(669), 1–23. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00669>
- Solis-Velazquez, O. A., Gutiérrez-Lomelí, M., Guerreño-Medina, P. J., Rosas-García, M. de L., Iñiguez-Moreno, M., & Avila-Novoa, M. G. (2021). Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54, 1038–1047. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2020.07.002>
- Song, J., Kong, H., & Jang, J. (2011). Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 651–656.

<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2010.10.027>

- Tong, C., Hu, H., Chen, G., Li, Z., Li, A., & Zhang, J. (2021). Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research*, 195(February). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110897>
- Tursi, S. A; Tükel, Ç. (2018). Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition, Immune Recognition, and Disease Implications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(4), 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-18>.
- Upmanyu; Haq; Singh. (2022). Current Research in Microbial Sciences Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation : opportunities for developing therapeutics. *Current Research in Microbial Sciences*, 3(March).
- Windham, I. H., Servetas, S. L., Whitmire, J. M., Pletzer, D., Hancock, R. E. W., & Merrell, D. S. (2018). *Helicobacter pylori* biofilm formation is differentially affected by common culture conditions, and proteins play a central role in the biofilm matrix. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(14), 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00391-18>
- Han, Y., Sun, Z., Chen, W. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 25(33), 1–15. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25010033>
- Yamabe, K., Arakawa, Y., Shoji, M., Miyamoto, K., Tsuchiya, T., Minoura, K., Akeda, Y., Tomono, K., & Onda, M. (2022). Enhancement of *Acinetobacter baumannii* biofilm growth by cephem antibiotics via enrichment of protein and extracellular DNA in the biofilm matrices. *Journal of Applied Microbiology*, 133(3), 2002–2013. <https://doi.org/10.1111/jam.15712>

Anexo I



FOOD CONTROL

An official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST).

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Food Control is an international journal that publishes manuscripts resulting from original scientific investigation into significant food safety and food quality concerns and preventative control measures that improve public health. Manuscripts submitted to this journal should document the problem of concern, proper hypothesis, experimental design, data analysis, and interpretation of the observed results, supported by relevant statistical analysis. The research should have an international scope, not limiting to local issues.

The journal focuses on postharvest human food safety and quality issues and welcomes submissions related to the areas of interest listed below:

Microbial contaminants and food safety - causes and control measures, including isolation, detection, and intervention methods
 Chemical and biochemical contaminants (mycotoxins included) - causes and control measures, including isolation, detection, and intervention methods
 Food safety preventative control measures, including process development, HACCP, food safety objectives, quality assurance, and good manufacturing practices
 Food safety risk assessment
 Codes of practice, legislation and international harmonization
 Consumer training and education
 Food Authentication and Traceability

The scope of *Food Control* is comprehensive and includes original research papers, authoritative reviews, short communications, comment articles that report on new developments in food control, and position papers.

The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#).

AUDIENCE

All managers, scientists, technologists, and legislators working in the food industry today.

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology
 Web of Science
 Research Alert
 Current Contents
 FSTA (Food Science and Technology Abstracts)
 Bulletin of the International Institute of Refrigeration
 Food Safety Microfile
 Scopus
 CAB International
 CAB Health
 Science Citation Index
 Science Citation Index Expanded

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Ralf Greiner, Max Rubner-Institute Federal Research Institute of Nutrition and Food, Karlsruhe, Germany

Editors

Andrea Armani, University of Pisa, Department of Veterinary Sciences, Pisa, Italy
 Seafood traceability, Species identification based on DNA methods, Seafood inspection, seafood zoonotic parasites, Food legislation, toxic fish species

Li Bai, Jilin University, Changchun, China

Consumer behavior, Food safety, Food handling behavior, Risk communication, Intervention and behavior change

Fernando Cámara-Martos, University of Cordoba, Department of Food Science and Technology, Córdoba, Spain
 Trace elements, heavy metals, bioaccessibility, spectroscopy, Glucosinolates, Isothiocyanates, Foods, Atomic absorption spectroscopy, Atomic fluorescence spectroscopy, Bioavailability

Lihan Huang, USDA-ARS Residue Chemistry and Predictive Microbiology Research, Wyndmoor, Pennsylvania, United States of America

Qinchun Rao, Florida State University, Tallahassee, Florida, United States of America

Food and Nutrition, Food Science, Food Chemistry, Food Quality, Food Safety, Protein Analysis

Hyun-Gyun Yuk, Korea National University of Transportation College of Health and Life Science, Chungcheongbuk-do, South Korea

Bacterial stress response, Bacterial membrane, Stress genes, nonthermal technology, light-emitting diodes, pulsed light, ultraviolet, sanitation, biofilm, real-time PCR, light emitting diode (LED), rapid detection (IMS), fruits and vegetables, RT-PCR, produce sanitizers, biofilms, ,

Weibiao Zhou, National University of Singapore, Department of Food Science and Technology, Singapore, Singapore

Functional food processing, Food systems engineering, Emerging food processing technology, Oral processing and in vitro digestion, Baking

Consulting Editors

Geoffrey Campbell-Platt, University of Reading, Reading, United Kingdom

Fermented Foods; Food Control; Food Safety, Fermented Foods, Food Control, Food Safety, Fermentation

Joseph Jen, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, California, United States of America

Editorial Board Members

Debabrata Biswas, University of Maryland, College Park, Maryland, United States of America

Foodborne bacterial Infections; Salmonella, Campylobacter, Probiotics, and Prebiotics

Alan Candlish, Glasgow Caledonian University, Glasgow, United Kingdom

Wei Chen, Jiangnan University School of Food Science and Technology, Wuxi, China

Zhao Chen, University of Maryland, College Park, Maryland, United States of America

Food microbiology, Bacterial genomics, Bacterial stress response

Zhixia (Grace) Chen

Food chemistry, Food safety, Food quality, Health and nutrition, Analytical method

Daniele Conficoni, ATS Insubria Dipartimento Veterinario e Sicurezza degli alimenti di origine animale, Varese, Italy

Food safety, *Listeria monocytogenes*, heavy metals, antimicrobial resistance

María Coronel, National Scientific and Technical Research Council, Buenos Aires, Argentina

Mycotoxins, Exposure assessment, Method validation, Non-thermal technologies for food preservation, Fungal inactivation

Daniel Cozzolino, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia

NIR, chemometrics, infrared, multivariate analysis, electronic noses, food, agriculture, animal nutrition, biochemistry

Diogo da Cunha, State University of Campinas School of Applied Sciences, Limeira, Brazil

Food services, food safety behavior, consumer's study, risk perception, food safety practices

Tian Ding, Zhejiang University, Hangzhou, China

Nonthermal processing technology, Foodborne pathogens, Quantitative microbial risk assessment

Carlos Manuel Franco, University of Santiago de Compostela, Department of Analytical Chemistry Nutrition and Food Science, Santiago de Compostela, Spain

Listeria, *Salmonella*, Biofilm, Antimicrobial Resistance, Mycotoxins, Food Science

Joseph Frank, University of Georgia, Athens, Georgia, United States of America

Listeria monocytogenes, biofilms, bacterial attachment, *Salmonella* in low water activity foods, pathogen control in food processing environments

Elżbieta Górka-Horczyzak, University of Warsaw, Warszawa, Poland

Chromatography, NIR, Volatile Compounds, Food Control, Quality Control

Joshua Gurtler, USDA-ARS, Wyndmoor, Pennsylvania, United States of America

Fruit and vegetable safety, internalization of foodborne pathogens into fresh produce, irrigation water, crop soil microbiology, low water activity foods, egg microbiology, poultry microbiology, antimicrobial compounds and produce washes, pulsed electric fields, intervention technologies

Chi-Tang Ho, Rutgers University, Department of Food Science, New Brunswick, New Jersey, United States of America

Chemistry of natural product

Ravi Jadeja, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, United States of America

Yanhong Liu, US, Department of Agriculture Molecular Characterization of Foodborne Pathogens Research Unit, Wyndmoor, Pennsylvania, United States of America

Foodborne pathogen detection (real-time PCR and LAMP), Functional genomics (microarrays and RNA-Seq), *E. coli* O antigens, *L. monocytogenes*, and Bacterial stress responses

Friedrich-Karl Lücke, Fulda University of Applied Sciences, Fulda, Germany

Federico Marini, University of Rome La Sapienza, Department of Chemistry, Roma, Italy

Chemometrics, Spectroscopy, Machine learning

Marios Mataragas, Institute of Technology of Agricultural Products, Athens, Greece

Food Microbiology, Predictive Microbiology, Molecular Microbiology, Bioinformatics, Statistical Quality Control

Gerald Moy, Food Safety Consultants International, Genève, Switzerland

Souheib Oueslati, University of Tunis, Tunis, Tunisia

Food Quality, Food Safety, Mycotoxins, Mass Spectrometry, Microbiology

Predrag Putnik, University North, Department of Food Technology, Koprivnica, Croatia

Food Processing Advanced Technologies, Phytochemistry and Extraction Technologies, Statistics and Research Methodology, Chemometrics and Data Analysis, Sustainability

Delia Rodriguez Amaya, Cidade Universitária, Campinas, Brazil

Xian-Ming Shi, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

Keith Warriner, University of Guelph, Department of Food Science, Guelph, Ontario, Canada

Microbiological safety of minimally processed vegetables (alfalfa sprouts, tomatoes), interaction of human pathogens with vegetables, non-thermal intervention technologies (UV, biocontrol, bacteriophages), produce sanitizers, HACCP, pathogen diagnostics (biosensors, immunoassays), microbial source tracking (DNA typing)

Aibo Wu, Institute for Nutritional Sciences Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

Małgorzata Ziarno, Warsaw University of Life Sciences, Warszawa, Poland

Milk technology, food microbiology, functional food, probiotics and prebiotics, food production hygiene

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Food Control is an international journal that provides essential information for those involved in food safety and process control.

Food Control covers:

Microbial food safety and antimicrobial systems
Mycotoxins
Hazard analysis, HACCP and food safety objectives
Risk assessment, including microbial risk assessment
Quality assurance and control
Good manufacturing practices
Food process systems design and control
Food Packaging
Rapid methods of analysis and detection, including sensor technology
Environmental control and safety
Codes of practice, legislation and international harmonization
Consumer issues
Education, training and research needs.

The scope of *Food Control* is comprehensive and includes original research papers, authoritative reviews, short communications, comment articles that report on new developments in food control, and position papers.

The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication.

Types of paper

Word limits for each article type do not include references. Original high-quality research papers (preferably no more than 7000 words, including tables and illustrations). Major review articles, up to 10,000 words. Short communications of up to 3000 words (not including references), describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. Short reviews on topical subjects, up to 6000 words. Comment articles not exceeding 2000 words. Authoritative position papers from expert groups are also welcome.

The Editor-in-Chief has the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) of insufficient novelty for a wide international readership; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

All contributions deemed suitable for review are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referees' reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

Contact details for submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal <https://www.editorialmanager.com/foodcont/default.aspx> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
 - All figures (include relevant captions)
 - All tables (including titles, description, footnotes)
 - Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files*(where applicable)
Supplemental files(where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's [AI policy for authors](#).

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important

for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The [CRediT taxonomy](#) includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. [More details and an example.](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [Language Editing service](#) available from Elsevier's Language Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in Editorial Manager, or a department.

Suggesting reviewers

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and Methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Key Resources Table

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. More information is available here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

•**Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

•**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

•**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Mathematical and technical settings

Use the appropriate number of significant figures to express your data - they should be justifiable and reflect the necessary level of accuracy of the method. A normal maximum should be 3 - e.g. 37.1, 2.53). Detailed mathematical discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be typewritten. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page. Special symbols should be identified in the margin, and the meaning of all symbols should be explained in the text where they first occur. If you use several symbols, a list of definitions (not necessarily for publication) will help the editor. Type mathematical equations exactly as they should appear in print. Journal style for letter symbols is as follows: italic (indicated by underlining); constants, roman type; matrices and vectors, bold type (indicated by wavy underlining).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use

reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-3215-4, copies of which may be [ordered online](#).

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, Article e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style* (4th ed.). Longman (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Powertech Systems. (2015). *Lithium-ion vs lead-acid cost analysis*. Retrieved from <http://www.powertechsystems.eu/home/tech-corner/lithium-ion-vs-lead-acid-cost-analysis/>. Accessed January 6, 2016

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., & Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). *The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales*. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S. (2020, March 25). *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a [Research Elements journal](#).

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#)..

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>