

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MONYQUE NEVES OLIVEIRA DOS SANTOS

POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Escherichia coli* E
***Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO NO**
ESTADO DE SANTA CATARINA

LAGES, SC

MONYQUE NEVES OLIVEIRA DOS SANTOS

**POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Escherichia coli* E
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO NO
ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sandra Maria Ferraz.

LAGES, SC

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática
da Biblioteca Setorial CAV/UDESC,
com dados fornecidos pela autora.**

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado, pelo constante apoio e encorajamento.

AGRADECIMENTOS

Concluir esta dissertação é, sem dúvida, uma das maiores conquistas da minha vida, mas ela não teria sido possível sem o apoio, a presença e o amor de pessoas especiais que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada. Escrever estes agradecimentos é uma tarefa carregada de emoção, pois cada linha representa a gratidão que carrego no coração por todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este momento se tornasse realidade.

Agradeço, primeiramente, a Deus. A Ele, que é a base de tudo na minha vida, que me sustentou nas madrugadas em claro, nos momentos de dúvida, nos dias de exaustão e nas horas em que pensei em desistir. Foi a fé que me manteve firme, foi a oração que me deu forças, e foi a certeza de que Ele nunca me desampara que me guiou até aqui.

Aos meus pais, minha eterna fonte de inspiração. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada gesto de cuidado e por cada renúncia feita em nome do meu futuro. O amor e a dedicação de vocês me ensinaram o valor do esforço, da honestidade e da perseverança. Sei que nem sempre foi fácil, mas nunca me faltou apoio. Levo comigo tudo o que aprendi com vocês, e espero poder retribuir, ainda que minimamente, todo o amor que recebi.

Aos meus avós, exemplos de força, ternura e sabedoria. Vocês são a base da nossa família, e mesmo com a simplicidade das palavras, sempre souberam me confortar, me ensinar e me mostrar o que realmente importa na vida. Obrigada pelo carinho, pelas orações silenciosas e pelo amor que transborda.

À minha orientadora, expresso minha imensa gratidão por sua dedicação, paciência e confiança no meu trabalho. Sua orientação foi essencial para que eu conseguisse trilhar esse caminho com mais segurança. Obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento, por me guiar com firmeza e por compreender as minhas limitações. Cada sugestão e cada correção foram fundamentais para o amadurecimento deste trabalho e, principalmente, para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

À minha gerente da Diag Labor, que, com muita generosidade, me incentivou, me apoiou e acreditou na minha capacidade. Sua compreensão, suas palavras de encorajamento e o apoio que me ofereceu foram fundamentais para que eu

conseguisse conciliar minha vida profissional com essa etapa tão desafiadora. Minha gratidão por ter feito parte desse processo e por ter sido uma peça tão importante nessa conquista.

À minha irmã, companheira de todas as horas. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos bons e, principalmente, nos momentos difíceis. Sua presença é um conforto constante na minha vida. Sua amizade, seu apoio e seu amor são bênçãos que carrego comigo todos os dias. Que nossa conexão permaneça forte e inabalável por toda a vida.

Ao meu namorado, que caminhou comigo durante toda essa etapa, obrigada por sua paciência, carinho e apoio incondicional. Você segurou minha mão quando eu quis parar, me motivou quando faltou ânimo e celebrou comigo cada pequena conquista como se fosse sua. Sua parceria foi um presente precioso durante essa caminhada.

Por fim, a todos que, de alguma forma, torceram por mim, me ouviram, me acolheram e me ajudaram, o meu muito obrigada. Esta conquista não é só minha, é de todos que fizeram parte dela.

Gratidão é a palavra que define este momento. Que ela permaneça viva em mim, hoje e sempre.

"E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como ao Senhor, e não aos homens." (Colossenses 3:23)

RESUMO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) é um produto tradicional brasileiro de forte relevância cultural, econômica e social para as famílias produtoras das regiões de altitude de Santa Catarina. Produzido a partir de leite cru, sem adição de fermentos comerciais, e maturado em prateleiras de madeira, o QAS apresenta características sensoriais únicas resultantes de práticas artesanais transmitidas por gerações. Entretanto, o uso de leite cru e a ausência de tratamento térmico no processo produtivo requerem atenção quanto à presença de microrganismos patogênicos com capacidade de formar biofilmes, estruturas que conferem maior resistência a antimicrobianos e dificultam a eliminação bacteriana. Entre os microrganismos de maior relevância nesse contexto, destacam-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambos relatados como formadores de biofilme em superfícies de processamento de alimentos e em produtos lácteos. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença de genes relacionados à formação de biofilme e a expressão do fenótipo de produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* previamente isoladas de leite cru, prateleiras de madeira de maturação e queijo artesanal serrano, bem como em cepas de *Escherichia coli* isoladas de prateleiras de madeira de maturação e queijo artesanal serrano. Foram analisadas 110 cepas bacterianas, sendo 76 de *S. aureus* e 34 de *E. coli*. A caracterização fenotípica foi realizada pelo método do Ágar Vermelho Congo (Congo Red Agar, CRA), e a análise genotípica pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), visando detectar os genes *icaA*, *icaD* e *icaC* em *S. aureus* e *fimC*, *papG* e *crl* em *E. coli*. Os resultados revelaram que 82,9% (63/76) das cepas de *S. aureus* e 67,6% (23/34) das cepas de *E. coli* apresentaram capacidade fenotípica de formação de biofilme, sugerindo adaptação dessas espécies aos ambientes estudados. Na análise molecular, 51,3% (39/76) das cepas de *S. aureus* apresentaram genes do operon *ica*, com maior prevalência do gene *icaD* (51,3%), seguido pelo *icaA* (34,2%). Em relação à *E. coli*, 82,3% (28/34) das cepas portavam os genes *crl* (70,6%) e/ou *fimC* (52,9%), enquanto o gene *papG* não foi detectado. Esses achados contribuem para uma compreensão mais aprofundada da microbiota característica do ambiente artesanal, evidenciando que a formação de biofilmes é um fator relevante na interação entre os microrganismos e as superfícies de madeira e de processamento. Conclui-se que o detalhamento desse potencial genético e fenotípico não representa um entrave à

tradição, mas sim uma ferramenta de suporte ao produtor. O monitoramento contínuo e o refinamento das boas práticas de fabricação permitem a otimização dos processos de higienização, garantindo a manutenção da qualidade superior e a consolidação da segurança do Queijo Artesanal Serrano como um produto de excelência no mercado nacional.

Palavras-chave: Biofilmes; Queijo Artesanal Serrano; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; genes ica; PCR.

ABSTRACT

Serrano Artisanal Cheese (QAS) is a traditional Brazilian product with strong cultural, economic, and social relevance for producing families in the high-altitude regions of Santa Catarina. Produced from raw milk, without the addition of commercial starters, and ripened on wooden shelves, QAS presents unique sensory characteristics resulting from artisanal practices passed down through generations. However, the use of raw milk and the absence of thermal treatment in the production process require attention regarding the presence of pathogenic microorganisms capable of forming biofilms, structures that confer greater resistance to antimicrobials and hinder bacterial elimination. Among the most relevant microorganisms in this context, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* stand out, both reported as biofilm formers on food processing surfaces and in dairy products. This study aimed to investigate the presence of genes related to biofilm formation and the expression of the biofilm production phenotype in *Staphylococcus aureus* strains previously isolated from raw milk, wooden ripening shelves, and Serrano artisanal cheese, as well as in *Escherichia coli* strains isolated from wooden ripening shelves and Serrano artisanal cheese. A total of 110 bacterial strains were analyzed: 76 of *S. aureus* and 34 of *E. coli*. Phenotypic characterization was performed using the Congo Red Agar (CRA) method, and genotypic analysis through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, aimed at detecting the *icaA*, *icaD*, and *icaC* genes in *S. aureus*, and *fimC*, *papG*, and *crl* in *E. coli*. The results revealed that 82.9% (63/76) of *S. aureus* strains and 67.6% (23/34) of *E. coli* strains exhibited a phenotypic capacity for biofilm formation, demonstrating an adaptation of these species to the studied environments. In the molecular analysis, 51.3% (39/76) of *S. aureus* strains presented genes from the *ica* operon, with the highest prevalence of the *icaD* gene (51.3%), followed by *icaA* (34.2%). Regarding *E. coli*, 82.3% (28/34) of the strains carried the *crl* (70.6%) and/or *fimC* (52.9%) genes, while the *papG* gene was not detected. These findings provide a deep understanding of the characteristic microbiota of the artisanal environment, showing that biofilm formation is a relevant factor in the interaction between microorganisms and wooden and processing surfaces. It is concluded that detailing this genetic and phenotypic potential does not represent an obstacle to tradition, but rather a support tool for the producer. Continuous monitoring and the refinement of

Good Manufacturing Practices allow for the optimization of hygiene processes, ensuring the maintenance of superior quality and consolidating the safety of Serrano Artisanal Cheese as a product of excellence in the national market.

Keywords: Biofilms; Serrano Artisanal Cheese; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; ica genes; PCR.

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de biofilme em <i>Staphylococcus aureus</i> .	56
Tabela 2-Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de biofilme em <i>Escherichia coli</i> .	57
Tabela 3-Characterização Fenotípica e Genotípica de <i>Staphylococcus aureus</i> (n=76)	59
Tabela 4-Characterização Fenotípica e Genotípica de <i>Escherichia coli</i> (n=34)	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
CRA	Congo Red Agar (Ágar Vermelho Congo)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares (Extracellular Polymeric Substances)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIA	Polissacarídeo de adesão intercelular (Polysaccharide Intercellular Adhesin)
PNAG	Poli-N-acetilglucosamina
QAS	Queijo Artesanal Serrano
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RpoS	Fator sigma de resposta ao estresse
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Queijo artesanal Serrano em Santa Catarina.....	19
2.2 Principais microrganismos	22
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	22
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	25
2.3 Biofilmes.....	26
2.4 Método do ágar vermelho congo para detecção de biofilme	28
2.5 Detecção de genes associados a biofilme por PCR	31
3. REFERÊNCIAS.....	34
4 OBJETIVOS	44
4.1 GERAL	44
4.2 ESPECÍFICO.....	44
5 ARTIGO - POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO NO ESTADO DE SANTA CATARINA.	45
5.1 RESUMO.....	45
5.2 INTRODUÇÃO	47
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	48
5.3.1 Amostragem	48
5.3.2 Avaliação Fenotípica para Formação de Biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	49
5.3.3 Extração de Material Genético	49
5.3.4 Pesquisa de Genes Relacionados à Produção de Biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i>	50
5.3.5 Pesquisa de genes relacionados à produção de biofilme por <i>Escherichia coli</i>	51
5.4 RESULTADOS.....	54
5.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	54
5.4.2 <i>Escherichia coli</i>	55
5.5 DISCUSSÃO	57
5.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	57
5.5.2 <i>Escherichia coli</i>	59
5.5.3 Implicações para a cadeia produtiva do queijo serrano	62
5.6 CONCLUSÃO	64
5.7 AGRADECIMENTOS.....	65
5.8 REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O queijo artesanal serrano representa um patrimônio cultural e econômico de inestimável valor para as famílias produtoras da região serrana de Santa Catarina, constituindo-se como símbolo de identidade regional e importante fonte de sustento para comunidades rurais que preservam técnicas tradicionais transmitidas através de gerações (MELO et al., 2013; PONTAROLO et al., 2017).

Produzido majoritariamente em pequenas propriedades familiares, este queijo de leite cru maturado carrega consigo não apenas sabor e características sensoriais únicas, mas também a história e o modo de vida das populações serranas, representando geração de renda, manutenção das famílias no campo e valorização do trabalho artesanal (DUARTE et al., 2014; PONTAROLO et al., 2017).

Neste contexto, a busca pelo reconhecimento oficial do produto, incluindo movimentos para certificação e indicação geográfica, reflete o esforço coletivo de produtores, pesquisadores e instituições em valorizar e proteger esta tradição (DALMINA et al., 2020). Entretanto, a produção de queijos artesanais a partir de leite cru, embora preserve características sensoriais únicas e a microbiota autóctone benéfica, também apresenta desafios relacionados à segurança microbiológica, especialmente quanto à presença de microrganismos patogênicos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (PERRY, 2004; FEITOSA et al., 2016).

Estes microrganismos, quando presentes no leite cru, nas superfícies de maturação ou no produto final, podem comprometer tanto a qualidade quanto a segurança alimentar do queijo, representando um obstáculo para a comercialização em maior escala e para o reconhecimento oficial do produto (MELO et al., 2013; DALMINA et al., 2020).

A compreensão dos mecanismos de persistência destes patógenos ao longo da cadeia produtiva torna-se, portanto, essencial para conciliar a preservação das práticas tradicionais com a garantia da inocuidade alimentar.

Nesse sentido, estudos realizados na região serrana de Santa Catarina têm documentado a dinâmica microbiológica do queijo artesanal ao longo do processo de maturação, evidenciando que a qualidade microbiológica do produto final é influenciada por múltiplos fatores, incluindo a qualidade inicial do leite cru, as

condições ambientais de maturação e as práticas adotadas nas queijarias (PERRY, 2004; MELO et al., 2013; DALMINA et al., 2020).

Pesquisas locais avaliaram amostras de queijo serrano em diferentes períodos de maturação (14 a 60 dias) e observaram variações na redução de indicadores microbianos, com resultados que apontam para a necessidade de compreensão mais aprofundada dos mecanismos de persistência microbiana (MELO et al., 2013; PONTAROLO et al., 2017).

Em levantamentos realizados em propriedades da serra catarinense, *S. aureus coagulase-positiva* e *E. coli* foram detectados em proporções significativas das amostras de leite cru, queijo e ambiente de maturação, mesmo após períodos de maturação, sinalizando oportunidades de otimização dos processos produtivos (MELO et al., 2013; PONTAROLO et al., 2017).

Corroborando com esses achados regionais, estudos nacionais com queijos artesanais brasileiros identificaram que isolados de *S. aureus* provenientes de ambientes de produção, leite e queijos apresentam elevada capacidade de aderência a superfícies e tolerância a agentes de limpeza convencionais, características que podem favorecer a persistência ambiental e a recontaminação do produto (MARTINS et al., 2016; ROSSI et al., 2018).

Estes achados, longe de representarem uma crítica à tradição produtiva, constituem informações valiosas que podem orientar estratégias de controle de qualidade e valorização do queijo serrano, contribuindo para que os produtores alcancem padrões de excelência reconhecidos e ampliem a confiança dos consumidores.

A persistência desses microrganismos está frequentemente associada à formação de biofilmes por bactérias em superfícies de contato com alimentos, um fenômeno científico de grande relevância para a compreensão da persistência microbiana em ambientes de produção artesanal, uma vez que células organizadas em biofilmes apresentam maior resistência a processos de higienização e podem atuar como reservatórios contínuos de microrganismos (ROSSI et al., 2018; CARRASCOSA et al., 2012).

No contexto da produção do queijo serrano, as prateleiras de maturação, frequentemente confeccionadas em madeira e submetidas a ciclos repetidos de uso, representam superfícies de particular interesse para investigação da formação de biofilmes por *E. coli* e *S. aureus*, microrganismos que, quando presentes no leite cru,

nas prateleiras ou no queijo, podem comprometer a qualidade microbiológica do produto e limitar seu potencial de comercialização (MELO et al., 2013; ROSSI et al., 2018).

Diante desse cenário, compreender os mecanismos de adesão, colonização e persistência de *E. coli* e *S. aureus* nas diferentes etapas da cadeia produtiva, desde o leite cru, passando pelas prateleiras de maturação, até o queijo maturado, é fundamental para o desenvolvimento de protocolos de higienização eficazes, adaptados à realidade das queijarias artesanais e para a proposição de medidas de controle que respeitem a tradição produtiva ao mesmo tempo em que assegurem a segurança alimentar (FEITOSA et al., 2016; DALMINA et al., 2020).

Neste contexto, a presente pesquisa investigou cepas de *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilme isoladas de leite cru, prateleiras de maturação e queijo artesanal serrano, bem como cepas de *Escherichia coli* isoladas de prateleiras de maturação e queijo artesanal serrano, com o objetivo de gerar conhecimento científico aplicado que possa subsidiar ações de capacitação, aprimoramento de Boas Práticas de Fabricação e fortalecimento da cadeia produtiva.

Assim, este estudo insere-se como ferramenta de apoio aos produtores, visando contribuir para a garantia da excelência e segurança do produto e, conseqüentemente, para o fortalecimento da cadeia produtiva e a ampliação do reconhecimento do queijo serrano no mercado nacional e internacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijo artesanal Serrano em Santa Catarina

O queijo artesanal serrano é um produto típico dos campos de altitude de Santa Catarina, representando uma importante expressão da cultura alimentar e da identidade regional do sul do Brasil (PONTAROLO et al., 2017). Produzido tradicionalmente a partir de leite cru de bovinos, este queijo constitui não apenas um alimento de valor nutricional, mas também um patrimônio cultural imaterial que reflete saberes e práticas transmitidos ao longo de gerações (SANTILLI, 2015).

A história do queijo serrano remonta ao ciclo do tropeirismo iniciado por volta de 1730, quando colonizadores portugueses trouxeram o conhecimento tradicional de fabricação de queijos, adaptando-o às condições locais. Este "saber-fazer" foi sendo moldado ao longo dos séculos pelas características específicas do território, incluindo o clima de altitude, as pastagens nativas e as raças bovinas adaptadas à região (FREITAS, 2016; SILVEIRA, 2018). Do ponto de vista econômico, mais de 2 mil famílias em Santa Catarina dedicam-se à produção deste queijo, sendo que para aproximadamente 90% delas o produto representa a principal ou a segunda fonte de renda familiar (PACHOUD; SCHERMER, 2019). A relação intrínseca entre a produção do queijo e a conservação dos campos nativos evidencia como práticas culturais tradicionais podem contribuir para a sustentabilidade ambiental e a manutenção da biodiversidade regional (VIEIRA et al., 2017; TRABAQUINI et al., 2019).

Considerando esta importância histórica, cultural e econômica, o processo de produção tradicional merece atenção especial. A principal característica na fabricação é a utilização do leite cru de bovinos, sem tratamento térmico prévio, proveniente de animais criados em sistema extensivo nos campos nativos (PONTAROLO et al., 2017). O processo segue técnicas tradicionais transmitidas entre gerações, caracterizando-se pela fabricação manual: coagulação do leite cru, corte da coalhada, dessoragem, prensagem e salga, seguidas pelo período de maturação (SOUZA et al., 2003). A maturação constitui etapa fundamental, durante a qual ocorrem transformações bioquímicas e microbiológicas que conferem ao produto suas características sensoriais distintivas. Dalmina et al. (2020) avaliaram o tempo mínimo de maturação antes da comercialização, considerando aspectos de segurança e qualidade, enquanto Ströher et al. (2024) demonstraram que a temperatura é fator

determinante na dinâmica microbiana durante a maturação.

Como resultado deste processo tradicional, o queijo serrano apresenta características físico-químicas que variam em função da composição do leite, das condições de fabricação e do tempo de maturação, refletindo a variabilidade inerente à produção artesanal (SOUZA et al., 2003; PONTAROLO et al., 2017). A microbiota é complexa e diversificada, incluindo bactérias lácticas, leveduras e fungos que contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais (DELAMARE et al., 2012; PEREIRA, 2019). O uso de leite cru e a maturação prolongada conferem características sensoriais únicas, apreciadas pelos consumidores e associadas à identidade do produto (DELAMARE et al., 2012).

Diante da relevância socioeconômica e cultural deste produto, o Estado de Santa Catarina desenvolveu marco regulatório específico para disciplinar sua produção e comercialização. A Lei nº 17.003, de 1º de setembro de 2016, representa o principal instrumento legal estadual sobre o queijo artesanal serrano, estabelecendo definições, requisitos de produção, condições de comercialização e responsabilidades dos produtores (SANTA CATARINA, 2016). Esta lei define o queijo artesanal serrano como aquele produzido na região delimitada dos Campos de Altitude da Serra Geral Catarinense, elaborado exclusivamente com leite cru integral de vaca, por métodos tradicionais, com vinculação ao terroir da região, e maturado por período mínimo estabelecido em regulamento. Posteriormente, o Decreto nº 1.238, de 19 de julho de 2017, regulamentou a Lei nº 17.003/2016, detalhando aspectos técnicos da produção, incluindo requisitos sanitários, procedimentos de registro de produtores, condições de infraestrutura das queijarias, critérios de qualidade da matéria-prima e do produto final, além de normas para rotulagem e rastreabilidade (SANTA CATARINA, 2017). O decreto estabelece que o período mínimo de maturação deve ser de 60 dias para queijos produzidos com leite cru, visando garantir a segurança microbiológica do produto.

Complementarmente, a Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018, dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências, estabelecendo diretrizes gerais aplicáveis a diferentes tipos de queijos artesanais catarinenses (SANTA CATARINA, 2018). Mais recentemente, a Lei nº 18.612, de 20 de janeiro de 2023, alterou a Lei nº 17.003/2016, introduzindo disposições sobre capacitação obrigatória de produtores e responsabilidade técnica, reforçando a importância da qualificação profissional para garantia da qualidade e

segurança dos produtos (SANTA CATARINA, 2023). A Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), órgão oficial de defesa sanitária animal do estado, desempenha papel fundamental na implementação desta legislação, sendo responsável pela fiscalização, registro de produtores, inspeção de estabelecimentos e certificação dos queijos artesanais serranos produzidos no estado (SANTA CATARINA, 2016; SANTA CATARINA, 2017; SANTA CATARINA, 2018; SANTA CATARINA, 2023).

Este conjunto de leis representa importante avanço no reconhecimento e valorização do queijo artesanal serrano, ao mesmo tempo em que estabelece parâmetros para garantir a segurança alimentar dos consumidores. No entanto, a adequação às exigências legais constitui desafio para muitos produtores tradicionais, especialmente considerando aspectos relacionados à infraestrutura das queijarias, controle de qualidade da matéria-prima e cumprimento de requisitos sanitários (SANTA CATARINA, 2016; SANTA CATARINA, 2017; SANTA CATARINA, 2018; SANTA CATARINA, 2023).

A qualidade e a segurança microbiológica do queijo artesanal serrano constituem preocupações centrais, especialmente considerando o uso de leite cru na fabricação. Pontarolo et al. (2017) avaliaram a qualidade e a segurança de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina, identificando não conformidades microbiológicas em relação a microrganismos indicadores e patogênicos. Melo, Dalmina, Pereira et al. (2013) evidenciaram a presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal e de patógenos em algumas amostras, demonstrando que contaminações durante o processo de produção e maturação impactam diretamente a qualidade do produto.

Entre os patógenos de maior preocupação destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Gnecco et al. (2024) identificaram a presença destes microrganismos acima do permitido pela legislação em amostras de queijos artesanais, sendo que 75% apresentaram coliformes a 35 °C, e isolaram cepas multirresistentes, indicando risco à saúde dos consumidores. A presença destes microrganismos pode estar relacionada a contaminações durante a ordenha, o processamento ou a maturação, evidenciando a necessidade de adoção de boas práticas de higiene em todas as etapas da cadeia produtiva (PONTAROLO et al., 2017).

Somando-se a isso a capacidade de *S. aureus* e *E. coli* de formar biofilmes em

superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na produção de queijos artesanais emerge como aspecto crítico que merece investigação aprofundada, pois os biofilmes conferem aos microrganismos maior resistência a agentes antimicrobianos e dificultam os processos de higienização, podendo representar fonte persistente de contaminação na cadeia produtiva do queijo artesanal serrano (ROSSI et al., 2018; CARRASCOSA et al., 2012).

2.2 Principais microrganismos

A produção de queijos artesanais envolve uma microbiota complexa, na qual coexistem microrganismos benéficos responsáveis pelas características sensoriais desejáveis e microrganismos patogênicos ou indicadores de contaminação que podem representar riscos à segurança alimentar. Entre os patógenos de maior relevância em produtos lácteos, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* destacam-se pela capacidade de colonizar diferentes pontos da cadeia produtiva, desde o leite cru até as superfícies de maturação, e pela habilidade de formar biofilmes que dificultam sua eliminação (CRAMTON et al., 1999; GÖTZ, 2002). O estudo desses microrganismos em cepas isoladas de leite cru, prateleiras de madeira de maturação e queijo artesanal serrano é fundamental para compreender os mecanismos moleculares de adesão e persistência no ambiente de produção artesanal.

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Staphylococcaceae*. Apresenta morfologia de cocos agrupados em forma de cachos de uva, catalase positiva e coagulase positiva, características que a diferenciam de outras espécies do gênero (GÖTZ, 2002). Este microrganismo é amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado na pele, mucosas e trato respiratório de humanos e animais, o que facilita sua introdução na cadeia produtiva de alimentos, incluindo o leite cru e os ambientes de processamento de queijos artesanais (MCMILLAN et al., 2016).

Além da capacidade de formar biofilmes, *S. aureus* pode produzir uma variedade de toxinas que contribuem para sua patogenicidade. Entre as principais

toxinas produzidas por esta espécie, destacam-se as enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), que atuam como superantígenos e são responsáveis por quadros de intoxicação alimentar eméticos (DINGES et al., 2000; FISHER et al., 2018).

Além das enterotoxinas clássicas, foram descritas numerosas enterotoxinas novas e enterotoxinas-símbles (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEIK a SEIY, entre outras), que ampliam o espectro de virulência da espécie (FISHER et al., 2018). *S. aureus* também produz hemolisinas, como a toxina alfa (alfa-hemolisina, codificada pelo gene *hla*) e a toxina beta (beta-hemolisina, codificada pelo gene *hly*), que medeiam a lise de células e participam da virulência em infecções teciduais (DINGES et al., 2000). Entretanto, a capacidade de produzir essas toxinas não é uniforme entre todas as cepas de *S. aureus*: os genes que codificam as enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, entre outros) estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, fagos e ilhas de patogenicidade, o que resulta em grande variabilidade entre as linhagens quanto ao repertório e ao nível de expressão de toxinas (JOHLER et al., 2016; FISHER et al., 2018).

Estudos de prevalência em isolados de alimentos, incluindo leite cru e queijos, demonstraram que a frequência de genes de enterotoxinas varia amplamente entre regiões e tipos de alimentos, com taxas que podem atingir 50% ou mais dos isolados em alguns levantamentos (AFIFI et al., 2011; MACHADO et al., 2020), enquanto outros reportam frequências mais baixas (KORPYSA-DZIRBA; OSEK, 2011). Essa heterogeneidade genética e fenotípica explica por que algumas cepas de *S. aureus* causam surtos de intoxicação alimentar, enquanto outras, mesmo pertencendo à mesma espécie, não produzem enterotoxinas detectáveis (HENNEKINNE et al., 2012).

A capacidade de *S. aureus* de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas é mediada principalmente pela síntese de polissacarídeo de adesão intercelular (PIA, do inglês *polysaccharide intercellular adhesin*), também denominado poli-N-acetilglucosamina (PNAG) (ARCIOLA et al., 2015). A produção deste exopolissacarídeo é codificada pelo operon *ica* (*intercellular adhesion*), composto pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, organizados em um único locus cromossômico (CRAMTON et al., 1999).

O gene *icaA* codifica uma N-acetilglucosaminiltransferase responsável pela síntese de oligômeros de β -1,6-N-acetilglucosamina, enquanto *icaD* codifica uma

proteína que potencializa a atividade enzimática de IcaA, sendo essencial para a produção de cadeias longas de PIA (CRAMTON et al., 1999; GÖTZ, 2002). O gene *icaC* está envolvido na exportação do polissacarídeo através da membrana celular, e *icaB* participa da desacetilação parcial do polímero, conferindo carga positiva à molécula e facilitando sua interação com superfícies carregadas negativamente (ARCIOLA et al., 2015).

A expressão do operon *ica* é regulada por múltiplos fatores ambientais e genéticos. Condições de anaerobiose, comuns em biofilmes maduros e em nichos de maturação de queijos, induzem a expressão de *icaADBC* e aumentam a produção de PIA (CRAMTON et al., 2001). O repressor transcricional *IcaR* liga-se à região promotora do operon *ica* e inibe sua transcrição; a identificação de uma sequência de 5 nucleotídeos crítica para a ligação de IcaR ao DNA permitiu compreender melhor o controle negativo da formação de biofilme (JEFFERSON et al., 2003). Além disso, reguladores globais como *SarA* desempenham papel essencial na ativação da transcrição de *icaADBC*, sendo demonstrado que *SarA*, e não o fator sigma alternativo σB , é indispensável para o desenvolvimento de biofilme em *S. aureus* (VALLE et al., 2003).

Estudos mais recentes identificaram cascatas regulatórias complexas, nas quais o fator *Rbf* ativa o regulador *SarX*, que por sua vez é necessário para a expressão de *icaADBC* e formação de biofilme (CUE et al., 2013). A descoberta de novos repressores do locus *ica* em isolados clínicos produtores de biofilme ampliou o entendimento sobre a diversidade de mecanismos regulatórios em diferentes linhagens de *S. aureus* (YU et al., 2017).

A formação de biofilmes por *S. aureus* em superfícies de processamento de alimentos, incluindo prateleiras de madeira utilizadas na maturação de queijos artesanais, representa um desafio para o controle microbiológico. A matriz extracelular do biofilme, composta por PIA/PNAG, proteínas e DNA extracelular, confere proteção contra agentes antimicrobianos e sanitizantes, dificultando a eliminação das células bacterianas (O'GARA, 2007; ARCIOLA et al., 2015).

Estudos demonstraram que compostos como o ácido gálico podem exercer efeito anti-biofilme específico sobre *S. aureus* ao regular negativamente a expressão do operon *ica* (LIU et al., 2017). Além disso, a inibição da N-acetilglucosaminiltransferase, enzima-chave na síntese de PIA, pode aumentar a suscetibilidade de biofilmes de *S. aureus* a agentes antimicrobianos (SIALA et al.,

2016).

No contexto da produção de queijos artesanais, cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru, prateleiras de madeira de maturação e do próprio queijo podem apresentar variabilidade na capacidade de formar biofilmes, dependendo da presença e funcionalidade do operon *ica* e de seus reguladores (ARCIOLA et al., 2006; MELO et al., 2013). A caracterização molecular dessas cepas, incluindo a detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC*, é fundamental para avaliar o potencial de persistência ambiental e o risco associado à contaminação cruzada durante o processo produtivo.

2.2.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Apresenta morfologia de bastonetes curtos, é catalase positiva e oxidase negativa, constituindo parte da microbiota comensal de humanos e animais homeotérmicos (JAY, 2005; MADIGAN et al., 2016). Embora a maioria das linhagens de *E. coli* não seja patogênica, sua presença em produtos lácteos é monitorada como um importante indicador das condições de higiene e das práticas de manipulação durante o processamento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A capacidade da *E. coli* de interagir com superfícies e compor biofilmes é mediada por estruturas de adesão, especialmente as fímbrias (ou pili), que facilitam a colonização de nichos bióticos e abióticos (BELOIN et al., 2008). Entre os fatores de adesão mais estudados, destacam-se as fímbrias tipo 1 e as fímbrias P (pap, pyelonephritis-associated pili). O gene *fimC* codifica uma chaperona periplasmática indispensável para a montagem correta das fímbrias tipo 1, as quais promovem a adesão inicial em superfícies e são cruciais para a estabilidade do biofilme em ambientes de processamento (KLEMM, 1992; PRATT; KOLTER, 1998). Já o gene *papG* codifica a adesina localizada na extremidade das fímbrias P, sendo responsável pelo reconhecimento específico de receptores glicolipídicos (LINDBERG et al., 1987).

A regulação dessas estruturas envolve uma rede complexa de fatores transcricionais. O gene *crl* codifica uma proteína que atua como um modulador do fator sigma alternativo (*RpoS*), coordenando a expressão de genes voltados à

resposta ao estresse e à síntese da matriz extracelular (BOUGDOUR et al., 2004). A proteína *Crl* aumenta a afinidade de *RpoS* pela RNA polimerase, o que potencializa a produção de curli e outros componentes essenciais para a arquitetura do biofilme (HENGGE, 2009).

No contexto do Queijo Artesanal Serrano, a identificação dos genes *fimC*, *papG* e *crl* em cepas isoladas de prateleiras de maturação e do queijo contribui para compreender como esses microrganismos podem persistir no ambiente produtivo. Esse achado não deve ser interpretado como característica intrinsecamente negativa do produto, mas como informação técnica relevante para o aprimoramento das Boas Práticas de Fabricação (BPF). A caracterização do potencial de formação de biofilmes auxilia os produtores no refinamento dos protocolos de higienização, garantindo a preservação da tradição artesanal com elevados padrões de segurança e qualidade (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

2.3 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas complexas caracterizadas por células bacterianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por uma matriz extracelular de origem microbiana (DUFOUR et al., 2010; HØIBY et al., 2010). Essa organização estruturada representa uma forma emergente de vida bacteriana, na qual os microrganismos exibem comportamentos cooperativos e propriedades fenotípicas distintas daquelas observadas em células planctônicas (FLEMMING et al., 2016).

A capacidade de formar biofilmes é amplamente distribuída entre espécies bacterianas patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, constituindo um importante fator de virulência associado a infecções persistentes e crônicas (BEAUDOIN et al., 2016; MAUNDERS et al., 2017).

A matriz polimérica extracelular (MPE), também denominada matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), constitui o principal componente estrutural dos biofilmes, representando aproximadamente 90% da biomassa total (NADELL et al., 2016; FLEMMING et al., 2016). Essa matriz é composta predominantemente por água (cerca de 97%), além de exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos extracelulares (eDNA) e lipídios (MAUNDERS et al., 2017; KANWAR et al., 2019; PINTO et al., 2020). Os exopolissacarídeos e proteínas formam uma fase

gel que confere estabilidade mecânica e estrutural ao biofilme, promovendo a ancoragem das células bacterianas à superfície e entre si (MAUNDERS et al., 2017; KANWAR et al., 2019). O DNA extracelular desempenha funções cruciais na adesão inicial, agregação celular e coesão da matriz, contribuindo para a estabilização da arquitetura tridimensional do biofilme (NADELL et al., 2016; PINTO et al., 2020; SINGH et al., 2021). Além de sua função estrutural, a MPE atua como barreira protetora contra agentes antimicrobianos, resposta imune do hospedeiro e condições ambientais adversas (FERRERES et al., 2023; ZHAO et al., 2023).

O processo de formação de biofilmes é dinâmico e ocorre em estágios sequenciais bem definidos. Inicialmente, ocorre a adesão bacteriana reversível à superfície, mediada por interações físico-químicas fracas, seguida pela adesão irreversível, na qual estruturas de superfície bacteriana, como fímbrias e adesinas, estabelecem ligações mais fortes com o substrato (DUFOR et al., 2010; KANWAR et al., 2019; ABBAS et al., 2025). Subsequentemente, as células aderidas proliferam e formam microcolônias, iniciando a produção da matriz extracelular (FLEMMING et al., 2016; KANWAR et al., 2019).

Durante a fase de maturação, o biofilme desenvolve uma arquitetura tridimensional complexa, caracterizada por canais de água que facilitam o transporte de nutrientes e a remoção de metabólitos (NADELL et al., 2016; FERRERES et al., 2023; ZHAO et al., 2023). A regulação desses processos envolve sistemas de comunicação celular, como o *quorum sensing*, e mensageiros secundários, como o diguanilato cíclico (c-di-GMP), que modulam a expressão de genes relacionados à formação e manutenção do biofilme (MAUNDERS et al., 2017; KANWAR et al., 2019; ABBAS et al., 2025). Por fim, ocorre a dispersão de células planctônicas a partir do biofilme maduro, permitindo a colonização de novos sítios e a disseminação da infecção (FLEMMING et al., 2016; FERRERES et al., 2023).

A organização em biofilmes confere às bactérias resistência significativamente aumentada aos agentes antimicrobianos, representando um desafio clínico importante no tratamento de infecções (HØIBY et al., 2010; GRANDE et al., 2020; URUÉN et al., 2020). Múltiplos mecanismos contribuem para essa resistência. A matriz extracelular atua como barreira física que limita a difusão e penetração de antibióticos, reduzindo a concentração efetiva do fármaco nas camadas mais profundas do biofilme (HØIBY et al., 2010; NADELL et al., 2016; PINTO et al., 2020; POWELL et al., 2021). A heterogeneidade metabólica dentro do biofilme, com células em diferentes estados

fisiológicos, resulta em populações de crescimento lento ou metabolicamente inativas nas regiões mais profundas, onde a disponibilidade de oxigênio e nutrientes é limitada (KANWAR et al., 2019; GRANDE et al., 2020).

Essas células, denominadas células persistentes, apresentam tolerância intrínseca a antibióticos que dependem de processos metabólicos ativos para exercer sua ação bactericida (BEAUDOIN et al., 2016; URUÉN et al., 2020; FERRERES et al., 2023). Adicionalmente, a comunicação via *quorum sensing* regula a expressão de genes de virulência e resistência, enquanto a transferência horizontal de genes facilita a disseminação de determinantes de resistência antimicrobiana entre as células do biofilme (JORGE et al., 2019; GRANDE et al., 2020; SINGH et al., 2021; ABBAS et al., 2025). A combinação desses mecanismos resulta em níveis de resistência que podem ser de 10 a 1000 vezes superiores aos observados em células planctônicas da mesma espécie (HØIBY et al., 2010; MITTAL, 2019).

A detecção da capacidade de formação de biofilmes por isolados bacterianos é fundamental para a caracterização fenotípica e avaliação do potencial patogênico (FREEMAN et al., 1989; ARCIOLA et al., 2002).

2.4 Método do ágar vermelho congo para detecção de biofilme

Entre os métodos fenotípicos disponíveis para a detecção da capacidade de formação de biofilme por bactérias, destaca-se o uso do Ágar Vermelho Congo (Congo Red Agar; CRA). O método CRA é uma técnica fenotípica amplamente utilizada para a detecção qualitativa da formação de biofilme, especialmente em estafilococos, sendo também empregado em estudos com outras bactérias de interesse em alimentos (MELO, P. C. et al., 2013; VASIL et al., 2017). A metodologia se baseia na produção de uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, como o polissacarídeo intercelular de adesão (PIA), que interage com o corante Congo Red presente no meio, resultando na formação de colônias escuras, de coloração preta ou vermelho intensa, indicativas de produção de *slime* e biofilme (DHANAWADE et al., 2010; MELO et al., 2013).

O princípio do método consiste em cultivar isolados bacterianos em meio ágar suplementado com o corante Congo Red e avaliar a morfologia e coloração das colônias para inferir a produção de *slime* ou biofilme, frequentemente associada à

síntese de PIA/PNAG (MELO et al., 2013; ABDEL HALIM et al., 2018). Colônias produtoras de *slime* exibem coloração escura (preta) ou mucóide no CRA, o que é interpretado como presumível produção de PIA/PNAG, enquanto colônias não produtoras apresentam coloração vermelha ou rosa (MELO et al., 2013; GÜNGÖR et al., 2023). Variações na composição do meio, como a suplementação com sacarose ou glicose, e diferenças nos protocolos de incubação podem alterar a reprodutibilidade e a correlação com marcadores genotípicos (LOS et al., 2010; VASIL et al., 2017).

Woznicová, Votava e Skalka (1993 apud MELO et al., 2013) relataram sensibilidade de 85% e especificidade de 99% para o CRA em comparação com o método de Christensen para detecção de biofilme em estafilococos coagulase-negativos. Vasil et al. (2017) observaram sensibilidade de 94,44% e especificidade de 66,66% para *S. aureus* isolados de leite ovino, utilizando o método de microtitulação como referência. Por outro lado, Abdel Halim et al. (2018) reportaram sensibilidade muito baixa (0,9%) e especificidade de 97,4% para estafilococos clínicos quando comparado ao método de cultura em placa de tecido (*tissue culture plate*), indicando que o CRA pode apresentar baixa sensibilidade para isolados com produção fraca de biofilme ou mecanismos *ica*-independentes.

Estudos que avaliaram a aplicação do CRA em isolados de origem alimentar mostraram que seu desempenho depende da espécie. Güngör et al. (2023) avaliaram 135 isolados de origem alimentícia e observaram que a sensibilidade do CRA foi alta para *S. aureus* (~97%), mas muito baixa para *E. coli* (~13%), recomendando a complementação com métodos quantitativos, como o ensaio de microplaca, para maior confiabilidade. Esses resultados indicam que o CRA é mais eficaz para a triagem de produtores de biofilme em *Staphylococcus* spp. do que em *E. coli*, devido a diferenças na composição da matriz extracelular e nos mecanismos de adesão entre essas espécies (MELO et al., 2013; GÜNGÖR et al., 2023).

Correlações estatísticas entre a presença de genes do operon *ica* (*icaA*, *icaD*, *icaADBC*) e o fenótipo positivo no CRA foram observadas em diversos estudos, indicando que colônias CRA-positivas frequentemente coincidem com a produção de PIA/PNAG detectada por métodos genotípicos ou imunoquímicos (ARCIOLA et al., 2006; DHANAWADE et al., 2010). Entretanto, isolados que formam biofilme por mecanismos *ica*-independentes, como aqueles mediados por proteínas de superfície (MSCRAMMs), podem escapar à detecção pelo CRA, resultando em falsos negativos (AHMAD et al., 2022).

O CRA apresenta limitações importantes: a variabilidade nos resultados dependendo da formulação do meio e das condições de incubação, a natureza qualitativa (não quantitativa) do teste, e a baixa sensibilidade para produtores fracos de biofilme ou para isolados de espécies como *E. coli* (VASIL et al., 2017; ABDEL HALIM et al., 2018; GÜNGÖR et al., 2023).

Diante dessas limitações, embora métodos fenotípicos como o CRA permitam uma triagem inicial eficiente, a confirmação da capacidade de formação de biofilme pode ser aprimorada por meio da identificação de genes associados à produção da matriz extracelular e à adesão bacteriana (ARCIOLA et al., 2006; DHANAWADE et al., 2010; LOS et al., 2010).

Nesse contexto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada para a detecção genotípica de genes relacionados à formação de biofilmes, oferecendo maior especificidade e sensibilidade na caracterização dos isolados (ARCIOLA et al., 2006; DHANAWADE et al., 2010; LOS et al., 2010). A combinação de métodos fenotípicos (CRA e ensaio de microtitulação) com métodos genotípicos (PCR para genes *icaA*, *icaD*, *fimC*, *papG*, *crl*) é recomendada para uma caracterização mais completa do potencial de formação de biofilme em cepas isoladas ao longo da cadeia produtiva do queijo artesanal serrano (ARCIOLA et al., 2006; MELO et al., 2013).

2.5 Detecção de genes associados a biofilme por PCR

Genes associados à formação de biofilme podem ser detectados por diferentes abordagens de PCR, incluindo PCR convencional, PCR multiplex e PCR em tempo real (qPCR). A escolha do método depende da finalidade da análise, sensibilidade desejada e infraestrutura laboratorial disponível. A PCR convencional é amplamente utilizada para a identificação de loci do operon *ica* (*icaA*, *icaD*, *icaC* e genes adjacentes) em *Staphylococcus spp.*, com protocolos que amplificam fragmentos específicos e permitem comparar perfis genotípicos entre isolados clínicos e ambientais (BALLAH et al., 2022).

Estudos aplicaram esta técnica a coleções numerosas de isolados e correlacionaram a presença de genes *ica* com a capacidade de formação de biofilme em testes fenotípicos, demonstrando frequência variável entre populações de

diferentes origens (ARCIOLA et al., 2005; HOVEIDA et al., 2019). Em isolados de alimentos, os genes *icaA* e *icaD* foram detectados em proporções variadas, com frequências que podem atingir 35,7% para *icaA* e 26,2% para *icaD* em estafilococos de diferentes fontes alimentares (BALLAH et al., 2022). A coexpressão de *icaA* e *icaD* é necessária para a síntese plena do polissacarídeo intercelular de adesão (PIA), de modo que a presença isolada de um gene pode não predizer totalmente a produção de biofilme (HOVEIDA et al., 2019).

A PCR multiplex tem sido implementada para detectar vários genes do operon *ica* (e outros alvos) em uma única reação, reduzindo tempo e reagentes para análises em larga escala (ARCIOLA et al., 2005; DEMIR et al., 2020; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2023). Um protocolo multiplex foi desenvolvido para detectar as cinco unidades do locus *ica* (*icaR*, *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*) e aplicado a 400 isolados clínicos, correlacionando perfil genético e produção de biofilme (ARCIOLA et al., 2005). Protocolos específicos para *icaABCD* também foram utilizados em isolados de *S. capitis*, inclusive em amostras fenotipicamente não formadoras de biofilme, demonstrando que a presença dos genes não garante necessariamente a expressão fenotípica (BERTELLONI et al., 2018).

Estudos validaram protocolos multiplex comparando-os com testes fenotípicos, como o Ágar Vermelho Congo, mostrando utilidade em triagens epidemiológicas e investigações de surtos (ARCIOLA et al., 2005). As vantagens incluem a redução de tempo e materiais, a capacidade de triagem ampla e a geração de perfis de presença/ausência por isolado; entretanto, a técnica requer otimização cuidadosa de primers e condições de reação para evitar competição entre amplicões e falso-negativos por inibição preferencial (ARCIOLA et al., 2005; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2023).

Nos métodos de PCR convencional e multiplex, o produto amplificado é visualizado por eletroforese em gel de agarose utilizando-se corantes intercalantes fluorescentes de alta sensibilidade e segurança, como o SYBR Safe ou o GelRed, em substituição ao tradicional brometo de etídio devido à sua toxicidade e potencial mutagênico (LUNN; SANSONE, 1987). A análise é realizada mediante a comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados com marcadores de peso molecular e a validação por meio de controles positivos e negativos (ARCIOLA et al., 2005; DEMIR et al., 2020; VISHOVAN et al., 2021).

A literatura demonstra que métodos genotípicos (PCR convencional e

multiplex) e fenotípicos (Ágar Vermelho Congo, método de microtitulação) são complementares, uma vez que frequentemente apresentam discordância entre si (ZMANTAR et al., 2006; AZMI et al., 2019). Casos foram reportados em que isolados portavam genes *ica* mas não apresentavam biofilme espontâneo em condições padrão, ou vice-versa, o que indica regulação variável da expressão gênica e dependência de estímulos ambientais (ZMANTAR et al., 2006; ARCIOLA et al., 2005).

Estudos em produtos alimentícios detectaram altas taxas de capacidade de formar biofilme por métodos fenotípicos, com porcentagens variáveis de detecção de genes *ica* por PCR em leite, laticínios e outros alimentos (FERREIRA et al., 2014; VISHOVAN et al., 2021; BALLAH et al., 2022). A PCR pode identificar predisposição genética com boa especificidade para o operon *ica*, mas não substitui ensaios fenotípicos, porque a expressão do fenótipo pode ser induzida ou silenciada, afetando a sensibilidade funcional em condições de cultivo (ZMANTAR et al., 2006; ARCIOLA et al., 2005).

Para vigilância em ambientes de produção de alimentos e investigação clínica, a combinação de triagem molecular (PCR convencional ou multiplex) com ensaios fenotípicos (método de microtitulação e Ágar Vermelho Congo) fornece um retrato mais completo da capacidade de formação de biofilme e do risco de persistência ou contaminação (FERREIRA et al., 2014; BALLAH et al., 2022; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2023).

A identificação fenotípica e genotípica da capacidade de formação de biofilme em bactérias isoladas de ambientes de produção de alimentos é fundamental não apenas para fins diagnósticos e de pesquisa, mas também para embasar estratégias de controle microbiológico, especialmente em contextos de produção artesanal, onde a persistência de microrganismos formadores de biofilme em superfícies de maturação pode representar um desafio para a segurança alimentar (FERREIRA et al., 2014; AZMI et al., 2019; BALLAH et al., 2022).

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, H. A. et al. Understanding the Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance: Defensive Strategies and Clinical Challenges. In: INTECHOPEN (Ed.). *Antimicrobial Stewardship - New Insights*. London: IntechOpen, 2025. DOI: 10.5772/intechopen.1009440.

ABDEL HALIM, R. M.; KASSEM, N. N.; MAHMOUD, B. S. Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, v. 6, n. 8, p. 1335-1341, 2018. DOI: 10.3889/OAMJMS.2018.246.

AFIFI, A.; KAMAL, R. M.; SALAMA, S. S.; KHATER, D. F. Enterotoxin genes and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw milk and some dairy products. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, v. 6, n. 2, p. 182-190, 2011.

AHMAD, S.; RAHMAN, H.; QASIM, M. et al. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis: interplay of *icaADBC* operon and MSCRAMMs in biofilm formation of isolates from pediatric bacteremia in Peshawar, Pakistan. *Medicina*, v. 58, n. 11, artigo 1510, 2022. DOI: 10.3390/medicina58111510.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, v. 23, n. 21, p. 4233-4239, 2002. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00171-0.

ARCIOLA, C. R.; GAMBERINI, S.; CAMPOCCIA, D.; VISAI, L.; SPEZIALE, P.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*: a survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 75, n. 2, p. 408-413, 2005. DOI: 10.1002/jbm.a.30445.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; BALDASSARRI, L. et al. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections: comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 76, n. 2, p. 425-430, 2006. DOI: 10.1002/JBM.A.30552.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; RAVAIOLI, S.; MONTANARO, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 5, artigo 7, 2015. DOI: 10.3389/FCIMB.2015.00007.

AZMI, K.; QREI, W.; ABDEEN, Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics*, v. 20, artigo 578, 2019. DOI: 10.1186/S12864-019-5929-1.

BALLAH, F. M.; ISLAM, M. S.; RANA, M. et al. Phenotypic and genotypic detection of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from different food sources in Bangladesh. *Biology*, v. 11, n. 7, artigo 949, 2022. DOI: 10.3390/biology11070949.

BEAUDOIN, T. et al. Infections With Biofilm Formation: Selection of Antimicrobials and Role of Prolonged Antibiotic Therapy. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 35, n. 6, p. 655-661, 2016. DOI: 10.1097/INF.0000000000001144.

BELOIN, C. et al. *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 322, p. 249-289, 2008.

BERTELLONI, F.; TOSI, G.; FIORENTINI, L. et al. Molecular characterisation and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates from the dairy production chain in Northern Italy. *International Dairy Journal*, v. 89, p. 13-19, 2018. DOI: 10.1016/J.IDAIRYJ.2018.10.002.

BOUGDOUR, A. et al. Crl, a low temperature-induced protein, stimulates RpoS activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 19, p. 19540-19550, 2004.

CARRASCOSA, C.; SAAVEDRA, P.; MILLÁN, R.; JABER, J. R.; PÉREZ, E.; GRAU, R.; RAPOSO, A.; MAURICIO, C.; SANJUÁN, E. Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies: comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods. *Food Control*, v. 28, n. 2, p. 368-373, 2012. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.001.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; GAJEWSKA, J.; ZAKRZEWSKI, A. et al. Molecular analysis of pathogenicity, adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) and biofilm genes of coagulase-negative staphylococci isolated from ready-to-eat food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 20, n. 2, artigo 1375, 2023. DOI: 10.3390/ijerph20021375.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.; NICHOLS, W. W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999.

CRAMTON, S. E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F.; DÖRING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 6, p. 4079-4085, 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.6.4079-4085.2001.

CUE, D.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. Activation of *sarX* by *Rbf* is required for biofilm formation and *icaADBC* expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 7, p. 1515-1524, 2013. DOI: 10.1128/JB.00012-13.

DALMINA, K. A.; PARUSSOLO, L.; SFACIOTTE, R. A. P.; FERRAZ, S. M.; MELO, F. D. Evaluation of minimum ripening time of artisanal mountain cheese from Santa Catarina prior to selling. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 41, n. 5, p. 1613-1626, 2020.

DELAMARE, A. P. L. et al. Microbiological, Physico-Chemical and Sensorial Characteristics of Serrano, an Artisanal Brazilian Cheese. *Food and Nutrition Sciences*, v. 3, n. 8, p. 1142, 2012.

DEMIR, C. et al. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from wound infections. *Mikrobiyoloji Bulteni*, v. 54, n. 1, p. 40-54, 2020. DOI: 10.5578/mb.68830.

DHANAWADE, N. B.; KALOREY, D. R.; SRINIVASAN, R. et al. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*, v. 34, n. 1, p. 81-89, 2010. DOI: 10.1007/S11259-009-9326-0.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000. DOI: 10.1128/CMR.13.1.16.

DUARTE, A. C.; SILVA, F. L.; CARNEIRO, L. C.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Caracterização da produção de queijo artesanal serrano em Santa Catarina: aspectos socioeconômicos e tecnológicos. *Agropecuária Catarinense*, v. 27, n. 3, p. 61-66, 2014.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, v. 22, n. 1, p. 2-16, 2010. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Qualidade higiênico-sanitária de queijos artesanais comercializados no Brasil: revisão.

Pubvet, v. 10, n. 11, p. 830-837, 2016.

FERREIRA, A. A.; TETTE, P. A. S.; MENDONÇA, R. C. S. et al. Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology*, v. 34, n. 4, p. 710-716, 2014. DOI: 10.1590/1678-457X.6446.

FERRERES, G.; IVANOVA, K.; IVANOV, I.; TZANOV, T. Nanomaterials and Coatings for Managing Antibiotic-Resistant Biofilms. *Antibiotics*, v. 12, n. 2, art. 310, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12020310.

FISHER, E. L.; OTTO, M.; CHEUNG, G. Y. C. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, artigo 436, 2018. DOI: 10.3389/FMICB.2018.00436.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989. DOI: 10.1136/jcp.42.8.872.

FREITAS, M. Q. Queijo com história e identidade. In: FREITAS, M. Q. et al. *Queijos artesanais brasileiros: tradição e inovação*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

GNECCO, J.; LINEMANN DA SILVA, P. B.; PIRES, K.; PARUSSOLO, L. Qualidade microbiológica de queijos e salames artesanais comercializados em Florianópolis, Santa Catarina. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2024.

GÖTZ, F. *Staphylococcus and biofilms*. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x

GRANDE, R.; NISTICO, L.; SAMBANTHAMOORTHY, K.; LONGWELL, M.; IANNITELLI, A.; CELLINI, L.; DI STEFANO, A. Antibiotic resistance and bacterial biofilm. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 30, n. 12, p. 897-900, 2020. DOI: 10.1080/13543776.2020.1830060.

GÜNGÖR, G.; GÜNGÖR, C.; ERTAŞ ONMAZ, N. et al. Çeşitli gıda kaynaklı patojenik bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespitinde Kongo Kırmızısı Agar'ın etkinliğinin değerlendirilmesi. *Bozok Veterinary Sciences*, v. 4, n. 1, p. 23-29, 2023. DOI: 10.58833/bozokvetsci.1287983.

HENGGE, R. Proteolysis of σ^S (RpoS) and the General Stress Response in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, v. 3, n. 2, 2009.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

HOVEIDA, L.; HALAJI, M.; ROSTAMI, S. et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus* spp isolated from different foodstuff products. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità*, v. 31, n. 2, p. 133-141, 2019. DOI: 10.7416/AI.2019.226.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. *Porto Alegre: Artmed*, 2005.

JEFFERSON, K. K.; CRAMTON, S. E.; GÖTZ, F.; PIER, G. B. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Molecular Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 889-899, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03482.x.

JOHLER, S.; SIHTO, H.-M.; MACORI, G.; STEPHAN, R. Sequence variability in staphylococcal enterotoxin genes *seb*, *sec*, and *sed*. *Toxins*, v. 8, n. 6, artigo 169, 2016. DOI: 10.3390/TOXINS8060169.

JORGE, P.; PÉREZ-PÉREZ, M.; PÉREZ RODRÍGUEZ, G.; PEREIRA, M. O.; LOURENÇO, A. Antimicrobial resistance three ways: healthcare crisis, major concepts and the relevance of biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 95, n. 10, fiz115, 2019. DOI: 10.1093/femsec/fiz115.

KANWAR, S.; SHARMA, O. P.; PURI, N. Enzymes as competent tool for efficient management of pathogen's biofilms. *Annals of Phytomedicine*, v. 8, n. 1, p. 56-68, 2019. DOI: 10.21276/ap.2019.8.1.8.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KLEMM, P. FimC, a chaperone-like periplasmatic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae. *Research in Microbiology*, v. 143, n. 9, p. 831-838, 1992.

KORPYSA-DZIRBA, W.; OSEK, J. Identification of genes encoding classical staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v. 55, p. 329-333, 2011.

LINDBERG, F. et al. PapG, the tip adhesin of antigen-specific-fimbriae of *Escherichia coli*. *Nature*, v. 328, n. 6125, p. 84-87, 1987.

LIU, M.; WU, X.; LI, J. et al. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food Control*, 2017. DOI: 10.1016/J.FOODCONT.2016.09.015.

LOS, R.; SAWICKI, R.; JUDA, M. et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 310, n. 2, p. 119-126, 2010. DOI: 10.1111/J.1574-6968.2010.02050.X.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. *Analytical Biochemistry*, v. 162, n. 2, p. 453-458, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90419-2.

MACHADO, V.; PARDO, L.; CUELLO, D. et al. Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food, food establishment surfaces and cases of foodborne diseases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 62, e5, 2020. DOI: 10.1590/S1678-9946202062005.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. *Porto Alegre: Artmed*, 2016.

MARTINS, K. B.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; RIBEIRO, G. M.; VASCONCELOS, L. H. C.; CARVALHO, A. F.; DANTAS, S. L. A.; SILVA, J. B. A.; PINHEIRO JUNIOR, J. W. Clonal profile, virulence and resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk and cheese in Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 144, p. 93-100, 2016.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, v. 364, n. 14, p. 119-120, 2017. DOI: 10.1093/femsle/fnx120.

MCMILLAN, K. E.; MOORE, S. C.; MCAULEY, C. M.; FEGAN, N.; FOX, E. M.

Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 169, 2016. DOI: 10.1186/S12866-016-0789-1.

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N.; RAMELLA, M. V.; BARCELLOS, V. C.; SFACIOTTE, R. A. P. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 41, p. 1-7, 2013.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A. et al. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 119-124, 2013. DOI: 10.1590/S1517-83822013005000031.

MITTAL, S. Biofilm and Antimicrobial Resistance. In: KON, K.; RAI, M. (Eds.). Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. *London: Academic Press*, 2019. p. 253-274. DOI: 10.1007/978-3-030-30757-8_18.

NADELL, C. D.; DRESCHER, K.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 589-600, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.84.

O'GARA, J. P. *ica and beyond*: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 270, n. 2, p. 179-188, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x.

PACHOUD, C.; SCHERMER, M. Reconciling tradition and innovation in traditional mountain cheese value chains: the role of social capital. The case of the artisanal Serrano cheese value chain in Southern Brazil. *Jahrbuch für Geschichte des ländlichen Raumes / Rural History Yearbook*, v. 16, p. 200-228, 2019.

PEREIRA, M. L. Queijo artesanal serrano: microbiota natural e qualidade em relação à aflatoxina M1 e sujidades. 2019. *Tese (Doutorado) – Universidade do Estado de Santa Catarina*, Lages, 2019.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINTO, R. M.; SOARES, F. A.; REIS, S.; NUNES, C.; VAN DIJCK, P. Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, art. 952, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00952.

PONTAROLO, G. H.; MELO, F. D.; MARTINI, C. L.; WILDEMANN, P.; ALESSIO, D. R. M.; SFACIOTTE, R. A. P.; THALER NETO, A.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. *Quality and safety of artisan cheese produced in the serrana region of Santa Catarina*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 38, n. 2, p. 739-748, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n2p739.

POWELL, L. C. et al. Quantifying the effects of antibiotic treatment on the extracellular polymer network of antimicrobial resistant and sensitive biofilms using multiple particle tracking. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 7, art. 13, 2021. DOI: 10.1038/s41522-020-00172-6.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, chemotaxis, and type 1 pili. *Molecular Microbiology*, v. 30, n. 2, p. 285-293, 1998.

ROSSI, G. A. M.; SILVA, H. O.; GAMEIRO, A. H.; TEIXEIRA, S. R. Biofilm formation and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese production environments in Brazil. *International Dairy Journal*, v. 85, p. 149-155, 2018.

SANTA CATARINA. Lei nº 17.003, de 1º de setembro de 2016. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis*, 2 set. 2016.

SANTA CATARINA. Decreto nº 1.238, de 19 de julho de 2017. Regulamenta a Lei nº 17.003, de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis*, 20 jul. 2017.

SANTA CATARINA. Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis*, 17 jan. 2018.

SANTA CATARINA. Lei nº 18.612, de 20 de janeiro de 2023. Altera a Lei nº 17.003, de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis*, 23 jan. 2023.

SANTILLI, J. O reconhecimento de comidas, saberes e práticas alimentares como patrimônio cultural imaterial. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, v. 10, n. 3, p. 585-606, 2015.

SIALA, W.; KUCHARÍKOVÁ, S.; BRAEM, A. et al. The antifungal caspofungin

increases fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* biofilms by inhibiting N-acetylglucosamine transferase. *Nature Communications*, artigo 13286, 2016. DOI: 10.1038/NCOMMS13286.

SILVEIRA, R. L. L. O queijo artesanal serrano como patrimônio imaterial: a descrição do sítio e o georreferenciamento do território. 2018. Relatório técnico – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

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

SINGH, S.; DATTA, S.; NARAYANAN, K. B.; RAJNISH, K. N. Bacterial exopolysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, art. 140, 2021. DOI: 10.1186/s43141-021-00242-y.

SOUZA, C. F. V. et al. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003.

STRÖHER, G. L. et al. Temperature drives microbial dynamics during the ripening of Serrano artisanal cheese. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 96, n. 4, e20240169, 2024.

TRABAQUINI, K. et al. O campo nativo e sua relação com a produção do queijo artesanal serrano em Santa Catarina. *DRD - Desenvolvimento Regional em Debate*, v. 9, ed. esp., p. 118-137, 2019.

URUÉN, C.; CHOPO-DÍAZ DE ATAURI, G.; GRIFFITH, D. C.; NIETO, J. M.; PEÑACEARRA, A.; TOMÉ-AMAT, J.; IRIBARREN, J. A.; BARCENILLA, H.; MARTÍNEZ DE TEJADA, G. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics*, v. 10, n. 1, art. 3, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics10010003.

VALLE, J.; TOLEDO-ARANA, A.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.-M.; AMORENA, B.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 1075-1087, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03493.x.

VASIL, M.; FARKAŠOVÁ, Z.; ELEČKO, J. et al. Comparison of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from sheep milk using three diagnostic methods. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 20, n. 4, p. 799-809, 2017. DOI: 10.1515/PJVS-2017-0100.

VIEIRA, V. F.; DORTZBACH, D.; TRABAQUINI, K.; VIEIRA, E.; SOUZA, J. M. Indicação geográfica do queijo serrano: um diferencial para a conservação da paisagem. In: *WORKSHOP CATARINENSE DE INDICAÇÃO GEOGRÁFICA*, 6., Joinville, 2017. Anais [...]. Joinville: UNIVILLE, 2017. p. 22.

VISHOVAN, Y.; USHKALOV, V.; VYGOVSKA, L. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in staphylococcus isolated from different objects. *Technology Audit and Production Reserves*, v. 4, n. 1(60), p. 43-48, 2021. DOI: 10.21303/2504-5695.2021.001925.

YU, L.; HISATSUNE, J.; HAYASHI, I. et al. A novel repressor of the ica locus discovered in clinically isolated super-biofilm-elaborating *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 2017. DOI: 10.1128/MBIO.02282-16.

ZHAO, A.; SUN, J.; LIU, Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, art. 1137947, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1137947.

ZMANTAR, T.; CHAIEB, K.; MILADI, H. et al. Detection of the intercellular adhesion loci (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* strains responsible for hospital acquired auricular infection. *Annals of Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 351-355, 2006. DOI: 10.1007/BF03175030.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o potencial de formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de Queijo Artesanal Serrano, leite cru e prateleiras de maturação.

4.2 ESPECÍFICO

1. Avaliar fenotipicamente a capacidade de formação de biofilme de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* previamente isoladas de leite cru, Queijo Artesanal Serrano e prateleiras de maturação;
2. Detectar a presença dos genes *icaA*, *icaD*, *icaC* do operon *ica* em cepas de *Staphylococcus aureus* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
3. Identificar genes relacionados à adesão e formação de biofilme (*fimC*, *papG* e *crl*) em cepas de *Escherichia coli* por PCR;
4. Correlacionar os perfis fenotípicos de formação de biofilme com a presença dos genes avaliados nas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

5 ARTIGO - POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO NO ESTADO DE SANTA CATARINA.

5.1 RESUMO

O Queijo Artesanal Serrano é um queijo de massa crua prensada, com textura semifirme a dura, coloração amarelo-palha e sabor levemente ácido e picante, produzido na região serrana de Santa Catarina a partir de leite cru bovino. Sua identidade única resulta do processo tradicional de maturação por no mínimo 60 dias em prateleiras de madeira de araucária, que conferem características sensoriais diferenciadas e reconhecidas pela Indicação Geográfica. A produção é regulamentada pela Lei Estadual nº 17.003/2016 e pelo Decreto nº 1.238/2017, sendo submetida à inspeção sanitária oficial, o que estabelece requisitos de qualidade e segurança alimentar e contribui para a valorização da tradição e da inocuidade do produto. No contexto do aprimoramento contínuo das boas práticas de fabricação, a compreensão dos mecanismos de persistência microbiana, como a formação de biofilmes, é fundamental para o controle de qualidade ao longo da cadeia produtiva. Este estudo teve como objetivo investigar a capacidade de formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* previamente isoladas de queijo artesanal serrano, leite cru e prateleiras de maturação, por meio de caracterização fenotípica e genotípica. Foram analisadas 76 cepas de *Staphylococcus aureus* e 34 cepas de *Escherichia coli*; para esta última espécie, não havia isolados provenientes de amostras de leite cru, provenientes do banco de cepas do Laboratório de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA/CAV/UDESC). A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo método do Ágar Vermelho Congo, e a detecção dos genes *icaA*, *icaD* e *icaC* em *S. aureus* e *fimC*, *crl* e *papG* em *E. coli* foi realizada por PCR convencional. Os resultados demonstraram que 82,9% (63/76) das cepas de *S. aureus* e 67,6% (23/34) das cepas de *E. coli* apresentaram capacidade fenotípica de formação de biofilme. A análise molecular revelou que 51,3% (39/76) das cepas de *S. aureus* possuem genes do operon *ica*, sendo *icaD* o mais prevalente (51,3%), seguido por *icaA* (34,2%), enquanto *icaC* não foi detectado. Em *E. coli*, 82,3% (28/34) das cepas apresentaram os genes *crl* (70,6%) e/ou *fimC* (52,9%), e o gene *papG* não foi detectado em nenhuma cepa. A concordância entre fenótipo e genótipo foi de 61,9% para *S. aureus* e 91,3% para *E. coli*, sugerindo

associação entre a presença desses genes e a capacidade de formação de biofilme. A ausência de *papG* é compatível com a adaptação das cepas de *E. coli* ao ambiente alimentar, embora não permita, isoladamente, excluir outros fatores de virulência. As cepas isoladas de queijo maturado apresentaram maior frequência de positividade, o que sugere possível influência das condições de maturação na persistência de microrganismos com maior capacidade de adesão, embora essa interpretação deva ser considerada com cautela. Os achados reforçam a importância da implementação contínua de boas práticas de fabricação, incluindo filtração e refrigeração do leite cru, higienização adequada das prateleiras de madeira e capacitação dos produtores. Este estudo contribui para o conhecimento científico sobre a microbiologia do Queijo Artesanal Serrano e fornece subsídios técnicos para o aprimoramento das práticas produtivas, conciliando tradição, segurança alimentar e preservação do patrimônio cultural regional.

Palavras-chave: Biofilmes, segurança alimentar, maturação, PCR.

5.2 INTRODUÇÃO

O queijo artesanal serrano é um produto tradicional do sul do Brasil, elaborado com leite cru bovino e maturado em condições próprias da região serrana de Santa Catarina. Essas características estão diretamente relacionadas à identidade sensorial do produto e ao seu valor cultural, mas também exigem atenção quanto à qualidade microbiológica ao longo da cadeia produtiva (MELO et al., 2013).

Em Santa Catarina, a produção do queijo artesanal serrano é regulamentada por legislação específica, que estabelece critérios para produção, maturação e comercialização, buscando conciliar a preservação do modo de fazer tradicional com a segurança alimentar do produto. Entre esses critérios, destacam-se a utilização de leite cru integral de vaca, a vinculação do produto ao território dos Campos de Altitude da Serra Geral Catarinense e a maturação mínima exigida para comercialização (SANTA CATARINA, 2016; SANTA CATARINA, 2017).

Além disso, normas complementares reforçam aspectos relacionados à rastreabilidade, às condições de produção e à capacitação dos produtores, evidenciando a importância do controle higiênico-sanitário nesse sistema produtivo (SANTA CATARINA, 2018; SANTA CATARINA, 2023).

Nesse contexto, compreender os fatores que favorecem a persistência de microrganismos no ambiente produtivo é relevante para o aprimoramento contínuo das boas práticas de fabricação. Entre esses fatores, destaca-se a formação de biofilmes, entendida como a capacidade de microrganismos aderirem a superfícies e se organizarem em comunidades envoltas por matriz extracelular.

Em ambientes de processamento de alimentos, essa característica pode dificultar a higienização e favorecer a permanência bacteriana em superfícies de contato com o alimento (SIMÕES; GIAOURIS, 2018; GRIGORE-GURGU et al., 2019).

Entre os microrganismos de interesse na cadeia produtiva de queijos artesanais, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* merecem destaque. Além da relevância microbiológica dessas espécies em produtos lácteos, ambas apresentam mecanismos genéticos associados à adesão e à formação de biofilme. Em *S. aureus*, esse processo é frequentemente relacionado ao operon *ica*, especialmente aos genes *icaA*, *icaD* e *icaC*, envolvidos na síntese e organização da matriz extracelular (AVILA-NOVOA et al., 2018; NGUYEN et al., 2020; SETIABUDY et al., 2023).

Em *E. coli*, genes como *fimC*, *crl* e *papG* estão associados a mecanismos de

adesão e persistência bacteriana, podendo contribuir para a manutenção do microrganismo em diferentes nichos do ambiente produtivo (STASHENKO et al., 2023).

A caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos isolados de leite cru, prateleiras de maturação e queijo artesanal serrano pode contribuir para a compreensão da persistência bacteriana nesse sistema de produção.

Esse conhecimento é importante para o aperfeiçoamento das práticas produtivas, sem desconsiderar o valor cultural e a tradição envolvidos na elaboração do produto. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o potencial de formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo artesanal serrano, leite cru e prateleiras de maturação, por meio de caracterização fenotípica e genotípica.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Amostragem

As cepas bacterianas analisadas neste estudo foram provenientes do banco de cepas do Laboratório de Bacteriologia do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA), do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em pesquisas realizadas nos anos de 2023 e 2024. Foram utilizadas exclusivamente cepas previamente isoladas de queijos artesanais serranos produzidos em Santa Catarina, provenientes de diversos produtores, bem como de leite cru utilizado na produção desses queijos e de prateleiras de madeira empregadas na maturação. Cada isolado bacteriano foi proveniente de uma amostra individual de queijo, leite ou prateleira, garantindo a independência entre as amostras.

Foram analisadas 76 cepas de *Staphylococcus aureus*, das quais 55 foram isoladas de queijos artesanais serranos, 13 de leite cru e 8 de prateleiras de maturação. Além disso, foram avaliadas 34 cepas de *Escherichia coli*, sendo 33 isoladas de queijos e 1 de prateleira de maturação. Não havia cepas de *E. coli* de amostras de leite cru.

Estes isolados eram mantidos a -20 °C em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) suplementado com 20% de glicerol até o momento das análises. Para a

recuperação e purificação dos isolados, as cepas de *Staphylococcus aureus* foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. As cepas de *Escherichia coli* foram recuperadas em ágar MacConkey, sob as mesmas condições de incubação.

5.3.2 Avaliação Fenotípica para Formação de Biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Para a caracterização fenotípica da capacidade de formação de biofilme, as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram cultivadas em meio Ágar Vermelho Congo (CRA, *Congo Red Agar*), modificado segundo Freeman et al. (1989), composto por ágar nutriente (28 g/L), sacarose (50 g/L) e corante vermelho Congo (0,8 g/L). Os isolados bacterianos foram incubados a 37 °C por 24 horas.

A formação de colônias rugosas, de coloração preta ou escura, associada ao escurecimento do meio adjacente, foi interpretada como indicativa de produção de biofilme (slime-positivo). Colônias lisas, com coloração vermelha ou bordeaux, foram classificadas como não produtoras de biofilme (slime-negativo) (FREEMAN et al., 1989). O método do Ágar Vermelho Congo foi utilizado como técnica de triagem fenotípica da capacidade de formação de biofilme, devendo seus resultados ser interpretados em conjunto com a análise genotípica, especialmente no caso de *Escherichia coli*, para a qual a literatura descreve limitações de sensibilidade (VASIL et al., 2017; ABDEL HALIM et al., 2018; GÜNGÖR et al., 2023). Como controles do método, foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.3.3 Extração de Material Genético

Para a caracterização genotípica, foi realizada a extração do DNA genômico de todas as cepas bacterianas, conforme protocolo baseado em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), com modificações.

Para tanto, 200 µL do inóculo, obtido após incubação prévia das colônias em caldo BHI, foram misturados à solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A mistura foi submetida a banho-maria a 56 °C durante 30 minutos. Em seguida, realizou-se centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, com posterior transferência

do sobrenadante para um novo microtubo estéril, ao qual foram adicionados 600 µL de álcool 70% resfriado. Posteriormente, foi realizada nova centrifugação a 13.500 rpm por 20 minutos.

Após descarte do sobrenadante, o microtubo foi mantido em estufa a 56 °C até a completa dessecação do pellet. Ao final, o DNA foi ressuspenso em água ultrapura estéril, homogeneizado e armazenado a -20 °C. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria em NanoDrop.

5.3.4 Pesquisa de Genes Relacionados à Produção de Biofilme por *Staphylococcus aureus*

Para a investigação de genes relacionados à produção de biofilme em *Staphylococcus aureus*, foram pesquisados os genes *icaA*, *icaD* e *icaC*. A detecção desses genes foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em sistema simplex, com amplificação individual de cada alvo, utilizando primers específicos descritos na Tabela 1.

As reações de PCR foram preparadas conforme protocolo adaptado de Arciola et al. (2002), incluindo as condições de amplificação descritas a seguir. O DNA utilizado nas reações foi previamente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop. Para cada reação, foram utilizados 2 µL de DNA molde, com concentração entre 10 e 50 ng/µL, correspondendo a 20 a 100 ng de DNA por reação. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada primer específico (forward e reverse) para os genes *icaA*, *icaD* e *icaC*, 200 µM de cada dNTP, tampão de PCR 1×, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura estéril para completar o volume final.

As condições de amplificação foram conduzidas conforme protocolo adaptado de Arciola et al. (2002), consistindo em desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Como controle positivo, foi empregada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, enquanto água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), preparado em tampão TAE 1× e corado com GelRed, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb. A eletroforese foi conduzida sob tensão constante de

100 V durante 60 minutos, e a visualização das bandas foi realizada em fotodocumentador sob luz ultravioleta.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de biofilme em *Staphylococcus aureus*.

Genes	Sequência de nucleotídeos	Amplicon (bp)
<i>icaA</i>	F - ACA GTCGCT ACG AAA AGA AA R - GGA AAT GCC ATA ATGACA AC	103 pb
<i>icaD</i>	F - ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG R - CGT GTT TTC AAC ATTTAA TGC AA	198 pb
<i>icaC</i>	F - TAA CTT TAG GCGCAT ATG TTT T R - TTC CAG TTA GGCTGG TAT TG	400 pb

5.3.5 Pesquisa de genes relacionados à produção de biofilme por *Escherichia coli*

Para a investigação de genes relacionados à produção de biofilme em cepas de *Escherichia coli*, foram pesquisados os genes *fimC*, *crl* e *papG*. A detecção desses genes foi realizada por PCR convencional em sistema simplex, utilizando primers específicos descritos na Tabela 2 e metodologia adaptada de Crecencio et al. (2020).

As reações foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 2,5 µL de tampão de reação 10×, 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada primer (10 pmol/µL), MgCl₂ em concentração final de 4 mM, 5 µL de DNA

molde previamente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop e padronizado entre 10 e 50 ng/μL, correspondendo a 50 a 250 ng de DNA por reação, além de água ultrapura estéril q.s.p. para completar o volume final.

As reações de PCR para os genes *fimC*, *crl* e *papG* foram conduzidas sob condições térmicas adaptadas de Crecencio et al. (2020). Para *fimC* e *crl*, utilizou-se desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 68 °C por 3 minutos, com extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para *papG*, utilizou-se desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 25 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 63 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 3 minutos, finalizando com extensão a 68 °C por 10 minutos.

Como controle positivo, foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 35218, e água ultrapura estéril foi empregada como controle negativo. Os amplicons foram visualizados conforme o mesmo protocolo descrito para *Staphylococcus aureus*.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes produtores de biofilme em *Escherichia coli*.

Genes	Sequência de nucleotídeos	Amplicon (bp)
<i>fimC</i>	F GGGTGAGAAATCGCAGGTGTG R CCTGATTTTTTGGGGGATGTG	496
<i>crl</i>	F TTTCGATTTCTTGCGGCTGTA R CTTTCAGATTCAGCGTGCTC	270
<i>papG</i>	F CTGTATTCAGGAGGATTTTCG R ACTATTCGGCCTCGGATAACCAT	508

5.4 RESULTADOS

5.4.1 *Staphylococcus aureus*

As 76 cepas de *Staphylococcus aureus* foram avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilme pelo método fenotípico do vermelho congo e pela presença dos genes do operon *ica*. Do total de cepas analisadas, 63 (82,9%) apresentaram positividade fenotípica para formação de biofilme. A distribuição por matriz revelou maior frequência de positividade nas amostras de queijo artesanal serrano (89,1%; 49/55), seguidas pelo leite cru (69,2%; 9/13) e pelas prateleiras de maturação (62,5%; 5/8). A análise estatística pelo teste Qui-quadrado não demonstrou diferença estatisticamente significativa na distribuição da positividade fenotípica entre as matrizes ($\chi^2 = 5,55$; $p = 0,062$).

Quanto à caracterização genotípica, 39 amostras (51,3%) amplificaram para pelo menos um dos genes do operon *ica* avaliados, sendo detectados *icaA* e/ou *icaD*, enquanto o gene *icaC* não foi identificado (Tabela 3). Individualmente, o gene *icaD* foi o mais prevalente, sendo detectado em 34 (61,8%) amostras de queijo, 2 (15,4%) de leite cru e 3 (37,5%) de prateleiras.

O gene *icaA* apresentou frequências menores, com 22 (40,0%) amostras positivas no queijo, 2 (15,4%) no leite cru e 2 (25,0%) nas prateleiras. A presença de genes variou significativamente entre as matrizes analisadas ($p = 0,007$), com maior frequência entre os isolados provenientes do queijo.

Ao cruzar os dados fenotípicos e genotípicos, observou-se que todas as 39 cepas portadoras de ao menos um dos genes avaliados também apresentaram resultado positivo no teste do vermelho congo. Além disso, 24 amostras (31,6%) fenotipicamente positivas não apresentaram amplificação para os genes pesquisados.

Tabela 3 - Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Staphylococcus aureus* (n=76)

Matriz Analisada	Fenótipo (Vermelho Congo)	Genótipo Positivo (icaA e/ou icaD)	Gene <i>icaA</i>	Gene <i>icaD</i>	Gene <i>icaC</i>
Queijo (n=55)	49 (89,1%)	34 (61,8%)	22 (40,0%)	34 (61,8%)	0 (0%)
Leite Cru (n=13)	9 (69,2%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	0 (0%)
Prateleira (n=8)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	2 (25,0%)	3 (37,5%)	0 (0%)
TOTAL (n=76)	63 (82,9%)	39 (51,3%)	26 (34,2%)	39 (51,3%)	0 (0%)

5.4.2 *Escherichia coli*

As 34 cepas de *Escherichia coli* foram avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilme pelo método fenotípico do vermelho congo e pela presença dos genes *crl*, *fimC* e *papG* (Tabela 4). Do total analisado, 23 (67,6%) apresentaram positividade fenotípica para formação de biofilme. A distribuição por matriz revelou frequência de positividade de 66,7% (22/33) entre as amostras de queijo artesanal serrano, enquanto a única amostra isolada de prateleira de maturação também foi positiva (1/1; 100%). A análise estatística pelo teste exato de Fisher não demonstrou diferença significativa entre as matrizes avaliadas ($p = 1,000$).

Quanto à caracterização genotípica, 28 amostras (82,3%) amplificaram para pelo menos um dos genes pesquisados (*crl* e/ou *fimC*). O gene *crl* foi o mais prevalente, sendo detectado em 23 (69,7%) amostras de queijo e na amostra da prateleira (100%). O gene *fimC* foi identificado em 18 (54,5%) amostras de queijo, enquanto o gene *papG* não foi detectado em nenhum dos isolados. A distribuição genotípica também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as matrizes analisadas ($p = 1,000$).

Ao cruzar os métodos, observou-se que 21 das 23 amostras fenotipicamente positivas (91,3%) também foram positivas genotipicamente para *crl* e/ou *fimC*. Adicionalmente, 7 amostras fenotipicamente negativas apresentaram amplificação para pelo menos um dos genes avaliados.

Tabela 4 - Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Escherichia coli* (n=34)

Matriz Analisada	Fenótipo (Vermelho Congo)	Genótipo Positivo (crl e/ou fimC)	Gene <i>crl</i>	Gene <i>fimC</i>	Gene <i>pap G</i>
Queijo (n=33)	22 (66,7%)	27 (81,8%)	23 (69,7%)	18 (54,5%)	0 (0%)
Prateleira (n=1)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL (n=34)	23 (67,6%)	28 (82,3%)	24 (70,6%)	18 (52,9%)	0 (0%)

5.5 DISCUSSÃO

5.5.1 *Staphylococcus aureus*

No presente estudo, 82,9% (63/76) das cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram positividade fenotípica para formação de biofilme, com maiores frequências entre os isolados provenientes de queijo artesanal serrano (89,1%; 49/55), seguidos por leite cru (69,2%; 9/13) e prateleiras de maturação (62,5%; 5/8).

Embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, a elevada proporção de cepas fenotipicamente positivas em todas as matrizes mostra que a capacidade de adesão e persistência de *S. aureus* esteve amplamente distribuída ao longo da cadeia produtiva avaliada. Esse achado é relevante porque, em ambientes de alimentos, a formação de biofilme favorece a permanência bacteriana em superfícies de contato, dificulta a remoção completa durante a higienização e pode contribuir para episódios de recontaminação do produto (GRIGORE-GURGU et al., 2019; VLKOVÁ et al., 2008).

A maior frequência de positividade observada nos isolados de queijo sugere que essa matriz possa representar um ambiente mais favorável à permanência de cepas com maior capacidade de adesão. Essa interpretação deve ser feita com cautela, já que o teste estatístico não demonstrou diferença significativa entre as matrizes, mas ela é biologicamente plausível.

Durante a maturação, o queijo passa por mudanças graduais de umidade, disponibilidade de nutrientes, concentração de sal e pH, e esses fatores podem funcionar como pressões seletivas capazes de favorecer linhagens mais adaptadas à persistência em superfícies e à organização em biofilme. Miao et al. (2019) destacaram que condições típicas do processamento de alimentos interferem diretamente na formação de biofilme por *S. aureus*, reforçando que o fenótipo observado não deve ser visto como um evento isolado, mas como resposta possível às condições do ambiente produtivo.

Na caracterização genotípica, 51,3% (39/76) das cepas amplificaram para pelo menos um dos genes do operon *ica*, com maior frequência de *icaD* (51,3%) em relação a *icaA* (34,2%), além de diferença significativa entre as matrizes, com maior ocorrência desses genes nos isolados provenientes de queijo. Esses resultados indicam que parte expressiva das cepas avaliadas possuía marcadores genéticos classicamente

associados à formação de biofilme em *S. aureus*. Segundo Cramton et al. (1999), o locus *ica* está relacionado à síntese do polissacarídeo intercelular de adesão, importante para a coesão celular e para a estabilidade da matriz do biofilme. De forma complementar, Nguyen, Nguyen e Otto (2020) destacam que *icaA* participa da síntese do PIA/PNAG, enquanto *icaD* potencializa essa atividade, favorecendo a produção eficiente da matriz extracelular. Assim, a frequência observada desses genes no presente estudo sustenta a ideia de que a via mediada pelo operon *ica* participou, ao menos em parte, do perfil de adesão encontrado nas cepas avaliadas.

Um resultado que merece discussão mais cuidadosa é a ausência total de detecção do gene *icaC*. Esse achado é importante porque mostra que o simples encontro de *icaA* e *icaD* não significa, necessariamente, a presença de um operon *ica* completo. O gene *icaC* participa da organização e da exportação do polissacarídeo sintetizado, integrando a via clássica de produção do PIA/PNAG (CRAMTON et al., 1999; NGUYEN; NGUYEN; OTTO, 2020). Dessa forma, a ausência de *icaC* em todas as cepas sugere que a formação de biofilme observada neste estudo pode não estar dependendo exclusivamente da via polissacarídica clássica ou, ainda, que as cepas avaliadas utilizem mecanismos complementares ou alternativos para estruturar a matriz. Esse ponto é central, porque impede concluir que a ausência desse gene represente ausência de capacidade de biofilme. Ao contrário, os resultados mostram que o fenótipo esteve presente mesmo sem a detecção de *icaC*.

Essa interpretação se torna ainda mais consistente quando se observa a discordância entre fenótipo e genótipo. Todas as 39 cepas portadoras de *icaA* e/ou *icaD* foram positivas no Congo Red Agar, mas 24 cepas fenotipicamente positivas não apresentaram amplificação para os genes pesquisados. Em outras palavras, uma parcela importante das cepas mostrou capacidade fenotípica de formação de biofilme sem os marcadores genéticos avaliados neste estudo.

Esse resultado está de acordo com a literatura que descreve a natureza multifatorial do biofilme em *S. aureus*. Figueiredo et al. (2017) demonstram que a formação de biofilme nessa espécie não depende exclusivamente do operon *ica*, podendo envolver mecanismos independentes mediados por proteínas de superfície, proteínas associadas ao biofilme e diferentes vias regulatórias. No mesmo sentido, Vázquez-Sánchez e Rodríguez-López (2018) ressaltam que a matriz do biofilme em *S. aureus* pode apresentar composição variável, incluindo polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Bowden et al. (2024) reforçam esse entendimento ao mostrar a

importância estrutural do eDNA na organização e manutenção dos biofilmes de *S. aureus*. Assim, a discordância encontrada no presente trabalho não enfraquece os resultados; ao contrário, ela evidencia que o fenômeno é biologicamente mais complexo do que a simples presença ou ausência dos genes avaliados.

Outro ponto que precisa ser considerado é a própria metodologia fenotípica utilizada. O Congo Red Agar é útil como método de triagem, mas se trata de um ensaio qualitativo, e não de um teste quantitativo da produção de biofilme.

Por isso, sua interpretação deve sempre ser feita em conjunto com os dados moleculares. Arciola et al. (2002) e Ballah et al. (2022) mostraram que métodos fenotípicos e genotípicos podem apresentar concordância parcial, o que reforça a importância de interpretar o CRA como ferramenta inicial de rastreio e não como prova isolada da intensidade do biofilme. No contexto do presente estudo, essa limitação metodológica ajuda a explicar por que houve cepas fenotipicamente positivas sem os genes pesquisados e, ao mesmo tempo, reforça a necessidade de cautela na interpretação do resultado fenotípico.

Do ponto de vista da cadeia produtiva, a presença de *S. aureus* com elevada frequência de positividade fenotípica e com detecção parcial de genes do operon *ica* merece atenção porque esse microrganismo pode persistir em superfícies e atuar como fonte de contaminação cruzada durante o processamento e a maturação. Gajewska, Chajęcka-Wierzchowska e Zadernowska (2022) demonstraram a ocorrência de *S. aureus* em diferentes etapas da cadeia de queijos de leite cru, reforçando que esse patógeno pode circular entre ambiente, matéria-prima e produto final.

Da mesma forma, Margalho et al. (2024) chamam atenção para a relevância de linhagens enterotoxigênicas de *S. aureus* em queijos artesanais brasileiros. Nesse sentido, os resultados do presente estudo indicam que a persistência de *S. aureus* no queijo artesanal serrano deve ser entendida como um ponto de atenção microbiológica, especialmente porque a formação de biofilme pode favorecer sua manutenção no ambiente produtivo.

5.5.2 *Escherichia coli*

Em relação a *Escherichia coli*, 67,6% (23/34) das cepas apresentaram positividade fenotípica para formação de biofilme, enquanto 82,3% (28/34)

amplificaram para *crl* e/ou *fimC*. Além disso, 91,3% das cepas fenotipicamente positivas também apresentaram positividade genotípica, indicando elevada concordância entre os dois tipos de análise.

Esse resultado sugere que, nas condições avaliadas, os genes pesquisados apresentaram associação mais consistente com o fenótipo observado em *E. coli* do que em *S. aureus*. Essa diferença entre as espécies é importante, porque sugere que os mecanismos de formação de biofilme não se comportaram da mesma forma ao longo da cadeia produtiva estudada.

No entanto, a interpretação dos resultados de *E. coli* precisa respeitar o delineamento do estudo. Não havia cepas provenientes de leite cru para essa espécie, de modo que qualquer comparação com essa matriz seria inadequada. A discussão, portanto, deve se restringir aos isolados provenientes de queijo e de prateleira. Além disso, a ausência de diferença estatisticamente significativa entre essas matrizes deve ser analisada com cautela, principalmente porque houve apenas um isolado de prateleira. Assim, os resultados não permitem concluir equivalência entre os nichos, nem demonstrar de forma definitiva a circulação bacteriana entre ambiente e produto, embora sejam compatíveis com essa possibilidade.

O gene *crl* foi o mais prevalente entre os isolados de *E. coli*, estando presente em 70,6% das cepas. Esse resultado sugere papel importante de mecanismos relacionados à produção de curli e à adaptação ao estresse ambiental. Robbe-Saule et al. (2006) destacam que Crl atua na ativação de genes dependentes de RpoS envolvidos no comportamento multicelular bacteriano.

Embora esse mecanismo seja frequentemente discutido no contexto da resposta ao estresse, ele também se relaciona com a expressão de estruturas associadas à adesão e à formação de matriz. No presente estudo, a alta frequência de *crl* é coerente com a hipótese de que os isolados avaliados apresentem adaptação favorável à persistência em ambientes de produção de alimentos.

Essa interpretação é reforçada por Yang et al. (2018), que observaram associação entre persistência de *E. coli* em equipamentos de processamento de carne, motilidade e expressão de curli, sugerindo que a capacidade de biofilme foi mais importante para a manutenção das linhagens no ambiente do que a tolerância a sanitizantes. De modo semelhante, Bhardwaj et al. (2021) demonstraram que genes relacionados à adesão e à formação de biofilme apresentam maior expressão em isolados de *E. coli* em estado de biofilme. Assim, a frequência elevada de *crl*

encontrada neste estudo fortalece a interpretação de que as cepas avaliadas apresentavam importante potencial de permanência no ambiente produtivo do queijo artesanal serrano.

O gene *fimC* foi detectado em 52,9% (18/34) das cepas, indicando que as fímbrias tipo 1 também podem ter contribuído para o perfil observado. Essas estruturas têm papel importante na adesão inicial a superfícies e no estabelecimento do biofilme. Cookson, Cooley e Woodward (2002) demonstraram a participação dessas fímbrias na adesão de *E. coli* a superfícies abióticas, o que é particularmente relevante em ambientes de processamento de alimentos. Assim, no presente estudo, a presença de *fimC* em pouco mais da metade dos isolados sugere que a adesão inicial e a manutenção bacteriana em superfícies possam ter ocorrido, ao menos em parte, por esse mecanismo.

A ausência de *papG* em todas as cepas também é um resultado importante e precisa ser interpretada, e não apenas descrita. Esse gene está classicamente associado a linhagens uropatogênicas de *E. coli* e participa da adesão a receptores específicos do trato urinário (JOHNSON; RUSSO, 2002). Por isso, sua não detecção nas cepas estudadas é compatível com um perfil mais relacionado à adaptação ao ambiente alimentar do que à virulência extraintestinal clássica. Ainda assim, essa ausência não permite afirmar que os isolados sejam desprovidos de outros fatores de virulência, já que o estudo não investigou esse conjunto de genes. O que os dados permitem dizer, com segurança, é que *papG* não parece ter participado do perfil de adesão observado nas cepas avaliadas.

A alta concordância entre fenótipo e genótipo em *E. coli* fortalece a interpretação dos resultados, mas isso não elimina a necessidade de cautela quanto ao método fenotípico utilizado. Assim como em *S. aureus*, o Congo Red Agar deve ser entendido como ferramenta qualitativa de triagem. Por isso, a robustez da interpretação em *E. coli* vem principalmente da combinação entre a positividade no CRA e a detecção frequente de *crl* e *fimC*. Essa convergência entre os resultados fenotípicos e moleculares dá mais consistência à discussão e sustenta a hipótese de persistência ambiental dessas cepas na cadeia produtiva estudada.

Do ponto de vista sanitário, a presença de *E. coli* com genes associados à adesão e à formação de biofilme é relevante porque esse microrganismo pode permanecer em superfícies de contato e participar de episódios de recontaminação do produto. Em sistemas que utilizam leite cru e não aplicam tratamento térmico final,

essa persistência ganha importância adicional. Assim, embora o presente estudo não tenha avaliado patótipos específicos, os resultados encontrados mostram que *E. coli* deve ser considerada um microrganismo relevante na dinâmica microbiológica do queijo artesanal serrano.

5.5.3 Implicações para a cadeia produtiva do queijo serrano

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a capacidade de formação de biofilme está presente em isolados de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* provenientes da cadeia produtiva do queijo artesanal serrano, o que reforça a importância do monitoramento microbiológico em diferentes etapas do processo produtivo. Em ambientes de produção de alimentos, a formação de biofilme favorece a adesão bacteriana a superfícies e dificulta a remoção completa dos microrganismos durante a higienização, podendo contribuir para a persistência ambiental e para episódios de recontaminação (GRIGORE-GURGU et al., 2019; VLKOVÁ et al., 2008).

No caso de *S. aureus*, a elevada frequência de positividade fenotípica, associada à detecção parcial dos genes do operon *ica*, indica que a persistência dessa espécie na cadeia produtiva não depende exclusivamente desses marcadores. Esse achado sugere que outros mecanismos de adesão e estruturação de biofilme também possam estar envolvidos, o que amplia a relevância do acompanhamento microbiológico em condições reais de produção (FIGUEIREDO et al., 2017; BOWDEN et al., 2024). Assim, a ausência de determinados genes não deve ser interpretada, isoladamente, como indicativo de baixo potencial de persistência.

Em *E. coli*, a elevada concordância entre o perfil fenotípico e a presença de *crl* e/ou *fimC* sugere que esses determinantes desempenham papel importante na adaptação dos isolados ao ambiente produtivo avaliado. Como essas estruturas estão relacionadas à adesão e à formação da matriz do biofilme, sua presença pode favorecer a permanência bacteriana em superfícies de contato e no próprio produto, especialmente quando associada a condições que dificultem a completa remoção microbiana (COOKSON; COOLEY; WOODWARD, 2002; YANG et al., 2018; BHARDWAJ et al., 2021).

Esses achados têm implicação direta para as Boas Práticas de Fabricação, sobretudo em relação à qualidade microbiológica do leite cru, à higiene durante a

ordena, à refrigeração da matéria-prima, ao manejo sanitário dos utensílios e ao controle das superfícies de maturação. No queijo artesanal serrano, as prateleiras de madeira constituem elemento tradicional do processo produtivo e participam da identidade do produto. No entanto, por serem superfícies de uso contínuo, também merecem atenção quanto aos protocolos de limpeza e ao monitoramento microbiológico, de modo a reduzir a permanência de microrganismos aderidos sem descaracterizar o método tradicional de maturação (BUSETTA et al., 2024; VLKOVÁ et al., 2008).

A principal contribuição deste estudo consiste em demonstrar que a formação de biofilme não representa um evento isolado na cadeia produtiva do queijo serrano, mas uma característica frequente entre os isolados avaliados, sustentada por diferentes mecanismos genéticos e potencialmente influenciada pelas condições do ambiente de produção. Dessa forma, os resultados não devem ser interpretados como entrave à produção artesanal, mas como subsídio técnico para seu aprimoramento. A identificação de cepas com potencial de formação de biofilme contribui para o refinamento dos procedimentos de controle, favorecendo a produção de um alimento microbiologicamente mais seguro e, ao mesmo tempo, preservando a tradição e o valor cultural do queijo artesanal serrano.

5.6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou elevada prevalência de cepas de *Staphylococcus aureus* (82,9%) e *Escherichia coli* (67,6%) com capacidade fenotípica de formação de biofilme ao longo da cadeia produtiva do Queijo Artesanal Serrano. A análise molecular revelou que 51,3% das cepas de *S. aureus* possuíam genes do operon *ica* (*icaA* e/ou *icaD*), com variação estatisticamente significativa entre as matrizes analisadas ($p = 0,007$), concentrando-se principalmente nos queijos. Para *E. coli*, 82,3% das cepas apresentaram os genes *crl* e/ou *fimC*, sugerindo elevada frequência de determinantes de adesão nas amostras avaliadas, sem diferença estatisticamente significativa entre as matrizes, interpretação que deve ser considerada com cautela devido ao número reduzido de isolados de prateleira.

A forte correlação entre fenótipo e genótipo, especialmente em *E. coli* (91,3%), sugere que esses determinantes genéticos possam estar associados à persistência da maioria das cepas avaliadas. No caso de *S. aureus*, a detecção de cepas fenotipicamente positivas sem os genes pesquisados sugere a presença de mecanismos alternativos de adesão, reforçando a complexidade da microbiota envolvida.

A maior frequência de positividade observada nas amostras de queijo maturado sugere que o ambiente de cura possa favorecer a persistência dessas comunidades microbianas ao longo da cadeia produtiva, embora essa interpretação deva ser considerada com cautela. Quanto às prateleiras de madeira, os achados indicam que essas superfícies merecem atenção sanitária, mas sua interpretação deve ser feita com cautela, especialmente no caso de *E. coli*, devido ao número reduzido de isolados ambientais.

Diante dos resultados obtidos, reforça-se a importância da adoção e do aperfeiçoamento contínuo das Boas Práticas de Fabricação, com atenção especial à qualidade microbiológica do leite cru, à higiene durante a ordenha, à refrigeração da matéria-prima e ao manejo sanitário das superfícies de maturação.

No caso das prateleiras de madeira, elemento tradicional e importante para a identidade sensorial do produto, os resultados indicam a necessidade de atenção especial aos procedimentos de higienização e ao monitoramento microbiológico, de modo a conciliar a preservação das características artesanais com a segurança do alimento. Assim, a capacitação contínua dos produtores e o refinamento dos

protocolos de limpeza e manejo sanitário podem contribuir para o fortalecimento da qualidade microbiológica do produto.

Ressalta-se que a detecção de mecanismos associados à formação de biofilme reflete a adaptação dos microrganismos ao ambiente de produção e deve ser compreendida como um subsídio técnico para o aprimoramento dos processos, e não como um entrave à tradição produtiva. Dessa forma, a integração entre o conhecimento tradicional e as evidências científicas mostra-se fundamental para promover a segurança alimentar, valorizar o patrimônio cultural representado pelo Queijo Artesanal Serrano e favorecer a sustentabilidade da cadeia produtiva.

5.7 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho, promovendo o desenvolvimento científico e tecnológico no estado. Nosso reconhecimento também ao Laboratório CEDIMA pela infraestrutura disponibilizada, suporte técnico e contribuição valiosa durante todas as etapas da pesquisa. Estendemos nossos agradecimentos à Epagri pelo suporte institucional, troca de conhecimentos e pela parceria que enriqueceu significativamente este estudo.

5.8 REFERÊNCIAS

- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*, v. 23, n. 21, p. 4233-4239, 2002. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00171-0.
- AVILA-NOVOA, M. G.; IÑIGUEZ-MORENO, M.; SOLÍS-VELÁZQUEZ, O. A.; GUERRERO-MEDINA, P. J.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. *Journal of Food Quality*, v. 2018, artigo 1746139, 2018. DOI: 10.1155/2018/1746139.
- BALLAH, F. M. et al. Phenotypic and genotypic detection of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from different food sources in Bangladesh. *Biology*, v. 11, n. 7, artigo 949, 2022. DOI: 10.3390/biology11070949.
- BAMNESHIN, K.; POUDINEH, M.; HAJI ALIBABAEI, R.; YOUSEFI, M.; DERAKHSHANDEH, A. Prevalence of icaADBC genes, and correlation with biofilms and antibiotic resistance in *S. aureus*: a systematic review and meta-analysis. *Germs*, v. 14, n. 4, p. 387-401, 2024. DOI: 10.18683/germs.2024.1448.
- BHARDWAJ, D. K. et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming, antimicrobial resistant, pathogenic *Escherichia coli* isolated from Indian dairy and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 336, p. 108899, 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108899.
- BONILLA-LUQUE, O. M. Evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias y seguridad microbiológica durante la elaboración de quesos artesanales de leche cruda. *Zenodo*, 2021. DOI: 10.5281/zenodo.8144260.
- BOWDEN, L. C. et al. Beyond the double helix: the multifaceted landscape of extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [S. l.], v. 14, p. 1400648, 2024. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1400648.
- BUSETTA, Gabriele et al. The wooden shelf surface and cheese rind mutually exchange microbiota during the traditional ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, v. 409, art. 110478, 2024. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110478.
- CASTELANI, L.; PILON, L. E.; MARTINS, T.; POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P. Investigation of biofilm production and icaA and icaD genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. *Animal Science Journal*, v. 86, n. 3, p. 340-344, 2015. DOI: 10.1111/asj.12284.
- CASTRO, P. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus*

aureus isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 3, p. 2098-2110, 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-17138.

COOKSON, A. L.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, M. J. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 292, n. 3-4, p. 195-205, 2002. DOI: 10.1078/1438-4221-00203.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999.

CRECENCIO, R. B. et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genetic profiles of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat. *Infection, Genetics and Evolution*, [S. l.], v. 84, p. 104355, 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104355.

FIGUEIREDO, A. M. S. et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Critical Reviews in Microbiology*, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 602-621, Feb. 2017. DOI: 10.1080/1040841X.2017.1282941.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3432.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989. DOI: 10.1136/jcp.42.8.872.

GAJEWSKA, J.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A. Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland. *Molecules*, v. 27, n. 19, artigo 6569, 2022. DOI: 10.3390/molecules27196569.

GRIGORE-GURGU, L.; BUCUR, F. I.; BORDA, D.; ALEXA, E. A.; NEAGU, C.; NICOLAU, A. I. Biofilms formed by pathogens in food and food processing environments. In: *Bacterial Biofilms*. IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.90176.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 6, p. 859-864, 2002. DOI: 10.1086/342490.

KOWALSKA, J.; NOWAK, A.; ŚMIECH, A.; SZYMCZAK, B. Biofilm-forming ability of pathogenic bacteria isolated from retail food in Poland. *Journal of Food Protection*, v.

83, n. 11, p. 1992-1999, 2020. DOI: 10.4315/JFP-20-135.

MARGALHO, L. P.; GRAÇA, J. S.; KAMIMURA, B. A.; PIMENTEL, T. C.; DUQUE, S. S.; ARRUDA, V. A.; SANT'ANA, A. S. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence, counts, phenotypic and genotypic profiles. *Food Microbiology*, v. 119, artigo 104531, 2024. DOI: 10.1016/j.fm.2024.104531.

MARQUES, V. F.; SANTOS, H. A.; SANTOS, T. H.; BRITO, M. A. V. P.; MOREIRA, M. A. S.; LANGE, C. C. Expression of *icaA* and *icaD* genes in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine subclinical mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 41, e06645, 2021. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6645.

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N.; RAMELLA, M. V.; BARCELLOS, V. C.; SFACIOTTE, R. A. P. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 41, p. 1-7, 2013.

MIAO, J.; LIN, S.; SOTEYOME, T.; PETERS, B. M.; LI, Y.; CHEN, H.; SU, J.; LI, L.; LI, B.; XU, Z.; SHIRTLIFF, M. E.; HARRO, J. M. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* under Food Heat Processing Conditions: *First Report on CML Production within Biofilm*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, art. 1312, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-35558-2.

MENEZES, K. V.; PIMENTEL, B. M. F.; COSTA, J. A. C.; FERREIRA, N. S.; IGNACCHITI, M. D. C.; RESENDE, J. A. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from commercialized fresh cheese in the south of Espírito Santo. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 54, n. 3, p. 2063-2071, 2023. DOI: 10.1007/s42770-023-01013-2.

NGUYEN, H. T. T.; NGUYEN, T. H.; OTTO, M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 18, p. 3324-3334, 2020. DOI: 10.1016/J.CSBj.2020.10.027.

OLIVEIRA, A. P. D.; COSTA, M. M.; NOGUEIRA, D. M.; SILVA, T. M. S.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains from milk and goat cheese and evaluation of their inhibition by gallic acid, nisin and velame of the Brazilian caatinga. *International Journal of Dairy Technology*, v. 73, n. 3, p. 595-604, 2020. DOI: 10.1111/1471-0307.12673.

POYRAZOĞLU, E.; YAMAN, F. B. Biofilm formation and prevention of bacteria isolated from fish and fish stalls. *Acta Aquatica Turcica*, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2023. DOI: 10.22392/actaquatr.1116548.

ROBBE-SAULE, V. et al. *Crl* activates transcription initiation of *RpoS*-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 11, p. 3983–3994, 2006. DOI: 10.1128/JB.00033-06

SALIMENA, A. P. S. et al. Genotypic and phenotypic detection of capsular

polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Veterinary Research Communications*, v. 40, n. 3-4, p. 97-106, 2016. DOI: 10.1007/s11259-016-9658-5.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

SANTA CATARINA. Lei nº 17.003, de 1º de setembro de 2016. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina*, Florianópolis, SC, 2 set. 2016. Disponível em: <https://leis.alesc.sc.gov.br/ato-normativo/19573>. Acesso em: 27 mar. 2026.

SANTA CATARINA. Decreto nº 1.238, de 19 de julho de 2017. Regulamenta a Lei nº 17.003, de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina*, Florianópolis, SC, 20 jul. 2017. Disponível em: <https://faolex.fao.org/docs/pdf/bra184350.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2026.

SANTA CATARINA. Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal e do queijo tradicional de fazenda ou sítio e estabelece outras providências. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina*, Florianópolis, 17 jan. 2018. Disponível em: http://leis.alesc.sc.gov.br/html/2018/17486_2018_lei.html. Acesso em: 27 mar. 2026.

SANTA CATARINA. Lei nº 18.612, de 20 de janeiro de 2023. Altera a Lei nº 17.003, de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado de Santa Catarina*, Florianópolis, SC, 23 jan. 2023. Disponível em: https://leis.alesc.sc.gov.br/html/2023/18612_2023_lei.html. Acesso em: 27 mar. 2026.

SETIABUDY, M.; ADHIPUTRA, I. K. A. I.; DARWINATA, A. E.; KARMILA, S. Correlation between icaA/B/C/D gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* infection. *Jurnal Kedokteran*, v. 9, n. 1, p. 39-46, 2023. DOI: 10.36679/kedokteran.v9i1.39.

SIMÕES, M. V.; GIAOURIS, E. E. Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. In: *Foodborne Diseases. Academic Press*, 2018. p. 309-377. DOI: 10.1016/B978-0-12-811444-5.00011-7.

STASHENKO, E. E.; TORRES SÁEZ, R.; ZAFRA, G.; CABALLERO, D.; MARTÍNEZ, J. R. Effect of essential oil from *Lippia origanoides* on the transcriptional expression of genes related to quorum sensing, biofilm formation, and virulence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, v. 12, n. 5, artigo 845, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12050845.

TORRES, G.; VARGAS, K.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.; REYES-VELEZ, J.; OLIVERA-ANGEL, M. Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by

Staphylococcus aureus strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. *Heliyon*, v. 5, n. 10, e02535, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02535.

TITOUCHE, Y.; AKKOU, M.; DJAOUI, Y.; HOUALI, K.; KECHA, M.; RAHAL, K. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy dairy cows in Algeria: antibiotic resistance, enterotoxin genes and biofilm formation. *BMC Veterinary Research*, v. 20, n. 1, artigo 243, 2024. DOI: 10.1186/s12917-024-04103-x.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. In: *Staphylococcus aureus*. Elsevier, 2018. p. 87-103. DOI: 10.1016/B978-0-12-809671-0.00005-X.

VLKOVÁ, H.; BABÁK, V.; SEYDLOVÁ, R.; PAVLÍK, I.; SCHLEGELOVÁ, J. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 26, n. 5, p. 309-323, 2008. DOI: 10.17221/1128-CJFS.

YANG, X. et al. Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. *Food Control*, v. 90, p. 205-211, 2018. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.02.050.