

MILENE ZEZZI DO VALLE GOMES

**Utilização de biosurfatantes no controle da adesão bacteriana e na remoção de biofilmes de patógenos alimentares em superfície de poliestireno.**

Dissertação apresentada ao instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de mestre em Ciências, área de concentração: Química analítica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marcia Nitschke

São Carlos

2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 30/09/2011

Milene Zezzi do Valle Gomes

Milene Zezzi do Valle Gomes

*Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;  
Glória, pois, a Ele eternamente. Amém.*

Rm 11:36

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente quero agradecer a Deus, o qual sempre me guiou, me protegeu, e me deu forças para que hoje eu pudesse concluir mais esta etapa de minha formação.

Agradeço aos meus familiares, em especial ao meu pai Carlos e minha mãe Marisa, que me incentivaram desde pequena a lutar por meus sonhos e objetivos. Ao meu marido Adriano, que compartilhou comigo, todas as lutas, dificuldades e vitórias desde nossa graduação.

Meu sincero agradecimento também devo a Professora Dr<sup>a</sup> Marcia Nitschke, que além de aceitar me orientar no meu mestrado, teve paciência de me ensinar, de me corrigir, e certamente muito contribuiu para a minha formação pessoal e profissional.

Aos colegas de laboratório por me ajudarem, me apoiarem, e pela amizade que muito contribuiu para o desenvolvimento do meu mestrado. Obrigada também aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, João Pedro de F. Lima e Marília C. M. Peret, que sempre a disposição, me ajudaram em tudo quanto foi necessário.

Agradeço a técnica do IQSC Maria Aparecida da Silva pela amizade e pelos reagentes emprestados.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Canduri e ao Prof. Dr Júlio César do Borges (IQSC) por nos permitir o uso de seus laboratórios.

À Professora Eny Maria Vieira (IQSC) por disponibilizar o uso da leitora de microplacas.

À Débora T. Balogh do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) por nos permitir o uso do goniômetro, e ao técnico Bruno B. M. Torres por nos auxiliar no uso do equipamento.

Agradeço a professora Elizabeth Pizzolitto (FCF - Unesp araraquara) por nos ceder a linhagem de *Salmonella* Enteritidis PNCQ0301

Gostaria de agradecer também ao Marcio de Paula (CAQI-IQSC) pelo auxílio no uso do Microscópio eletrônico de varredura.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Na natureza, os microorganismos podem apresentar forma de vida planctônica ou podem estar aderidos a superfícies formando comunidades conhecidas como biofilmes. A formação de biofilmes na indústria alimentícia é uma constante preocupação visto que os microorganismos aderidos podem causar contaminações persistentes, levando a deterioração do alimento e a transmissão de doenças. Uma alternativa para evitar a adesão bacteriana e a formação de biofilmes é o pré-condicionamento de superfícies com biosurfatantes, que são compostos tensoativos de origem microbiana capazes de alterar as propriedades físico-químicas e conseqüentemente modificar as interações entre a bactéria e a superfície. Os biosurfatantes, surfactina obtida de *Bacillus subtilis* e ramnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa*, foram testados quanto a capacidade de evitar a adesão e remover biofilmes de bactérias patogênicas de interesse alimentar. Foram avaliadas culturas individuais e mistas de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella* Enteritidis utilizando-se como modelo superfícies de poliestireno. O pré-condicionamento da superfície com surfactina na concentração de 0,25% reduziu a adesão de *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes* em 42%, enquanto que o tratamento com ramnolipídeo a 1% reduziu a adesão de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* ao poliestireno em 57,8% e 67,8% respectivamente. O condicionamento com os biosurfatantes não se mostrou eficiente na redução da adesão das culturas mistas das bactérias se comparado aos resultados obtidos para as culturas individuais. O poliestireno condicionado com os biosurfatantes apresentou redução na hidrofobicidade devido ao caráter aniônico destas moléculas. A repulsão eletrostática e a redução das interações hidrofóbicas promovidas pelo

condicionamento do poliestireno com ramnolípídeo foram fatores determinantes na atividade antiadesiva observada para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, entretanto os resultados obtidos para a superfície tratada com surfactina sugerem que outros parâmetros influenciaram nos resultados observados. Após 2 h de contato a surfactina na concentração de 0,1% promoveu a remoção de 63,7% do biofilme de *S. aureus*, 95,9% do biofilme de *L. monocytogenes*, 35,5% do biofilme de *S. Enteritidis* e 58,5% do biofilme da cultura mista das três bactérias. Já o ramnolípídeo na concentração de 0,25% removeu 58,5% do biofilme de *S. aureus*, 26,5% do biofilme de *L. monocytogenes*, 23,0 % do biofilme de *S. Enteritidis* e 24% do biofilme da cultura mista após 2 h contato. De modo geral, o aumento do tempo de contato e da concentração dos biosurfatantes reduziu a remoção dos biofilmes. A surfactina e o ramnolípídeo demonstraram potencial para uso como agentes anti-adesivos assim como para a remoção de biofilmes de bactérias patogênicas de importância alimentar.

Palavras-chave: Adesão bacteriana, biofilmes, biosurfatantes, ramnolípídeo, surfactina.

## ABSTRACT

In nature, microorganisms can live as planktonic cells or can be found living in communities attached in surfaces forming biofilms. Biofilm represents a great concern for food industry, since it can be a source of persistent contamination that can lead to food spoilage and the transmission of diseases. To avoid the adhesion of bacteria and the formation of biofilms, an alternative is the pre-conditioning of surfaces using biosurfactants that are microbial compounds that can modify the physico-chemical properties of the surfaces changing bacterial interactions and consequently adhesion. The biosurfactants, surfactin obtained from *Bacillus subtilis* and rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*, were evaluated as agents to avoid the adhesion and to disrupt biofilms of food-borne pathogenic bacteria. Individual cultures and mixed cultures of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis were studied using polystyrene as the model surface. The pre-conditioning with surfactin 0,25% reduces in 42,0% the adhesion of *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*, whereas the treatment using rhamnolipids 1,0% reduced in 57,8% the adhesion of *L. monocytogenes* and in 67,8% the adhesion of *S. aureus* to polystyrene. The conditioning of surface with biosurfactants was less effective to avoid adhesion of mixed cultures of the bacteria when compared with the results obtained for individual cultures. The polystyrene surface conditioned with the biosurfactants showed a reduction in the hydrophobicity due to the anionic character of the molecules. The electrostatic repulsion and the reduction on hydrophobic interactions promoted by the conditioning of surface with rhamnolipids were determinant factors to explain the anti-adhesive activity observed for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, however, the data obtained with surfactin suggest



that other parameters have influenced the results observed. After 2 h contact with surfactin at 0,1% concentration, the pre-formed biofilms of *S. aureus* were reduced by 63,7%, *L. monocytogenes* biofilms were reduce by 95,9% , *S. Enteritidis* biofilms by 35,5% and the mixed culture biofilm by 58,5%. The rhamnolipids at 0,25% concentration removed 58,5% of biofilm of *S. aureus*, 26,5% of the biofilm of *L. monocytogenes* , 23,0% the biofilm of *S. Enteritidis* and 24,0% the biofilm of the mixed culture after 2 h of contact. In general, the increase in concentration of biosurfactants and in the time of contact decreases the biofilm remove percentage. These results demonstrate that surfactin and rhamnolipids present potential to be used as agents to control the attachment and to disrupt biofilms of food-borne pathogens.

Key-words: bacterial adhesion, biofilm, biosurfactants, rhamnolipid, surfactin

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do desenvolvimento de um biofilme bacteriano. 1. Adesão reversível; 2. Adesão irreversível; 3. Crescimento do biofilme; 4. Maturação do biofilme; 5. Dispersão.....	21
Figura 2. Estrutura química do mono-ramnolípídeo e di-ramnolípídeo.....	29
Figura 3. Estrutura química da principal isoforma da surfactina.....	31
Figura 4. Cinética de adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de surfactina. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão..	51
Figura 5. Cinética de adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de ramnolípídeo. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão..	52
Figura 6. Comparação do efeito da surfactina e ramnolípídeos na cinética de adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfície de poliestireno. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão.....	52
Figura 7. Cinética de adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de surfactina. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão.....	53
Figura 8. Cinética de adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de ramnolípídeo. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão.....	54
Figura 9. Comparação do efeito da surfactina e ramnolípídeos na cinética de adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis em superfície de poliestireno. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão.....	54

Figura 10. Cinética de adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de surfactina. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão. .55	55
Figura 11. Cinética de adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de ramnolípídeo. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão. .56	56
Figura 12. Cinética de adesão da cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em superfície de poliestireno condicionada com solução de surfactina 0,25%. Os pontos representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão. ....58	58
Figura 13. Coloração de Gram da cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis aderida ao poliestireno após 24 h de incubação. Imagem obtida em microscópio ótico de campo claro em aumento de 1000x.....59	59
Figura 14. Cinética de adesão da cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em superfície de poliestireno condicionada com solução de ramnolípídeo 1,0 %. Os pontos representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão. ....60	60
Figura 15. Coloração de Gram da cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> aderida ao poliestireno após 24 h de incubação. Imagem obtida em microscópio ótico de campo claro em aumento de 1000x.....61	61
Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes de <i>S. aureus</i> em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão. .74	74
Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> , em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes $\pm$ erro padrão. ....75	75

Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão. ....76

Figura 19. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes mistos de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão. ....78

Figura 20. Imagens de MEV do biofilme de *Listeria monocytogenes* sobre a superfície de poliestireno após 48 h de incubação a) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 10000X); b) Com a adição de surfactina 0,1% por 2 h (Ampliação 10000X); c) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 20000X); d) Com a adição de surfactina 0,1% por 2 h (Ampliação 20000X). ....81

Figura 21. Imagens de MEV do biofilme formado por de cultura mista de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Enteritidis sobre a superfície de poliestireno após 48 h de incubação a) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 10000X); b) Após adição de surfactina 0,1% por 2 h (Ampliação 10000X); c) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 20000X); d) Após adição de surfactina 0,1% por 2h (Ampliação 20000X); .....83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de reagentes utilizados neste trabalho.....	38
Tabela 2. Relação de equipamentos e materiais utilizados neste trabalho.....	39
Tabela 3. Medidas de ângulo de contato da água em superfícies de poliestireno condicionadas com diferentes concentrações de biosurfatantes. ....	63
Tabela 4. Teste de adesão microbiana a solventes mostrando a porcentagem de afinidade das células bacterianas a diferentes solventes.....	67
Tabela 5. Porcentagem de remoção dos biofilmes bacterianos formados sobre a superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato com soluções de surfactina.....	75
Tabela 6. Porcentagem de remoção dos biofilmes bacterianos formados sobre a superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato com soluções de ramnolipídeo.....	76
Tabela 7. Porcentagem de remoção dos biofilmes de cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis formados sobre a superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato com soluções de surfactina e ramnolipídeo.....	78

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs- Absorbância

AC- Ângulo de contato

ANOVA- Análise de variância

ATCC- American Type Culture Collection

BS- Biosurfatante

CMC- Concentração micelar crítica

DO- Densidade ótica

MATS- Teste de adesão microbiana a solventes

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

MPE- Material polimérico extracelular

PNCQ- Programa nacional de controle de qualidade

TSYEA- Ágar tripticase de soja e extrato de levedura

TSYEB- Caldo tripticase de soja e extrato de levedura

ufc- unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
2.1 Biofilmes .....	20
2.1.2 Etapas de formação do biofilme .....	21
2.1.3 Fatores envolvidos na adesão bacteriana a superfícies .....	23
2.2 Resistência dos microorganismos em biofilmes .....	26
2.3 Biofilmes formados por culturas mistas .....	27
2.4 Biosurfatantes .....	27
2.4.1 Ramnolípido .....	29
2.4.2 Surfactina .....	30
2.4.3 Uso de biosurfatantes no condicionamento de superfícies e na remoção de biofilmes .....	31
2.5 Patógenos Alimentares .....	33
2.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
2.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
2.5.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	35
3. OBJETIVOS .....	37
3.1 Objetivo geral .....	37
3.2 Objetivos Específicos .....	37
4. METODOLOGIA .....	38
4.1 Reagentes e equipamentos .....	38
4.2 Obtenções dos Biosurfatantes .....	40
4.3 Microorganismos .....	41
4.4 Preparo do meio de cultura .....	41
4.5 Manutenção dos microorganismos .....	42
4.6 Preparo e padronização do inóculo bacteriano .....	42
4.7 Quantificação da adesão bacteriana em poliestireno .....	43
4.8 Condicionamento da superfície .....	44
4.9 Quantificação da adesão bacteriana em poliestireno condicionado com BS .....	44

4.10	Quantificação da adesão de culturas mistas em poliestireno condicionado com BS .....	44
4.11	Ação dos biosurfatantes sobre biofilmes pré-formados .....	45
4.12	Medida do ângulo de contato.....	45
4.13	Teste de adesão microbiana a solventes (MATS) .....	46
4.14	Microscopia eletrônica de varredura .....	47
4.15	Microscopia de campo claro .....	48
4.16	Análise Estatística .....	48
4.17	Descarte de material.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	Propriedades dos biosurfatantes obtidos .....	50
5.2	Atividade antiadesiva dos biosurfatantes.....	50
5.3	Atividade antiadesiva dos biosurfatantes sobre culturas mistas .....	57
5.4	Discussão sobre o efeito da concentração dos biosurfatantes na inibição da adesão bacteriana .....	61
5.5	Caracterização da superfície de poliestireno .....	62
5.6	Caracterização físico-química das células bacterianas .....	65
5.6.1	Discussão sobre o efeito do condicionamento da superfície de poliestireno com biosurfatantes sobre a adesão bacteriana .....	68
5.6.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	68
5.6.1.2	<i>Salmonella</i> Enteritidis .....	69
5.6.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	70
5.6.1.4	Cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	71
5.6.1.5	Cultura mista de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> .....	72
5.7	Ação dos biosurfatantes na remoção de biofilmes .....	72
5.8	Ação dos biosurfatantes na remoção de biofilme de cultura mista .....	77
5.9	Discussão sobre ação dos biosurfatantes na remoção de biofilmes pré-formados.....	79
5.10	Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
5.11	Principais resultados.....	83
5.12	Considerações finais.....	85
6.	CONCLUSÃO.....	87
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	88



## 1.INTRODUÇÃO

As bactérias podem viver livres ou aderidas a superfícies formando comunidades conhecidas como biofilmes. O modo de vida planctônico, entretanto é pouco observado na natureza uma vez que quando estabelecidas em biofilmes as bactérias estão mais protegidas de condições externas desfavoráveis; da ação de compostos antimicrobianos e, além disso, no interior de um biofilme as trocas gênicas são favorecidas.

Os biofilmes podem ser formados sobre materiais abióticos tais como plástico, aço inoxidável, silicone, vidro e borracha, principalmente se estes materiais estão em contato com compostos orgânicos, inorgânicos, ou biológicos que se adsorvem no material e facilitam a adesão do microorganismo a superfície.

A adesão inicial de uma bactéria em determinada superfície ocorre através de interações fracas tais como interações de van der Waals, interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas entre a célula e a superfície. Impedir este primeiro estágio é fundamental para se evitar o desenvolvimento do biofilme, visto que as demais etapas envolvem interações fortes como ligação de hidrogênio, e ligações iônicas e covalentes, além da produção de substâncias extracelulares, o que torna o biofilme muito mais resistente.

Biofilmes têm sido uma preocupação constante principalmente para a indústria alimentícia, pois podem causar a contaminação do alimento podendo levar a deterioração e a transmissão de doenças.

Para controlar a formação destes biofilmes, alguns fatores como limitação de nutrientes e água, o formato do equipamento e o controle da temperatura são importantes. Além disso, a limpeza efetiva das superfícies é crucial para assegurar a

qualidade e inocuidade dos produtos. Em geral são utilizados compostos como halogênios, peróxidos, ácidos e detergentes aniônicos ou quaternários de amônio. Entretanto, estes métodos químicos de limpeza de superfícies apresentam algumas desvantagens devido à toxicidade, o que pode impedir a utilização dos mesmos em um ambiente de manufatura de alimentos, além de não serem biodegradáveis. Portanto, é essencial o desenvolvimento de estratégias alternativas para controlar a adesão microbiana e assim evitar contaminações.

Uma estratégia é o pré-condicionamento de superfícies com biosurfatantes (BS), os quais são compostos tensoativos de origem microbiana que apresentam baixa toxicidade e são altamente biodegradáveis. Estes compostos são capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial e formar micelas e microemulsões entre diferentes fases, além de adsorverem em superfícies alterando assim o ambiente no qual ocorre a formação de biofilmes bacterianos. Uma variedade de compostos surfatantes, com diferentes estruturas são produzidos por bactérias, fungos e leveduras. Entre os principais biosurfatantes estão os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, os quais são bastante explorados para uso em diferentes processos industriais. Alguns estudos recentes têm revelado que os biosurfatantes podem apresentar atividade antiadesiva por modificar propriedades físico-químicas da superfície, e além disso, podem ser aplicados para romper biofilmes já formados, uma vez que atuam penetrando no biofilme e provocando a dispersão das células aderidas. Como as bactérias na natureza encontram-se normalmente em ambientes colonizados por várias espécies, é de interesse, que os biosurfatantes também sejam capazes de impedir a adesão de culturas mistas de microorganismos, assim como também romper os biofilmes pré-formados por estes.

Neste trabalho os biosurfatantes surfactina e ramnolípídeo foram avaliados quanto a sua capacidade de reduzir a adesão de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis em superfícies de poliestireno e como agentes para remoção de biofilmes estabelecidos de culturas individuais e mistas dos respectivos patógenos alimentares.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biofilmes**

Muitas bactérias existem predominantemente aderidas a superfícies em contato com líquidos, formando biofilmes (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Biofilmes podem ser definidos como uma população de células microbianas que crescem em uma superfície e são revestidas por uma matriz de produtos extracelulares, produzidos pelos próprios microorganismos (KALMOKOFF et al., 2001; STEPANOVIC et al., 2004). Pode-se ainda dizer, que os biofilmes consistem de microcolônias presentes em superfícies, que se desenvolveram em comunidades organizadas com heterogeneidade funcional, visto que as células em diferentes regiões de um biofilme exibem diferentes padrões de expressão gênica (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, et al., 1999).

A adesão de um determinado microorganismo em uma superfície pode ser afetada pelas propriedades químicas e físicas da célula e do substrato, e pela composição do meio envolvente, o qual pode agir como um filme de condicionamento em um substrato abiótico (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

A formação de biofilmes pode ser considerada uma vantagem para o microorganismo, uma vez que a formação do mesmo permite a sobrevivência das bactérias em condições ambientais desfavoráveis (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, et al., 1999).

### 2.1.2 Etapas de formação do biofilme

Muitas teorias têm sido propostas com relação à formação de biofilmes, mas algumas etapas fundamentais são concordantes em todas elas, que incluem adsorção celular, crescimento do microorganismo, maturação do biofilme e dispersão das células (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

O processo de adesão celular pode ocorrer em duas etapas distintas, a adesão inicial, que é considerada reversível, onde atuam apenas forças fracas, e a adesão irreversível no qual já há a produção de material polimérico extracelular (MPE) e as forças atuantes são forças consideradas fortes.

As etapas de formação do biofilme estão ilustradas na Figura 1 (STOODLEY et al., 2002).

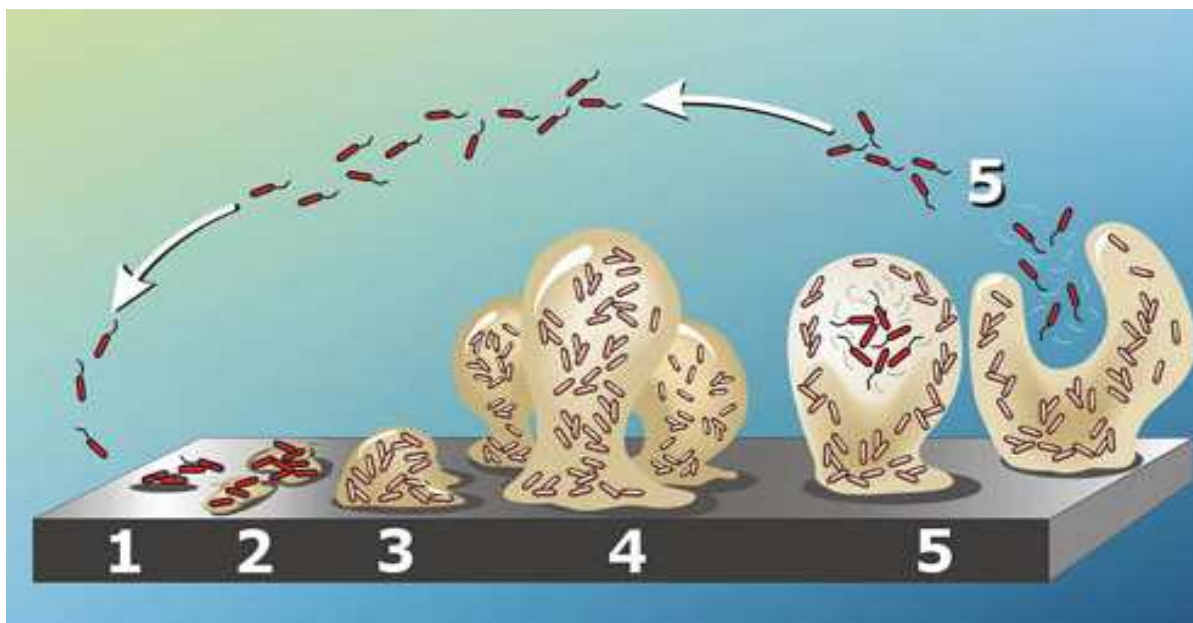


Figura 1. Etapas do desenvolvimento de um biofilme bacteriano. 1. Adesão reversível; 2. Adesão irreversível; 3. Crescimento do biofilme; 4. Maturação do biofilme; 5. Dispersão.

O processo inicial de adesão da bactéria pode ser considerado ativo ou passivo dependendo da motilidade celular. A adesão quando passiva, é dirigida pela gravidade, difusão e dinâmica de fluidos. Na adesão ativa, as propriedades da superfície celular como flagelo, pili, cápsula e carga da superfície facilitam a adesão. Esta adsorção inicial das células à superfície se dá através de interações fracas, tais como forças de van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Durante este estágio, a bactéria pode ser removida facilmente por lavagem (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ALLISON, 2003, PALMER; FLINT; BROOKS, 2007).

Na etapa da adesão irreversível da bactéria inicia-se a produção de MPE e as forças atuantes neste estágio incluem ligações covalentes e ligações de hidrogênio o que torna a adesão do microorganismo irreversível, e assim, sua remoção por métodos químicos e físicos mais complexa (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ALISON, 2003, PALMER; FLINT; BROOKS, 2007).

Na terceira etapa de desenvolvimento do biofilme as células passam por um processo de agregação e crescimento dos microorganismos acompanhado pela produção extensiva de MPE resultando no início da formação de microcolônias e canais de água (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Na etapa de maturação o biofilme apresenta uma estrutura complexa com áreas densas, poros e canais formando uma arquitetura tridimensional. Esta arquitetura é influenciada por condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade bacteriana e a presença de MPE. A presença de poros e canais permite a passagem de nutrientes e água para as células do biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A etapa de dispersão do biofilme envolve a liberação de células planctônicas ou de microcolônias. Este processo pode gerar bactérias livres capazes de

disseminar uma contaminação (BOLES; THOENDEL; SINGH, 2005). A dispersão das células dos biofilmes causa muita preocupação para a indústria alimentícia, pois, se estas células forem transferidas aos alimentos podem causar a deterioração, perda da qualidade ou veiculação de doenças (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

### **2.1.3 Fatores envolvidos na adesão bacteriana a superfícies**

#### **2.1.3.1 Hidrofobicidade**

A hidrofobicidade celular pode afetar a taxa e extensão da adesão microbiana a superfícies, uma vez que interações hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza não polar das superfícies envolvidas no processo de adesão (SIMÕES;SIMÕES;VIEIRA,2010). Desta maneira, as superfícies hidrofóbicas parecem favorecer a colonização provavelmente porque estas superfícies favorecem a aproximação do microorganismo pela eliminação da camada de água presente na interface (ZERAIK; NITSCHKE, 2010).

Para a maioria dos microorganismos a taxa de adesão em superfícies sólidas aumenta com o aumento da hidrofobicidade da superfície, desta maneira, a redução da hidrofobicidade poderia reduzir a adesão de microorganismos. Nitschke et al. (2009) relatam que o condicionamento da superfície com surfactina causou uma redução na adesão de *Enterobacter sakazakii* e *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável e isto pode estar relacionado com a redução da hidrofobicidade após o condicionamento. Shakerifard et al. (2009) também constataram que o condicionamento de superfícies de aço inoxidável com

lipopeptídeos tornou a superfície mais hidrofílica provocando alterações na adesão de *Bacillus cereus*.

### **2.1.3.2 Apêndices celulares**

Estruturas celulares como flagelos e pili podem auxiliar no processo de adesão (SIMÕES;SIMÕES;VIEIRA,2010).

O flagelo, quando existente, é responsável pela motilidade celular, e é capaz de movimentar a bactéria, podendo aproximá-la do substrato, fazendo com que possíveis forças repulsivas sejam superadas favorecendo a adesão (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

O pili encontrado em muitas bactérias Gram-negativas não está envolvido no processo de locomoção, tendo com função de facilitar a adesão a outras células bacterianas e a partículas inorgânicas (SIMÕES;SIMÕES;VIEIRA,2010). Sauer e Camper (2001) relataram uma mudança na expressão gênica de proteínas e componentes estruturais de flagelos e pili da bactéria *Pseudomonas putida* durante sua adesão inicial a superfície de silicone. Os autores demonstraram que os apêndices celulares foram importantes no processo de adesão, pois auxiliaram a superar a repulsão eletrostática inicial existente entre a bactéria e o substrato.

### **2.1.3.3 Material polimérico extracelular**

As células bacterianas em um biofilme estão envoltas por uma matriz polimérica produzida pelos próprios microorganismos (FLEMMING; WINGENDER,



2010). O MPE foi inicialmente chamado de polissacarídeo extracelular, entretanto, pesquisas posteriores mostraram que a matriz poderia conter polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, fosfolipídios e substâncias húmicas, sendo que os polissacarídeos e proteínas representam de 75-89% da composição de MPE (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SIMÕES;SIMÕES;VIEIRA,2010). A composição e quantidade de MPE em um biofilme variam de acordo com o microorganismo, temperatura e disponibilidade de nutrientes e biomassa (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Algumas destas macromoléculas são neutras, mas a maioria dos exopolissacarídeos é polianiónica devido à presença de ácido urônico ou piruvato. Resíduos inorgânicos como fosfato ou raramente sulfato, também tornam as moléculas de MPE aniônicas. Poucas moléculas de MPE são policatiônicas, um exemplo é um polímero com propriedades adesivas produzido por *Staphylococcus epidermidis* (SUTHERLAND, 2001).

Os MPEs são capazes de manter as células do biofilme imobilizadas e próximas suficiente uma das outras permitindo interações intensas e comunicação célula-a-célula. A matriz polissacarídica pode atuar como um centro de reciclagem mantendo todos os componentes de células lisadas disponíveis, e ainda as moléculas de MPE podem servir como fonte de nutriente, apesar de alguns componentes serem degradados lentamente e necessitarem de enzimas específicas (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os MPEs também protegem os microorganismos de condições adversas, como na presença de biocidas, oxidação, radiação ultra-violeta, defesas do sistema imunológico do hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SIMÕES;SIMÕES;VIEIRA,2010; SUTHERLAND, 2001). Além disso, MPEs são responsáveis por manter uma camada de alta hidratação em torno do biofilme,

evitando assim problemas de dessecação e variação de umidade (SUTHERLAND, 2001).

## **2.2 Resistência dos microorganismos em biofilmes**

A problemática relacionada à formação de biofilme deve-se ao fato que as células apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos e detergentes do que quando livres (NICOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Os biofilmes podem ser 10-1000 vezes mais resistentes a compostos antimicrobianos do que as respectivas células planctônicas (TOMIHAMA; NISHI; ARAI, 2007). Esta resistência pode estar relacionada com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Infecções em próteses e cateteres causadas por biofilmes são muito comuns; e a resistência do biofilme é uma preocupação constante, sendo necessária uma troca periódica destes materiais médicos, demandando tempo, custos e podendo causar danos aos pacientes (RODRIGUES et al., 2006).

Na indústria de alimentos, operações de lavagem e sanitização mesmo que frequentes, nem sempre garantem a eliminação completa dos biofilmes, isto porque, além destes apresentarem maior resistência aos métodos de desinfecção, muitas das superfícies em contato com alimentos, como as tubulações e equipamentos, apresentam sulcos, rugosidades, rachaduras e “zonas mortas” (de baixo fluxo) onde os biofilmes se desenvolvem mais facilmente (MAUKONEN et al., 2003).

### **2.3 Biofilmes formados por culturas mistas**

Normalmente os microorganismos não são encontrados isoladamente, mas sim em populações contendo duas ou mais espécies interagindo entre si (SADOWSKA et al., 2009). Uma espécie no biofilme pode ser favorecida pela presença de outra espécie em uma interação chamada de comensalismo. Um exemplo pode ser o consumo de oxigênio por uma espécie aeróbica facilitando o crescimento de uma espécie microaerofílica (NICOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Entretanto, devido à competição por espaço e nutrientes, algumas bactérias são capazes de impedir ou reduzir a adesão de outras bactérias pela excreção de substâncias antagonistas. Lerich e Carpentier (2000) relatam que a presença de biofilme de *Staphylococcus sciuri* é capaz de limitar a adesão e o crescimento de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável. A adesão mista pode ser favorecida pela produção de uma variedade de moléculas de MPE, tornando os biofilmes formados por culturas mistas mais estáveis em ambientes desfavoráveis do que biofilmes formados por apenas uma espécie de microorganismo (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

### **2.4 Biosurfatantes**

Surfatantes são substâncias anfipáticas, ou seja, apresentam tanto grupos polares quanto hidrofóbicos em sua estrutura, e, portanto, se distribuem nas interfaces, onde adsorvem e alteram as condições físico-químicas presentes nas mesmas (ROSENBERG;RON, 1999). Este tipo de molécula quando produzida por um microorganismo, é denominada de biosurfatante (BS), os quais podem ser classificados como BS de baixa massa molecular, como os lipopeptídeos e

glicolípídeos; e BS de alta massa molecular, como polímeros, lipopolissacarídeos ou lipoproteínas (BANAT et al., 2010).

As estruturas únicas dos biosurfatantes têm despertado cada vez mais interesse por sua potencial aplicação em diferentes setores industriais, principalmente como alternativa para surfatantes químicos, especialmente na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica. Tal interesse se deve principalmente a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e atividade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (MAYER; SOBERÓN-CHÁVES, 2000; NITSCHKE et al., 2009). Os biosurfatantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (DESAI; BANAT, 1997).

Entre as principais aplicações dos biosurfatantes estão a bioremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, e uma ampla gama de usos em formulações da indústria de cosméticos, alimentícia, farmacêutica e agroquímica, principalmente como agente emulsificante, detergente e suspensivo (ROSENBERG; RON, 1999).

Mais recentemente foi proposto o uso de biosurfatantes para pré-tratamentos de materiais utilizados na indústria alimentícia visando evitar contaminações (BANAT et al., 2010). Os biosurfatantes podem modificar a hidrofobicidade de superfícies e conseqüentemente influenciar na adesão bacteriana as mesmas. Esta propriedade depende da hidrofobicidade inicial da bactéria, assim como da estrutura e concentração do biosurfatante (RIVARDO et al., 2009). De acordo com Rivardo et al. (2009), os biosurfatantes ainda podem afetar o desenvolvimento de flagelos, ocasionando mudanças na capacidade de adesão da bactéria.

### 2.4.1 Ramnolípídeo

Entre os principais biosurfatantes, destacam-se os ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Em cultura líquida, *P. aeruginosa* produz principalmente duas formas de ramnolípídeo: ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (mono-ramnolípídeo) e ramnosil-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (di-ramnolípídeo) (Figura 2), que são secretadas pela bactéria, principalmente durante a fase estacionária de crescimento (MAYER E SOBERÓN-CHÁVES, 2000).

Atualmente os ramnolípídeos são comercializados em formulações para diversos usos em cosméticos, na indústria farmacêutica, e principalmente como fungicida para uso na agricultura e como aditivo para favorecer a bioremediação de poluentes (RHAMNOLIPIDS, INC.).

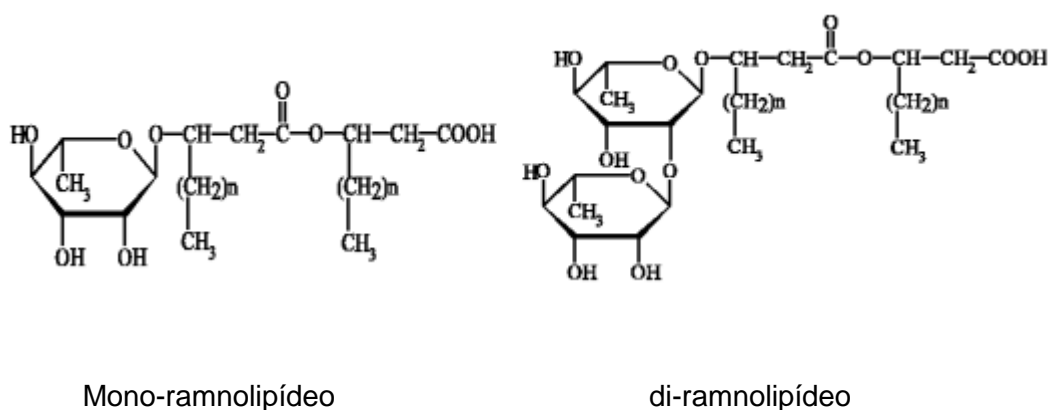


Figura 2. Estrutura química do mono-ramnolípídeo e di-ramnolípídeo

O uso de substratos de baixo custo tais como óleos de fritura utilizados, melão de açúcar de beterraba e manipueira têm sido estudados como alternativa para a produção de ramnolípídeo. Estratégias de cultivo e separação do

biosurfatante ainda necessitam de mais estudos, para tornar este produto passível de ser utilizado em larga escala para diversas aplicações (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011).

A capacidade do ramnolípídeo de formar e estabilizar emulsões é muito útil para a indústria de alimentos. Suas propriedades antiadesivas e antimicrobianas têm sido cada vez mais exploradas, o que pode levar ao seu uso como um ingrediente multipropósito para aplicações em alimentos (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011).

#### **2.4.2 Surfactina**

A surfactina é sintetizada por várias espécies do gênero *Bacillus*, principalmente por *Bacillus subtilis*, e recebeu esse nome devido a sua excepcional atividade surfatante (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). Este biosurfatante é capaz de reduzir a tensão superficial da água de  $72 \text{ mN m}^{-1}$  para  $25 \text{ mN m}^{-1}$ , a tensão interfacial contra hexadecano é menor que  $1 \text{ mN m}^{-1}$  e sua CMC é de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  (BARROS et al., 2007).

A surfactina é um lipopeptídeo que contém em sua estrutura um peptídeo cíclico composto de sete aminoácidos (L-asparagina, L-leucina, ácido glutâmico, L-leucina, L-valina e duas D-leucinas) ligados a uma cadeia de ácido graxo  $\beta$ -hidroxi contendo de 12 a 16 átomos de carbonos (BARROS et al., 2007; ZERAIK; NITSCHKE, 2010). A surfactina é sintetizada como uma mistura de moléculas homólogas que variam quanto ao número de átomos de carbono, sendo que a isoforma predominante contém 15 átomos de carbono (Figura 3).

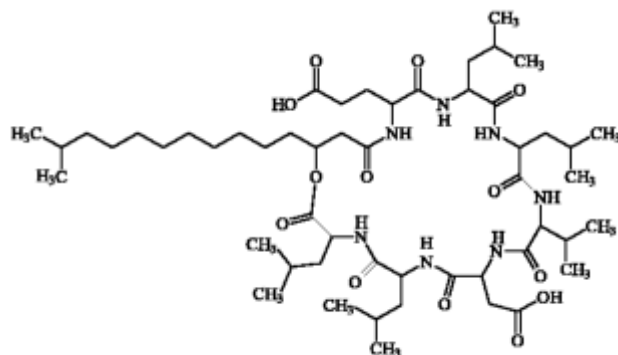


Figura 3. Estrutura química da principal isoforma da surfactina.

Este biosurfatante já vem sendo utilizado em processos de biorremediação, formação de emulsões em óleos e na degradação de pesticidas (BARROS et al., 2007). A surfactina ainda apresenta propriedades antibacterianas, anti-fúngicas e antivirais. Tais propriedades muitas vezes se devem a capacidade da surfactina em interferir na integridade de membranas biológicas (NITSCHKE et al., 2009; SHAKERIFARD et al., 2009; ZERAIK; NITSCHKE, 2010).

#### **2.4.3 Uso de biosurfatantes no condicionamento de superfícies e na remoção de biofilmes**

O uso de biosurfatantes no condicionamento de superfícies visando a inibição de adesão de microorganismos patogênicos tem sido cada vez mais explorado.

Meylheuc, Van Oss e Bellon-Fontaine (2001) observaram uma redução de 90% na adesão de *Listeria monocytogenes* em amostras de aço inoxidável após tratamento com o biosurfatante de *P. fluorescens*. Os autores demonstraram que a redução na adesão estava relacionada com mudanças das características físico-químicas da superfície do material provocadas pelo tratamento com o biosurfatante.

Rodrigues et al. (2006) estudaram os efeitos antiadesivos de ramnolipídeos sobre silicone estabelecendo que o condicionamento foi capaz de reduzir a adesão de *Rothia dendocariosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus salivarius* em 60,9%, 53,1% e 58,2% respectivamente; já *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram inibidas em 33,8%, 38,2% e 35,3% respectivamente. Mireles, Toguchi e Harshey (2001) relataram que a surfactina de *Bacillus subtilis* inibiu a formação de biofilmes de *Salmonella Enteritidis* em PVC e cateteres polivinílicos. Rufino et al. (2011) relataram em seus estudos que o biosurfatante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988 era capaz de reduzir acima de 90% a adesão de *Lactobacillus casei* em poliestireno. Kuiper et al. (2004) verificaram que biosurfatantes produzidos por *Pseudomonas putida* eram capazes de inibir a formação e remover biofilmes pré formados de diferentes linhagens de *Pseudomonas* em superfícies de PVC. Os biosurfatantes estão relacionados não apenas na inibição da adesão, mas também aceleram a dispersão de biofilmes pré-formados. Dusane et al. (2010) relataram que ramnolipídeos a uma concentração de 100 mM foram capazes de remover moléculas de MPE e romper 93% do biofilme de *Bacillus pumilus* formados em superfície de poliestireno. Irie, O`toole e Yuk (2005) demonstraram que ramnolipídeos de *P. aeruginosa* foram efetivos na remoção de biofilmes de *Bordetella Bronchiseptica* patógeno do trato respiratório. Os autores sugeriram que o uso combinado de biosurfatantes (capazes de romper as estruturas de biofilmes, liberando as células) e agentes antibióticos (mais eficientes contra células livres) poderá futuramente constituir-se em uma nova estratégia para tratamento de infecções. Rivardo et al. (2011) demonstraram efeito sinérgico entre biosurfatantes e antibióticos contra biofilme de *E. coli* CFT073. Os autores verificaram, que o biosurfatante obtido de *Bacillus licheniformis* V9T14 promoveu a



formação de poros através do MPE aumentando a atividade do antibiótico, devido a sua capacidade de penetrar no biofilme.

## **2.5 Patógenos Alimentares**

As indústrias alimentícias necessitam fornecer aos seus consumidores produtos inócuos e seguros. Desta maneira, a eliminação de patógenos comumente transmitidos por alimentos é essencial (NITSCHKE et al., 2009).

*Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são exemplos de patógenos comumente envolvidos em infecções alimentares. Estas bactérias são capazes de aderir nas superfícies durante o processamento de alimentos, promovendo a contaminação dos produtos (STEPANOVIC et al., 2004; NITSCHKE et al., 2009).

### **2.5.1 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, apresenta forma de cocobacilo, é móvel devido à presença de flagelos peritríquios e é aeróbia facultativa. Apresenta pH ótimo de crescimento entre 7,0 e 7,5 e temperatura ótima entre 25 °C e 30 °C, entretanto, este microorganismo pode se adaptar e sobreviver em condições variadas, tais como, baixas temperaturas (2-4 °C), alimentos ácidos e alta concentração salina (HOFFMANN, 2001). Desta maneira, este patógeno pode ser encontrado em uma variedade de alimentos crus e processados, tais como como leite, carnes e produtos cárneos, queijos, repolho e alimentos marinhos. (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

A infecção por *Listeria monocytogenes* pode causar a listeriose, uma grave doença, que pode vir a ser fatal, sendo que as implicações mais graves se dão em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos. Meningite, septicemia e outras infecções do sistema nervoso central são comumente vistas em pacientes com listeriose (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Os surtos relacionados com *L. monocytogenes* representam cerca de 28% das mortes causadas por doenças transmitidas por alimentos contaminados (MCLANDBOROUGH et al., 2006).

A resistência deste patógeno está baseada na sua capacidade de formar biofilmes em materiais como aço inoxidável, plásticos e superfícies de policarbonato (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; MCLANDBOROUGH et al., 2006; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Kalmokoff et al. (2001) demonstraram que 36 diferentes linhagens deste patógeno foram capazes de aderir em superfície de aço inoxidável. Stepanovic et al. (2004) relatam que *L. monocytogenes* apresenta alta capacidade de formação de biofilme em superfícies plásticas.

### **2.5.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, apresenta forma de cocos, que podem aparecer isolados, ou predominantemente em formato de cacho de uva. Esta bactéria apresenta pH ótimo de crescimento entre 6,0 e 7,0 e uma temperatura ótima de 37 °C (HOFFMANN, 2001). *S. aureus* não apresenta motilidade, não é capaz de esporular, e é aeróbia facultativa. Este microorganismo é comumente encontrado em diversas partes do corpo, como na pele, nariz, intestino e garganta. Esta colonização em indivíduos saudáveis normalmente é

assintomática, ocorrendo casos de infecções em situações de baixa imunidade (SANTOS et al., 2007).

As linhagens patogênicas de *Staphylococcus aureus* são capazes de produzir sete diferentes enterotoxinas associadas a doenças transmitidas por alimentos, conhecidas como enterotoxinas A, B C1, C2, C3, D e E. Estas são proteínas sorologicamente distintas, estáveis ao calor, que apresentam diferentes graus de toxicidade (MADIGAN; MARTINKO, 2006). Estas enterotoxinas afetam o intestino geralmente causando secreção massiva de fluidos no lúmen intestinal, causando vômitos e diarreia (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

A presença de *S. aureus* e toxinas produzidas por este muitas vezes não afetam a qualidade sensorial do produto, levando ao consumo do mesmo sem a percepção da contaminação, principal causa de gastroenterite estafilocócica (MADIGAN; MARTINKO, 2006).

Biofilmes de *Staphylococcus aureus* estão também presentes em infecções relacionadas a implantes médicos. O tratamento com antibióticos para este tipo de infecção não é muito efetivo devido à resistência das células do biofilme e ao sistema de defesa do hospedeiro (WALENCKA et al., 2006).

### **2.5.3 *Salmonella* Enteritidis**

*Salmonella* Enteritidis é uma bactéria Gram-negativa, apresenta forma de bastonete, é móvel devido a presença de flagelos peritríqueos e é aeróbia facultativa. Apresentam pH ótimo de crescimento entre 6,5 e 7,5 e temperatura ótima de 37 °C. São encontradas normalmente no trato intestinal de humanos e animais podendo causar infecções (HOFFMANN, 2001).

Infecções causadas por *Salmonella* são comumente conhecidas como salmonelose. Este tipo de infecção transmitida por alimentos contaminados pode ser considerado um dos maiores problemas de saúde pública, com implicações econômicas bastante relevantes. Alimentos associados com grandes surtos de *Salmonella* incluem leite em pó, queijo cheddar, ovos, patê de fígado, mostarda e chocolate (CARY; LINZ; BHATNAGAR, 2000).

Biofilmes formados por esta bactéria são comumente encontrados em equipamentos utilizados no processamento de aves, especialmente no abate, visto que este ambiente é úmido e rico em nutriente, e, portanto, ideal para a formação de biofilmes (CARY; LINZ; BHATNAGAR, 2000).

Estudos realizados por Stepanovic et al. (2004) mostraram que *Salmonella* spp são capazes de formar biofilme em superfícies plásticas e que a quantidade de biofilme formada é dependente da composição de nutrientes do meio de cultura, sendo que meios com limitação de nutrientes favoreceram a formação do biofilme de *Salmonella*. Nitschke et al. (2009) relatam que *Salmonella* Enteritidis também é capaz de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar a potencialidade da aplicação de biosurfatantes no controle da adesão e remoção de biofilmes de bactérias patogênicas de importância alimentar.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a cinética de adesão e formação de biofilmes de culturas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* sobre poliestireno.

- Verificar o efeito do condicionamento da superfície com biosurfatantes (surfactina e ramnolipídeos) sobre a adesão e a formação de biofilmes de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* em poliestireno.

- Estudar a atividade antiadesiva dos biosurfatantes sobre culturas mistas dos patógenos.

- Determinar a capacidade dos biosurfatantes em dispersar biofilmes pré-formados de culturas individuais e mistas de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* sobre poliestireno.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho encontram-se listados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Relação de reagentes utilizados neste trabalho

Reagente	Pureza	Marca
Ágar tripticase de soja		HIMEDIA
Caldo tripticase de soja		Acumedia
Extrato de levedura		Merck
Ágar nutriente		HIMEDIA
Cloreto de sódio P. A.	99%	Synth
Cristal violeta P.A.		Synth
Ácido acético Glacial P.A.	99,7%	QUEMIS
Álcool metílico P.A.	99,8%	QUEMIS
Decano	99%	Acros organics
Hexadecano	90-100%	JT Backer
Clorofórmio	99,8%	QUEMIS
Acetato de etila	99%	Mallinckrodt

Tabela 2. Relação de equipamentos e materiais utilizados neste trabalho

Equipamento	Modelo	Marca
Autoclave vertical	AV 50	Phoenix
Estufa bacteriológica		Adamo
Banho de Ultrassom		Cristófoli
Micro centrífuga	Mini spin	Eppendorf
Centrífuga refrigerada	Sorvall Legend RT+	Thermo Scientific
Agitador rotatório (Shaker)	MAXQ6000	Thermo Scientific
Cabine de segurança biológica	Bioprotector 12	Veco
Leitora de microplaca	TP-Reader	Thermoplate
Espectrofotômetro UV-Vis	Genesys 10 UV	Thermo Scientific
Agitador de tubos tipo vórtex	AV	Sieger
Microscópio ótico	Primo Star	Zeiss
Microscópio eletrônico de varredura	LEO 440	Zeiss
Metalizador	220	BAL-TEC Medical
Goniômetro	CAM 200	KSV
Placa de microtitulação de poliestireno com 96 poços esterilizada		Kartell
Placa de petri descartável		Cral

## 4.2 Obtenções dos Biosurfatantes

Foram utilizadas amostras de surfactina obtida de *B. subtilis* ATCC 21332 e ramnolipídeos de *P. aeruginosa* LBI produzidas conforme metodologia estabelecida em trabalhos anteriores (NITSCHKE; PASTORE, 2006; NITSCHKE et al., 2005).

Resumidamente:

- *produção de surfactina*: uma suspensão de *B. subtilis* foi preparada após cultivo das células por 24 h a 30°C em ágar nutriente. A suspensão contendo aproximadamente  $10^9$  ufc mL<sup>-1</sup> foi inoculada em erlenmeyers de 250 mL contendo 75 mL meio de produção de manipueira (resíduo do processo da farinha de mandioca) e incubados em agitador rotatório (shaker) a 150 rpm por 48 h a 30°C. A cultura resultante foi submetida a centrifugação (8000 g) por 20 minutos e o sobrenadante adicionado de HCl 6N promovendo a precipitação ácida do BS. O precipitado foi separado por centrifugação, redissolvido em água destilada pH 7,0 e seco em estufa 50°C e posteriormente extraído com mistura clorofórmio/metanol (1:1). O solvente foi filtrado e evaporado em estufa a 50 °C. O extrato bruto foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel 60 sendo eluído por três solventes de polaridade crescente: clorofórmio, clorofórmio:metanol (1:1) e metanol. As frações contendo a surfactina foram detectadas pela medida de absorbância a 220 nm e depois foram reunidas e evaporadas em estufa para obtenção da surfactina (NITSCHKE; PASTORE, 2006).

- *produção de ramnolipídeos*: uma suspensão de *P. aeruginosa* LBI foi preparada após cultivo das células por 24 h a 30°C em ágar nutriente. A suspensão contendo aproximadamente  $10^9$  ufc mL<sup>-1</sup> foi inoculada em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL meio de produção contendo: NaNO<sub>3</sub>, 4,0 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g



L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g L<sup>-1</sup>; KCL, 0,1 g L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 0,01 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 0,01 g L<sup>-1</sup> e 0,05 mL L<sup>-1</sup> de solução de elementos traços e 20,0 mL L<sup>-1</sup> de óleo de soja, incubando-se em agitador rotatório (shaker) a 200 rpm por 30°C por 120 h. A cultura resultante foi submetida à centrifugação (8000 g) por 20 minutos e o sobrenadante submetido a extração com clorofórmio/metanol (1:1). O solvente foi evaporado em evaporador rotatório obtendo-se o BS semi-purificado (NITSCHKE et al., 2005).

Os BS assim obtidos foram utilizados para realizar os ensaios posteriores.

### **4.3 Microorganismos**

Foram utilizadas cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Salmonella enterica* Enteritidis PNCQ0301 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **4.4 Preparo do meio de cultura**

Utilizou-se o meio de cultura sólido TSYEA: Ágar tripticase de soja (40 g L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura (6 g L<sup>-1</sup>) e meio de cultura líquido TSYEB : Caldo de tripticase de soja (40 g L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura (6 g L<sup>-1</sup>).

Para preparo dos meios de cultura, os reagentes foram dissolvidos em água destilada, o pH ajustado para  $7,3 \pm 0,2$  e os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C.

#### **4.5 Manutenção dos microorganismos**

As culturas dos microorganismos foram inoculadas em placas contendo TSYEA e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Na placa foram adicionados 4 ml de TSYEB contendo 20% de glicerol. Após remoção com auxílio de alça de inoculação, 1 ml da suspensão bacteriana foi adicionado à tubos criogênicos, os quais foram mantidos a -20 °C e a -80 °C.

#### **4.6 Preparo e padronização do inóculo bacteriano**

As culturas mantidas em estoques a -20 °C foram inoculadas em placas contendo ágar TSYEA e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Na placa foram adicionados 9 mL de solução salina esterilizada e removendo-se a biomassa com auxílio de alça de inoculação. A suspensão bacteriana obtida foi submetida a diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Gotas de 15 µL de cada diluição foram depositadas em placas e incubadas a 35 °C por 24 h. Foi realizada a contagem de colônias nas gotas que possuíram de 5 a 50 unidades formadoras de colônia (ufc) (MILES; MISRA, 1938) O número de células foi determinado pela média do número de colônias, multiplicado pela diluição, obtendo-se assim o número de ufc por mililitro de solução.

O número de células foi relacionado com a medida de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 610 nm visando padronizar o inóculo para os ensaios de adesão. A população celular foi ajustada para aproximadamente  $10^9$  ufc mL<sup>-1</sup> estabelecendo-se a DO correspondente a este valor para proceder aos testes de

adesão. Este procedimento foi realizado com cada uma das bactérias a serem testadas.

#### **4.7 Quantificação da adesão bacteriana em poliestireno**

A superfície modelo escolhida para os ensaios foi o poliestireno. Para monitorar a habilidade das bactérias estudadas em aderir ao material foram utilizadas placas de microtitulação e a adesão foi determinada segundo metodologia descrita por Mireles, Toguchi e Harshey (2001). Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana preparadas conforme descrito no item 4.6 foram inoculadas na microplaca contendo 180  $\mu\text{L}$  de caldo de cultivo (TSYEB) incubando-se a 35°C. As culturas foram removidas e os orifícios lavados com água destilada. O material aderido foi fixado com metanol (200  $\mu\text{L}$  por 15 minutos) e a adesão bacteriana visualizada após coloração com 200  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cristal violeta 1,0 %. O orifício foi lavado com água destilada e deixado para secar. O corante foi extraído com 200  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de ácido acético glacial 33,0% procedendo-se a leitura da densidade óptica da solução a 630 nm. Foram retiradas amostras em diferentes intervalos de tempo para definir inicialmente a cinética de adesão bacteriana sobre o material sem tratamento prévio com os BS.

#### **4.8 Condicionamento da superfície**

Foram preparadas soluções aquosas de surfactina (0,5%, 0,25% e 0,1%) e ramnolipídeo (1,0%, 0,5% e 0,25%). As soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm.

Os orifícios da microplaca foram preenchidos com 200 µL de solução aquosa de surfactina (0,5%, 0,25%, 0,1%) ou ramnolipídeos (0,25%, 0,5% e 1,0%) deixando-se em contato por 24 horas a 25 °C, e em seguida foram lavados 3 vezes com 200 µL de água deionizada esterilizada para retirar o excesso de BS.

#### **4.9 Quantificação da adesão bacteriana em poliestireno condicionado com BS**

Após tratamento prévio com os BS (item 4.8) e lavagem da placa, o ensaio descrito no item 4.7 foi repetido para evidenciar o efeito do condicionamento prévio sobre a adesão das bactérias em crescimento ativo. Como controles foram utilizados orifícios contendo água.

#### **4.10 Quantificação da adesão de culturas mistas em poliestireno condicionado com BS**

Uma vez avaliado o efeito do condicionamento com BS sobre culturas individuais foi avaliado o efeito condicionante em culturas mistas ( $10^9$  ufc mL<sup>-1</sup>). Para isso 1 ml do inóculo de cada uma das bactérias obtidos conforme item 4.6 foi adicionado a um tubo de ensaio e a mistura foi homogeneizada em agitador tipo vortex. Foi avaliada

a adesão da cultura mista conforme item 4.7 e posteriormente a capacidade antiadesiva dos BS sobre a cultura mista conforme item 4.8 e 4.9.

#### **4.11 Ação dos biosurfatantes sobre biofilmes pré-formados**

As bactérias foram incubadas como descrito no item 4.7 por 24 h. Após este período o meio de cultura foi removido e adicionou-se novamente 180 µL de meio de cultura fresco e 20 µL de inóculo, incubando-se por mais 24 h para o estabelecimento de biofilmes característicos sobre a microplaca. Uma vez estabelecido o biofilme (48 h), o meio de cultura foi removido e foram adicionados 200 µL das soluções de surfactina 0,1% e 0,5% e ramnolipídeo 0,25% e 1,0% deixando-se em contato por diferentes intervalos de tempo (2 h, 6 h, 12 h). Após cada tempo a solução de biosurfatante foi retirada e os orifícios lavados procedendo-se a coloração conforme descrito no item 4.7. A quantidade de biofilme removida pelos BS foi comparada com controle adicionado de água destilada.

Além da avaliação em biofilmes individuais também foi avaliada a remoção de biofilmes obtidos por cultivos mistos. O inóculo foi obtido como descrito no item 4.10, e em seguida, procedeu-se como o realizado para os testes em biofilmes individuais.

#### **4.12 Medida do ângulo de contato**

Para estabelecer o efeito do condicionamento sobre as características físico-químicas da superfície sólida foram efetuadas medidas do ângulo de contato da água.

Amostras de poliestireno de 3 cm<sup>2</sup> foram submetidas ao ultrassom (40 hz) em álcool etílico 95% por 10 minutos, enxaguadas e colocadas novamente em ultrassom com mistura de água e detergente comercial (2:100) por mais 10 minutos (ZERAİK, 2009). Em seguida as amostras foram lavadas com água destilada e deixadas secar em papel absorvente.

As amostras foram deixadas em soluções de surfactina 0,1%, 0,25% e 0,5% e ramnolípídeo 1,0%, 0,5% e 0,25% em temperatura ambiente por 24 h, lavadas com 10 ml de água e colocadas em dessecador. Para controle a amostra de poliestireno foi deixada em contato com a água destilada esterilizada por 24 h.

Foram depositadas sobre as amostras, gotas de água de 4 µL utilizando-se o método da gota séssil a 20 °C, e o ângulo entre a gota e a superfície foi determinado utilizando-se goniômetro.

#### **4.13 Teste de adesão microbiana a solventes (MATS)**

Com o objetivo de caracterizar a natureza hidrofílica/hidrofóbica da superfície celular das bactérias foi realizado teste de adesão a solventes (MATS), que consiste na avaliação da afinidade das células bacterianas a solventes polares e apolares (MEYLHEUC; VAN OSS; BELLON-FONTAINE, 2001). Foram utilizados quatro solventes: clorofórmio, hexadecano, acetato de etila e decano. Alíquotas de 2,4 mL de suspensão bacteriana ( $10^9$  ufc mL<sup>-1</sup> em NaCl 0,15 M) foram adicionadas de 0,4 mL de solvente. A mistura foi submetida a vortex máximo por 2 minutos e deixada em repouso por 15 minutos para separação de fases. A leitura de absorbância da fase aquosa foi realizada a 400 nm e a porcentagem de células aderidas calculada conforme a equação abaixo:

$\% \text{ Adh} = (1-A/A_0) \times 100$  , onde  $A_0$  = absorvância da suspensão bacteriana antes da mistura e  $A$  = absorvância da fase aquosa depois da mistura.

#### **4.14 Microscopia eletrônica de varredura**

Amostras de poliestireno de 1 cm<sup>2</sup> foram lavadas como descrito no item 4.12.

Os biofilmes foram formados nas amostras conforme metodologia descrita no item 4.11. Após a formação do biofilme as amostras foram lavadas 3 vezes com 2,0 mL de água destilada esterilizada e adicionou-se 2 mL de surfactina 0,1% sobre cada amostra. O biosurfatante foi removido após 2 horas de contato com o biofilme formado. As amostras de poliestireno foram lavadas 3 vezes com 2 mL de água destilada estéril. Como controle as amostras foram imersas durante 2 h em 2 mL de água destilada esterilizada.

O material aderido ao poliestireno foi submetido a desidratação através de imersão em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes, 10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95% permanecendo por 15 minutos em cada solução, e deixando-se em dessecador por 24 h (ZERAIK; NITSCHKE, 2010). As amostras foram recobertas com uma camada de 10 nm de ouro em um metalizador e examinadas em microscópio eletrônico de varredura, operando com feixe de elétrons de 20 kV.

#### **4.15 Microscopia de campo claro**

Após a 24 h de formação do biofilme de cultura mista conforme descrito no item 4.11, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 200  $\mu$ L água. A amostra foi colocada em ultrassom por 15 minutos para remoção da cultura aderida. Com a suspensão obtida realizou-se a coloração de Gram. Para isso, fez-se um esfregaço do material em uma lâmina e após secagem adicionou-se solução de cristal violeta (2,0 g de cristal violeta em 20 ml de etanol 95% e 0,8 g de oxalato de amônio em 80 ml de água destilada) por 1 minuto. Em seguida a placa foi lavada e adicionou-se Lugol (1,0 g de Iodo metálico, 2,0 g de iodeto de potássio em 300 ml de água destilada) por mais 1 minuto, seguido de lavagem e adição de álcool: acetona (1:1) por 20 segundos. Após esse tempo fez-se a lavagem e adicionou-se solução de safranina (2,5 g em 100 ml de etanol diluído 10 vezes em água destilada) por 30 segundos. Após lavagem com água e secagem procedeu-se a observação das culturas mistas em microscópio ótico.

#### **4.16 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média de no mínimo três repetições independentes. Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de probabilidade e o teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças entre as médias. As análises foram feitas utilizando o software Origin v.8 (Origin Lab Corporation).



#### **4.17 Descarte de material**

Todo o material descartável contendo bactérias patogênicas foi esterilizado a 121 °C por 20 minutos, antes de ser descartado em lixo comum. O material não descartável foi mergulhado em solução de hipoclorito de sódio 100 ml L<sup>-1</sup> ou solução de formaldeído (Lysoform) 100 ml L<sup>-1</sup> por 24 h antes de ser lavado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Propriedades dos biosurfatantes obtidos

A surfactina apresentou tensão superficial de  $26,9 \text{ mN m}^{-1}$ , concentração micelar crítica (CMC) de  $33 \text{ mg L}^{-1}$  e pureza de 78%. Os principais componentes da mistura foram os homólogos de  $C_{13}$ ,  $C_{14}$  e  $C_{15}$ , sendo que a molécula tensoativa predominante foi o homólogo de massa molar 1035 Da que corresponde ao lipopeptídeo de 15 carbonos na cadeia lipídica ligado a um peptídeo de sete aminoácidos.

O ramnolipídeo apresentou tensão superficial  $30,8 \text{ mN m}^{-1}$ , CMC de  $92,4 \text{ mg L}^{-1}$  e pureza de 60%. Os principais componentes da mistura foram  $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$  e  $\text{RhaC}_{10}\text{C}_{10}$  que corresponderam a aproximadamente 75% do produto, sendo o diramnolipídeo  $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$  o componente majoritário.

### 5.2 Atividade antiadesiva dos biosurfatantes

Os resultados dos ensaios de adesão de *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 e do efeito do condicionamento da superfície com biosurfatantes são mostrados nas Figuras 4 a 6.

O tratamento da superfície com surfactina na concentração de 0,1% não foi satisfatório, promovendo aumento na adesão da bactéria a partir das 9 h de cultivo, entretanto, o aumento da concentração para 0,25% e 0,5% mostrou redução na adesão em relação ao controle principalmente a partir de 24 h (Figura 4).

O tratamento com ramnolípídeo reduziu a adesão mostrando um perfil proporcional ao aumento da concentração, principalmente nas horas iniciais de cultivo (Figura 5). Os melhores resultados foram obtidos pelo condicionamento com ramnolípídeo 1% que promoveu uma redução média de 57,8% na adesão durante as 48 h de cultivo enquanto que a surfactina 0,25% reduziu em média 42,0% a adesão da bactéria. A comparação dos dois biosurfatantes é mostrada na Figura 6. Observa-se que o ramnolípídeo exerce maior efeito antiadesivo durante as primeiras 24 horas de cultivo enquanto que a surfactina apresenta maior efeito entre 24-32 h. A ANOVA mostrou diferença significativa para o tratamento com ramnolípídeo em relação ao controle, já para a surfactina as diferenças são significativas a partir de 24 h. Este dado sugere que uma possível combinação dos dois biosurfatantes poderá ser mais eficiente no controle, porém esta possibilidade deverá ser testada em trabalho futuro.

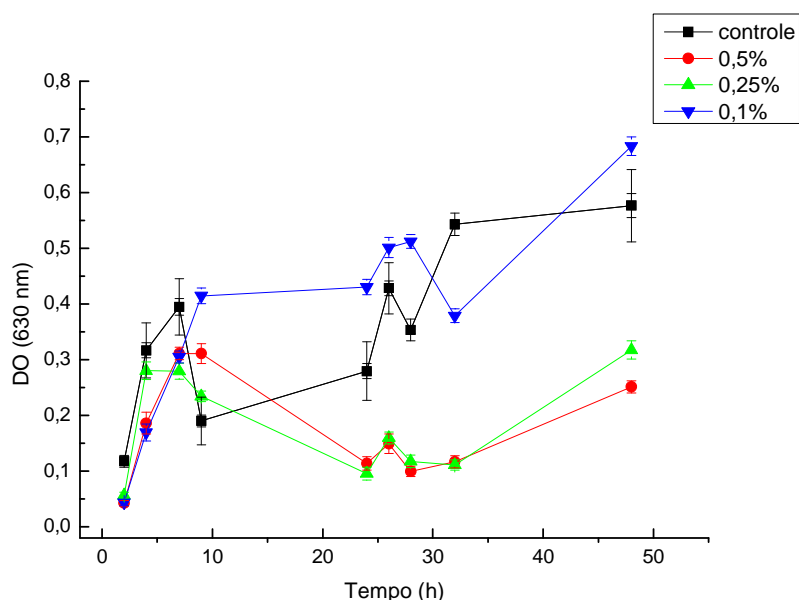


Figura 4. Cinética de adesão de *Listeria monocytogenes* em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de surfactina. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

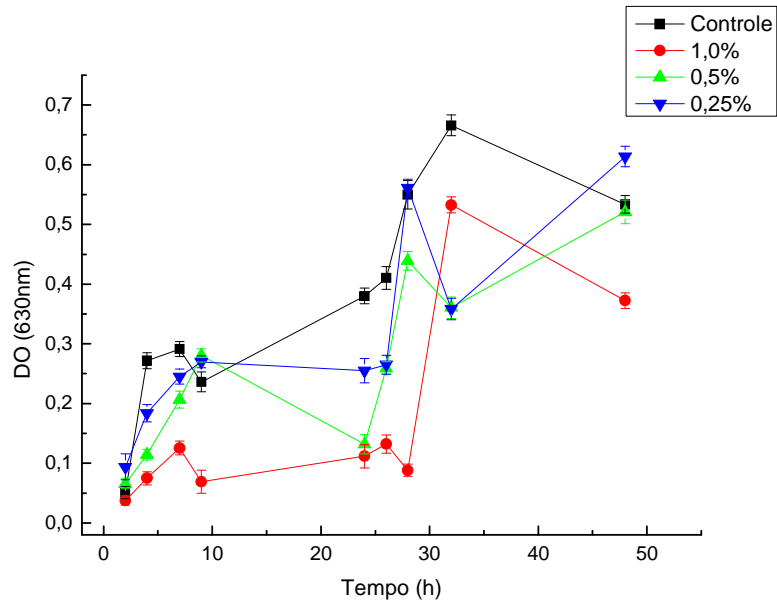


Figura 5. Cinética de adesão de *Listeria monocytogenes* em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de ramnolipídeo. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

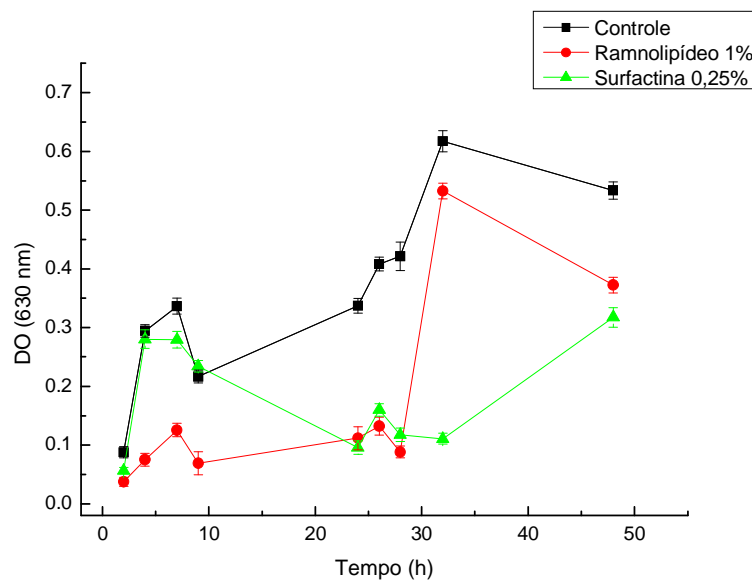


Figura 6. Comparação do efeito da surfactina e ramnolipídeos na cinética de adesão de *Listeria monocytogenes* em superfície de poliestireno. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Os resultados referentes à adesão de *Salmonella* Enteritidis PNCQ0301 são mostrados nas Figuras 7 a 9.

Semelhante ao observado para *L. monocytogenes* a concentração de 0,25% de surfactina foi a mais efetiva na redução da adesão de *Salmonella* Enteritidis em poliestireno (Figura 7). A redução média após 48 h de cultivo foi de 42,3%. Já para o tratamento com ramnolípídeo observa-se que mesmo na maior concentração (1,0%) houve redução em relação ao controle apenas no início do cultivo (até 9 h), apresentando um posterior aumento na adesão (Figura 8). Destaca-se que na maioria dos pontos analisados não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos ou seja este biosurfatante não foi eficiente para reduzir a adesão deste patógeno.

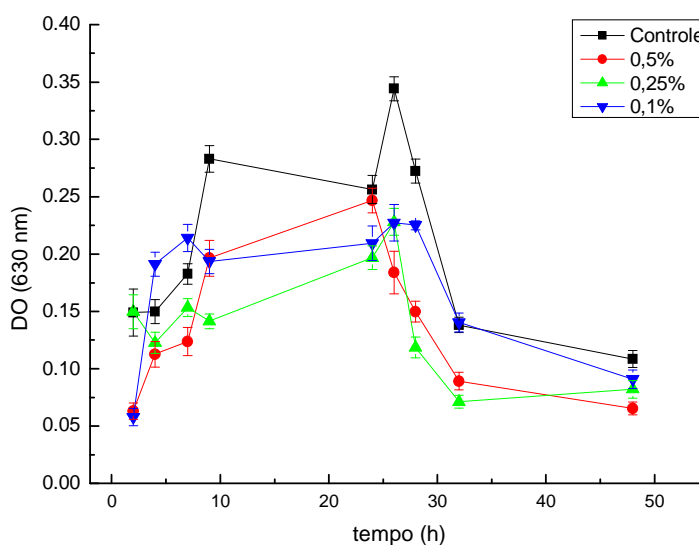


Figura 7. Cinética de adesão de *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de surfactina. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

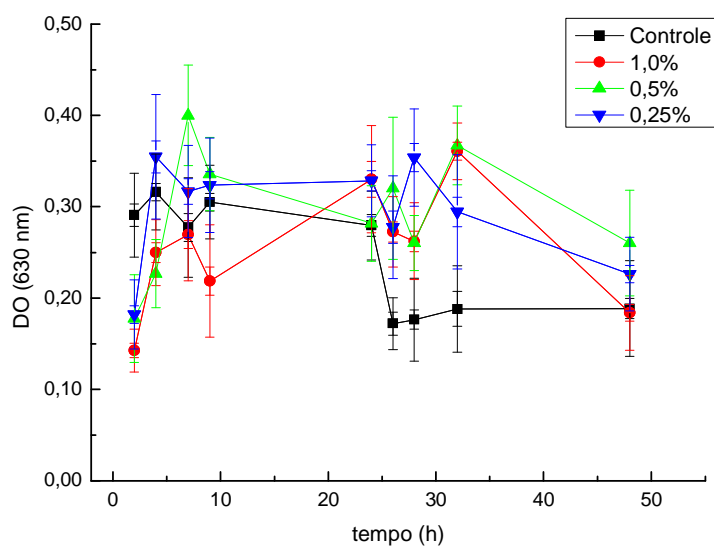


Figura 8. Cinética de adesão de *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de ramnolípídeo. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

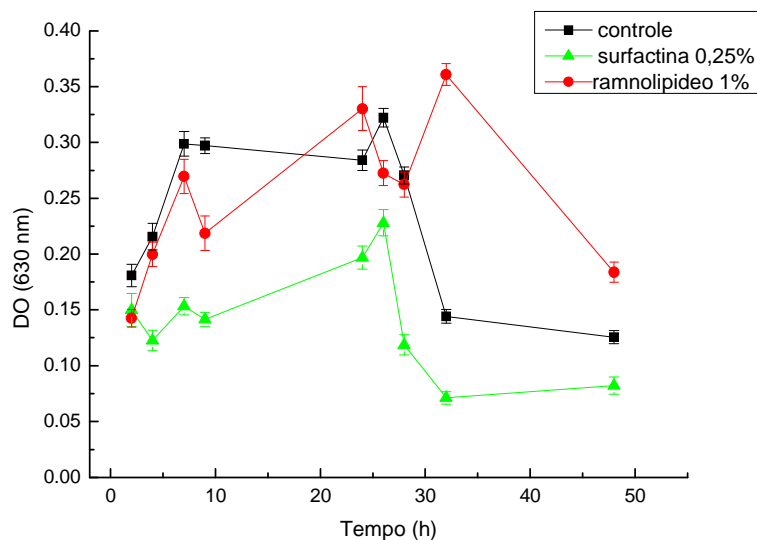


Figura 9. Comparação do efeito da surfactina e ramnolípídeos na cinética de adesão de *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

A comparação dos dois biosurfatantes (Figura 9) demonstra que a surfactina foi mais eficiente no controle da adesão de *Salmonella* Enteritidis do que os ramnolípídeos. O tratamento com surfactina foi estatisticamente significativo em relação ao controle.

Os resultados referentes a adesão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 são mostrados nas Figuras 10 e 11.

A surfactina promoveu aumento da adesão de *S. aureus* em todas as concentrações testadas não sendo adequada como agente antiadesivo deste patógeno (Figura 10). Contrariamente, os ramnolípídeos reduziram a adesão da bactéria em todas as concentrações testadas, sendo a concentração de 1% a mais eficiente gerando uma redução média de 67,8% durante as 48 h de crescimento (Figura 11). A análise de variância mostrou diferença significativa do tratamento a 1% em relação ao controle em todos os tempos avaliados.

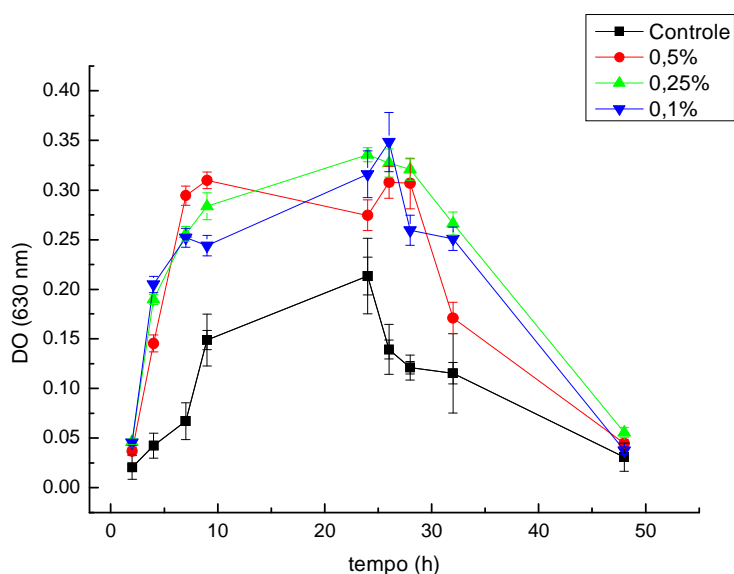


Figura 10. Cinética de adesão de *Staphylococcus aureus* em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de surfactina. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

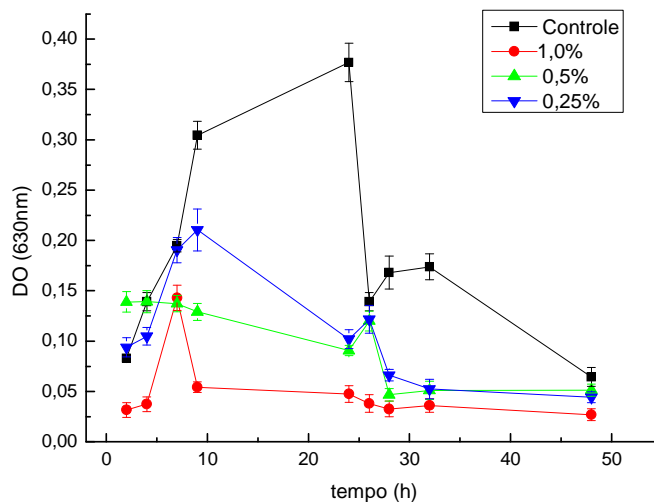


Figura 11. Cinética de adesão de *Staphylococcus aureus* em superfície de poliestireno condicionada com diferentes concentrações de ramnolipídeo. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Entre as bactérias testadas *Listeria monocytogenes* foi a que se mostrou mais susceptível aos biosurfatantes, pois sua adesão ao poliestireno foi reduzida significativamente tanto pela surfactina como pelo ramnolipídeo. As diferenças na resposta antiadesiva dos patógenos em relação a cada tipo de biosurfatante podem estar relacionadas às características superficiais dos microorganismos tais como a hidrofobicidade, carga eletrostática celular, assim como a presença de flagelos e exopolissacarídeos que influenciam os processos de adesão (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Zeraik e Nitschke (2010) relatam que o condicionamento da superfície de poliestireno com surfactina 0,1% também provocou uma redução na adesão de *L. monocytogenes* ATCC 19112 (em suspensão salina). Entretanto, os autores relatam que o condicionamento com surfactina reduziu a adesão de *S. aureus* ATCC 25923, resultado oposto ao encontrado no presente estudo. Rivardo et al. (2009) também



mostram em seus estudos que biosurfatantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* apresentam atividade antiadesiva contra *S. aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* CFT073. Desta forma, a atividade antiadesiva de um biosurfatante parece ser dependente das condições de crescimento do microorganismo, da sua linhagem e do tipo de biosurfatante.

### **5.3 Atividade antiadesiva dos biosurfatantes sobre culturas mistas**

As bactérias que apresentaram melhores resultados com os tratamentos individuais foram avaliadas em culturas mistas, ou seja, avaliou-se o efeito condicionante da surfactina 0,25% na adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, e o efeito condicionante do ramnolipídeo 1,0% na adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Os resultados referentes à adesão de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis são mostrados na Figura 12.

O condicionamento com a surfactina não se mostrou eficiente na redução da adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis. Foi possível observar que após 24 h de incubação ocorreu aumento da adesão da cultura mista sobre a superfície. Assim, a surfactina apesar de apresentar atividade antiadesiva contra os microorganismos individualmente, não apresentou a mesma eficiência na prevenção da adesão destes patógenos em culturas mistas.

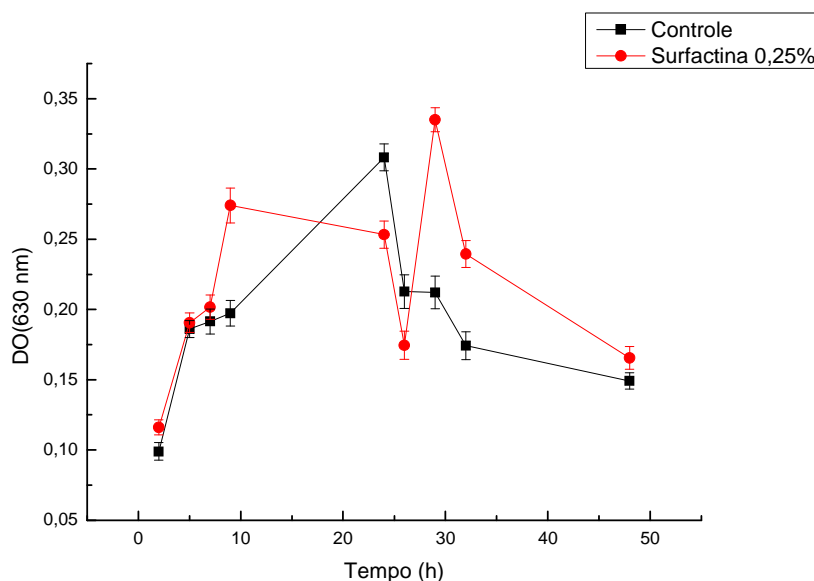


Figura 12. Cinética de adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno condicionada com solução de surfactina 0,25%. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Após 24 h de incubação a cultura mista foi observada em microscópio óptico e pode-se evidenciar (Figura 13), que as duas bactérias estavam aderidas ao poliestireno.

A capacidade de adesão da *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp em culturas mistas também foi evidenciado por outros pesquisadores. Mettler e Carpentier (1998) observaram que *L. monocytogenes* era capaz de se multiplicar e formar microcolônias na presença de *P. aeruginosa*. Habimana et al. (2010) relataram que a formação de biofilme de *Salmonella* no ambiente de processamento de alimentos era favorecida na presença de *Staphylococcus* ssp e *Pseudomonas* sp .

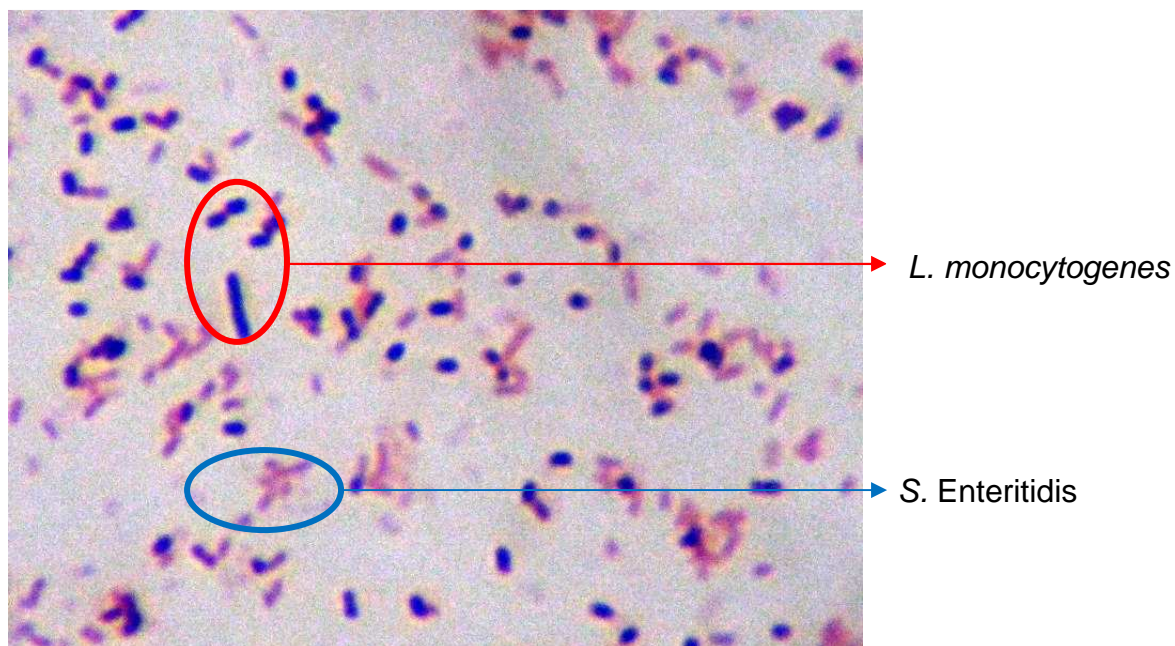


Figura 13. Coloração de Gram da cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis aderida ao poliestireno após 24 h de incubação. Imagem obtida em microscópio óptico de campo claro em aumento de 1000x.

Os resultados referentes à adesão de *L. monocytogenes* e *S. aureus* são mostrados na Figura 14.

O condicionamento com ramnolipídeo 1,0 % causou redução na adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus* entre 9 -24 h de incubação, sendo a redução média de 44,5%. Comparando-se com os resultados obtidos com as culturas individuais onde a adesão de *L. monocytogenes* foi reduzida em 57,8% e a de *S. aureus* em 67,8 % durante as 48 h de cultivo, o efeito do condicionamento da superfície de poliestireno com ramnolipídeo 1,0% mostrou-se menos efetivo na redução da adesão da cultura mista das duas bactérias.

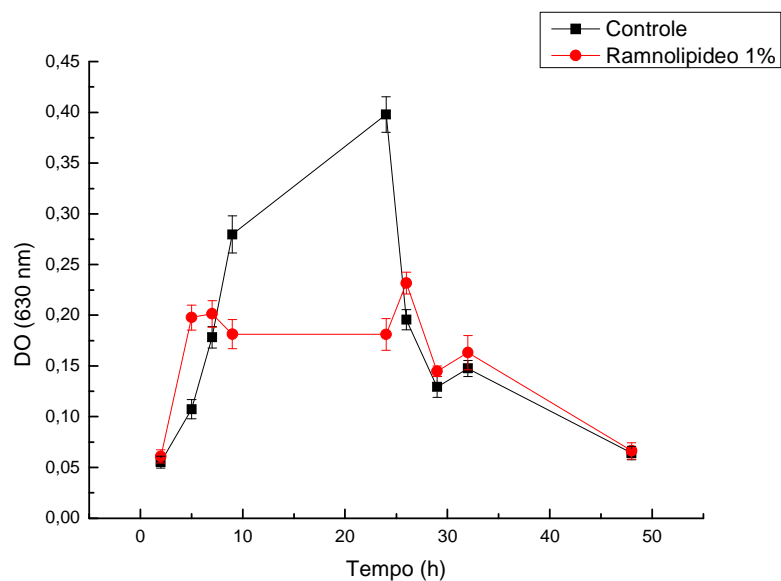


Figura 14. Cinética de adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em superfície de poliestireno condicionada com solução de ramnolípídeo 1,0 %. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Através de observação em microscópio ótico, foi possível evidenciar a presença de *L. monocytogenes* e *S. aureus* aderidos a superfície após 24 horas de incubação (Figura 15).

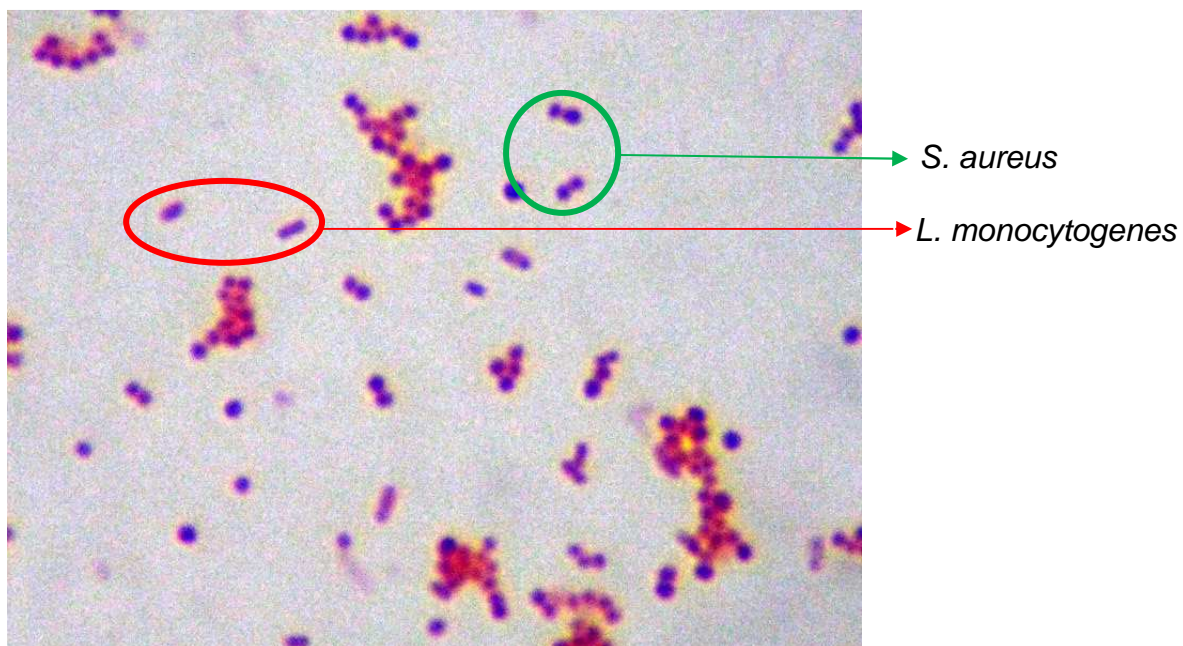


Figura 15. Coloração de Gram da cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus* aderida ao poliestireno após 24 h de incubação. Imagem obtida em microscópio ótico de campo claro em aumento de 1000x.

#### **5.4 Discussão sobre o efeito da concentração dos biosurfatantes na inibição da adesão bacteriana**

Os compostos biosurfatantes são capazes de formar agregados moleculares a partir de uma determinada concentração chamada concentração micelar crítica (CMC). A associação em micelas se dá através de interações entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula. Abaixo da CMC os biosurfatantes são encontrados na forma de monômeros (MANIASSO, 2001).

Desta maneira, a ação do biosurfatante não deveria se alterar em concentrações acima da CMC, entretanto, foi observado que as concentrações utilizadas, as quais estão acima da CMC, apresentaram diferenças na alteração na inibição da adesão da bactéria. Estes resultados são concordantes com estudos

realizados por Das, Mukherjee e Sen (2009) que relatam que o aumento gradual da concentração de 0,1 para 10 mg mL<sup>-1</sup> de um biosurfatante isolado de microorganismo marinho aumentou a atividade antiadesiva frente a vários microorganismos patogênicos. Rodrigues et al. (2006) também relatam que quanto maior a concentração de ramnolípídeo utilizada maior foi a redução da adesão de patógenos na superfície de silicone. A necessidade de altas concentrações de ramnolípídeo pode ser decorrente da perda de moléculas adsorvidas na superfície após lavagem da mesma, uma vez que a adsorção deste biosurfatante a superfície se dá através de interações fracas, como forças de van der Waals. Rufino et al. (2011) também demonstraram que a propriedade antiadesiva do biosurfatante produzido por *Candida lipolytica* UCP0988, cuja CMC era 3 mg L<sup>-1</sup>, foi proporcional ao aumento da concentração do biosurfatante entre 0,75mg L<sup>-1</sup> a 12 mg L<sup>-1</sup>.

O aumento da concentração do biosurfatante pode alterar a organização espacial das moléculas em uma superfície sólida, influenciando na sua capacidade antiadesiva. Mais estudos são necessários para maior compreensão da adsorção dos biosurfatantes nas superfícies e seus efeitos sobre a adesão microbiana (Shen et al., 2011).

## **5.5 Caracterização da superfície de poliestireno**

Quando uma superfície apresenta ângulo de contato com a água acima de 65° esta superfície é considerada hidrofóbica (VOGLER, 1998). Vários estudos relatam que o poliestireno é de fato considerado hidrofóbico (DONLAN; COSTERTON, 2002; STEPANOVIC et al., 2004; ZERAIK; NITSCHKE, 2010). Os

resultados encontrados no teste de ângulo de contato confirmam a hidrofobicidade do poliestireno (Tabela 3).

Tabela 3. Medidas de ângulo de contato da água em superfícies de poliestireno condicionadas com diferentes concentrações de biosurfatantes.

Tratamento	Ângulo de contato (°)**
Controle*	84,77 ±1,51
Surfactina 0,1%	66,16 ±2,11
Surfactina 0,25%	62,47 ±1,23
Surfactina 0,5%	64,52 ±0,18
Ramnolipídeo 0,25%	72,47 ±2,95
Ramnolipídeo 0,5%	64,20 ±2,18
Ramnolipídeo 1,0%	11,45 ± 2,20

\*Superfície condicionada com água destilada

\*\*Média de no mínimo 6 gotas ± desvio padrão

Os ramnolipídeos são glicolipídeos de natureza aniônica devido a presença de grupos carboxila e ramnosil que aliada a presença de cadeias de carbono lhe conferem caráter anfifílico (MAYER; SOBERÓN-CHAVES, 2000). Em contato com uma superfície hidrofóbica os ramnolipídeos podem se organizar em micelas, lamelas ou vesículas dependendo da concentração e do pH do meio (RAZA et al, 2010). Após o condicionamento da superfície com ramnolipídeo esta tornou-se mais hidrofílica (ocorreu redução do ângulo de contato com a água) proporcionalmente ao aumento da concentração (Tabela 3). A concentração de 1,0% tornou a superfície extremamente hidrofílica, o que pode estar relacionado com a redução significativa da adesão observada para *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Figuras 5 e 11).

As alterações na hidrofobicidade causadas pelo condicionamento com surfatante ocorre principalmente pela orientação destas moléculas anfifílicas na

superfície (AHIMOU, et al., 2000). A porção hidrofóbica da molécula de um biosurfatante pode interagir com superfícies hidrofóbicas enquanto que a porção polar ficaria exposta ao meio aquoso promovendo redução na hidrofobicidade da superfície. A orientação das moléculas adsorvidas em uma superfície sólida também depende de fatores como a concentração do biosurfatante, o pH, a força iônica do meio e da natureza da molécula tensoativa (MANNE et al., 1994).

O condicionamento da superfície com a surfactina alterou a hidrofobicidade do poliestireno em todas as concentrações utilizadas em relação ao controle (Tabela 3). A surfactina é considerada um tensoativo aniônico devido aos resíduos de ácido aspártico e glutâmico que em pH neutro apresentam carga negativa (SHEN et al., 2011). Em baixas concentrações e em contato com interfaces hidrofóbicas, a surfactina se organiza na superfície na forma de dímeros (GANG; LIU; MU, 2010). Além dessa organização, estudos realizados por Shen e seus colaboradores (2008) mostraram que em condições de baixa pressão, a cadeia alifática da surfactina é capaz de se dobrar e interagir com resíduos hidrofóbicos da porção peptídica formando uma monocamada de agregados. Em concentrações moderadas a mobilidade translacional e rotacional é reduzida e as moléculas da surfactina se orientam de forma que o grupo polar (carregado negativamente) fique em contato com o meio aquoso enquanto a porção apolar interage diretamente com a superfície hidrofóbica e conseqüentemente, o condicionamento com surfactina pode reduzir a hidrofobicidade da superfície de poliestireno (GANG; LIU; MU, 2010). Shen et al. (2008) relatam que a surfactina não é uma molécula cujo comportamento pode ser facilmente descrito em termos de capacidade de agregação e isso também é refletido em muitas de suas propriedades.



Zeraik e Nitschke (2010) observaram uma pequena redução do ângulo de contato de 82° para 76° quando a superfície de poliestireno foi condicionada com surfactina 0,1%, enquanto que no presente estudo, a redução observada foi de cerca de 20°. Já o condicionamento com ramnolípídeo 0,4 % provocou um pequeno aumento no ângulo de contato de 82° para 84° sugerindo um aumento na hidrofobicidade da superfície. Neste trabalho o condicionamento com ramnolípídeo com concentração 0,5% reduziu o ângulo de contato de 84,7° para 64,2°. Estas diferenças podem estar relacionadas com variações na composição química dos ramnolípídeos e da surfactina utilizados.

Rodrigues et al.(2011) demonstraram que após tratamento da superfície de silicone com ramnolípídeo ocorreu redução do ângulo de contato tornando a superfície menos hidrofóbica e provocando redução na adesão de bactérias e leveduras causadoras de infecções em próteses de silicone.

## **5.6 Caracterização físico-química das células bacterianas**

O teste de adesão microbiana a solventes (MATS) é um método de partição baseado na comparação da afinidade das células microbianas por diferentes solventes orgânicos. No teste de MATS a afinidade microbiana é considerada resultado entre interações eletrostáticas, interações de van der Waals e interações de ácido-base de Lewis. São utilizados dois solventes polares (um aceptor e outro doador de elétrons) e dois solventes não polares. A comparação é feita entre um solvente polar e um solvente apolar. Se a afinidade pelo solvente doador de elétron for maior do que a afinidade pelo solvente não polar, a superfície então apresenta características ácidas. Por outro lado, se a afinidade pelo solvente aceptor de elétron

for maior que a afinidade pelo solvente apolar, a superfície então apresenta características básicas. Entretanto, quanto maior for a afinidade pelos solventes apolares, maior será a hidrofobicidade da superfície do microorganismo (PROKOPOVICH; PERNI, 2009)

Neste trabalho a comparação foi feita entre o clorofórmio (caráter ácido) e o hexadecano (apolar); e entre o acetato de etila (caracter básico) e o decano (apolar).

A afinidade das bactérias por diferentes solvente são mostradas na Tabela 4.

A *Listeria monocytogenes* apresentou maior afinidade pelo clorofórmio do que pelo hexadecano, ou seja, apresenta predomínio de caráter básico (doador de elétrons) na superfície celular, sugerindo predomínio de cargas negativas na superfície. A baixa afinidade pelo solvente básico (acetato de etila) demonstrou que suas propriedades ácidas são fracas, assim como sua interação com o solvente apolar associado (decano).

A *S. Enteritidis* apresentou baixa afinidade frente aos solventes, destacando-se o acetato de etila que possui caráter básico e, portanto, a bactéria apresenta predomínio de carga positiva na superfície, nota-se também que não houve migração para o clorofórmio. A afinidade pelos solventes apolares foi pequena revelando que a bactéria possui baixo caráter hidrofóbico.

O *S. aureus* apresentou alta afinidade pelo clorofórmio, evidenciando suas características fortemente básicas, ou seja a bactéria apresenta predomínio de cargas negativas na superfície. O *S. aureus* também apresentou alta afinidade, acima de 90%, pelo hexadecano, um solvente muito apolar, o que sugere também a presença de forte caráter hidrofóbico.

Tabela 4. Teste de adesão microbiana a solventes mostrando a porcentagem de afinidade das células bacterianas a diferentes solventes.

Microorganismo	% afinidade a*			
	Decano	Hexadecano	Acetato de etila	Clorofórmio
<i>L. monocytogenes</i>	33,3 ± 4,9	24,0 ± 8,0	24,1 ± 4,2	54,3 ± 0,6
<i>S. Enteritidis</i>	12,4 ± 1,3	2,4 ± 1,6	27,1 ± 4,2	0
<i>S. aureus</i>	33,2 ± 8,3	93,7 ± 5,1	9,2 ± 1,1	97,8 ± 1,7
<i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Enteritidis</i>	7,0 ± 1,8	14,1 ± 1,3	29,1 ± 0,3	10,7 ± 2,8
<i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>	12,2 ± 1,7	20,6 ± 2,1	18,9 ± 3,5	20,6 ± 4,3

\*média de três repetições independentes ± desvio padrão

A cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis apresentou fraco caráter hidrofílico e hidrofóbico (afinidade menor que 30 % para todos os solventes). As características físico-químicas da cultura mista foram distintas das encontradas para os microorganismos isoladamente, com exceção das características ácidas evidenciadas pela afinidade ao acetato de etila. As diferenças nas afinidades pelos solventes da cultura mista em relação às culturas individuais pode se dever a formação de agregados celulares, uma vez que as bactérias apresentam cargas opostas em suas superfícies celulares.

A cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus* também apresentou baixa afinidade pelos solventes polares e apolares (afinidade abaixo de 30%). Suas características físico-químicas foram mais semelhantes às características da *L. monocytogenes*.

## **5.6.1 Discussão sobre o efeito do condicionamento da superfície de poliestireno com biosurfatantes sobre a adesão bacteriana**

### **5.6.1.1 *Listeria monocytogenes***

A superfície de poliestireno tornou-se menos hidrofóbica após o condicionamento com todas as concentrações de surfactina (Tabela 3), este fato se deve principalmente a presença de cargas negativas devido ao caráter aniônico deste biosurfatante. Como a superfície da bactéria apresentou predomínio de carga negativa, o efeito antiadesivo observado se deve provavelmente a repulsão eletrostática e redução das interações hidrofóbicas. O aumento da concentração de 0,1% para 0,25% reduziu a hidrofobicidade da superfície acarretando maior efeito antiadesivo como observado na Figura 4. O aumento da concentração de 0,25% para 0,5% aumentou a hidrofobicidade e não resultou em uma maior redução da adesão bacteriana. Desta maneira, como as moléculas de surfactina podem se organizar na superfície em diferentes conformações e formas de agregação é possível que acima da concentração de 0,25 % os grupos aniônicos da surfactina fiquem organizados de tal maneira que as cargas negativas fiquem mais expostas e livres para interagir com as cargas negativas da superfície da *L. monocytogenes* causando repulsão eletrostática e assim acarretando na redução da adesão do microorganismo. Rivardo et al. (2009) observaram que a atividade antiadesiva de lipopeptídeos produzidos por duas linhagens de *Bacillus* ssp também foi reduzida com o aumento da concentração dos biosurfatantes.

O condicionamento da superfície com ramnolípídeo reduziu a hidrofobicidade proporcionalmente a concentração utilizada (Tabela 3). A redução da adesão da *L.*

*monocytogenes* foi mais efetiva após o condicionamento da superfície com ramnolipídeo 1,0%, o que demonstra que a hidrofobicidade da superfície é um importante fator que influencia na capacidade de adesão desta bactéria. A redução da adesão também pode estar relacionada à repulsão entre as cargas negativas presentes na superfície celular e os grupamentos aniônicos dos ramnolipídeos.

#### **5.6.1.2 *Salmonella* Enteritidis**

O condicionamento da superfície com soluções de surfactina foi capaz de reduzir a adesão da *S. Enteritidis* em todas as concentrações utilizadas (Figura 7). A redução da hidrofobicidade foi maior após condicionamento com surfactina 0,25%, o qual acarretou a maior redução da adesão desta bactéria na superfície. A *S. Enteritidis* apresentou caráter ácido fraco (carga positiva) e baixa hidrofobicidade, e, portanto seria esperado uma atração entre as cargas negativas do grupamento aniônico da surfactina, o que poderia favorecer a adesão. Entretanto, o resultado encontrado foi oposto, com a redução da adesão, e isto pode estar relacionado a outros fatores que colaboram para a adesão da bactéria na superfície como produção de MPE, que em sua maioria são compostos aniônicos e poderiam modificar a carga da superfície favorecendo a repulsão eletrostática (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SIMÕES;SIMÕES;VIEIRA,2010). O resultado do presente estudo é concordante com resultados descritos por Oliveira et al. (2007), que demonstraram que as características físico-químicas de quatro cepas de *S. Enteritidis* não foram suficientes de explicar o comportamento adesivo destas bactérias ao aço inoxidável.

O condicionamento com ramnolípídeo não causou redução na adesão da bactéria a superfície (Figura 8) e este fato pode estar relacionado à atração eletrostática entre o grupamento aniônico dos ramnolípídeos e a superfície celular com carga positiva.

### **5.6.1.3 *Staphylococcus aureus***

A adesão do *S. aureus* sobre o poliestireno foi favorecida pelo condicionamento da superfície com surfactina (Figura 10). O *S. aureus* além de apresentar forte caráter hidrofóbico, apresentou alta afinidade pelo clorofórmio, o que revela a presença de cargas negativas em sua superfície. O condicionamento com surfactina tornou a superfície carregada negativamente, o que deveria acarretar em interações repulsivas diminuindo a adesão, resultado oposto ao encontrado. Desta maneira, outros fatores provavelmente estão envolvidos no comportamento observado: alterações da carga superficial durante o cultivo devido a alterações na composição química da parede celular em resposta a condições ambientais; excreção de metabólitos ácidos capazes de neutralizar as cargas negativas dos resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico da surfactina diminuindo a repulsão e expondo os grupamentos hidrofóbicos aumentando assim, as interações hidrofóbicas e favorecendo a adesão (SHAKERIFARD et al., 2009). Rivardo et al. (2009) também observaram em seus estudos que o condicionamento da superfície de poliestireno com biosurfatante obtido de *B. subtilis* causou aumento da adesão de *S. aureus* ATCC 29213 em todas as concentrações utilizadas. Os autores sugeriram que os lipopeptídeos cíclicos poderiam aumentar a adesão de *S. aureus* uma vez

que estes são análogos a autoindutores de *quorum sensing* capazes de estimular a adesão de *Staphylococci* em superfícies (FOWLER; STACY; BLACKWELL; 2008).

O aumento da concentração de ramnolipídeo reduziu proporcionalmente a adesão da bactéria ao poliestireno, sendo o resultado mais expressivo o obtido para a concentração de 1,0% quando se observou uma redução de 67,8% na adesão (Figura 11). O condicionamento com ramnolipídeo tornou a superfície mais hidrofílica, conseqüentemente ocorreu redução das interações hidrofóbicas entre a bactéria e a superfície, além da repulsão entre os grupamentos aniônicos do ramnolipídeo e a superfície da bactéria carregada negativamente. A capacidade antiadesiva do ramnolipídeo também foi evidenciada por Rodrigues et al. (2006) que relataram uma redução de 67% na adesão de *S. aureus* na superfície de silicone após o condicionamento com ramnolipídeos.

#### **5.6.1.4 Cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis**

A cinética de adesão da cultura mista (Figura 12) apresentou perfil semelhante a cinética de adesão do *S. aureus* (Figura 10), o que sugere um predomínio desta bactéria principalmente após 24 h.

A surfactina 0,25% causou redução na hidrofobicidade da superfície, entretanto, este condicionamento provocou aumento na adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis na maioria dos tempos avaliados (Figura 12). A cultura mista apresentou caráter ácido fraco e portanto, pode ter ocorrido atração eletrostática entre os grupamentos aniônicos da surfactina e a superfície dos microorganismos, favorecendo a adesão.

#### **5.6.1.5 Cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus***

A cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus* apresentou baixa adesão inicial. Este fator pode estar relacionado com a fraca característica apolar das culturas, resultando na redução das interações hidrofóbicas com a superfície. O aumento da adesão com o tempo cultivo pode estar relacionado com a produção de MPE pelas duas bactérias envolvidas no processo de adesão, ou alterações nas características físico-químicas das células (Figura 14).

A adesão da cultura mista de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em poliestireno tratado com ramnolípídeo a 1% foi reduzida apenas no intervalo de tempo entre 9 e 24 h de cultivo (Figura 14). A afinidade aos solventes revelou fraco caráter polar e apolar. Considerando que a superfície de poliestireno encontra-se carregada negativamente e hidrofílica (Tabela 3) o fraco caráter polar e apolar pode ter influenciado na adesão. A taxa de adesão de cada gênero presente na cultura mista pode ser diferente e conseqüentemente os efeitos observados podem se dever a adesão individual de cada bactéria. Além disso, a presença de um gênero pode influenciar na adesão de outros conforme relatado por Rieu et al. (2008) que demonstraram que em culturas mistas *Staphylococcus aureus* produzia um peptídeo que promovia aumento da adesão de *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável.

### **5.7 Ação dos biosurfatantes na remoção de biofilmes**

O biofilme formado por *S. aureus* mostrou-se suscetível a ação tanto do ramnolípídeo quanto da surfactina em todas as concentrações utilizadas, sendo que



a ação da surfactina 0,1% removeu 63,7% do biofilme, enquanto que o ramnolipídeo 0,25% promoveu remoção de 58,5 % do biofilme após 2 h de contato (Figura 16). Foi possível observar que em duas horas a remoção já havia sido significativa, e que o aumento do tempo de contato com o biosurfatante não representou um aumento da capacidade de remoção do biofilme. O aumento da concentração dos biosurfatantes também não promoveu aumento significativo na remoção de biofilme de *S. aureus* (Tabela 5 e 6).

A ação dos biosurfatantes sobre o biofilme de *Listeria monocytogenes* apresentou resultados bem distintos (Figura 17), sendo a ação da surfactina muito mais efetiva, removendo 95,9 % do biofilme após duas horas de contato. O ramnolipídeo 0,25% removeu apenas 25,6% do biofilme após 2 horas de tratamento, enquanto que a concentração de 1,0% apenas diferiu do controle com 12 horas de tratamento, ocorrendo um aumento de 144% na formação de biofilme (Tabelas 5 e 6).

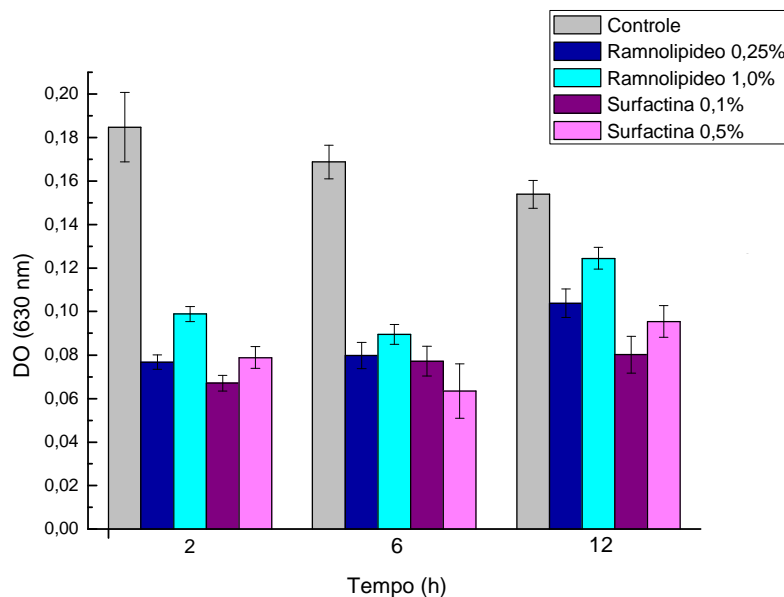


Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes de *S. aureus* em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

O tratamento com biosurfatantes sobre o biofilme de *Salmonella* Enteritidis mostrou resultados pouco efetivos (Figura 18). As concentrações tanto de surfactina quanto de ramnolipídeo apenas diferiram entre si para o tempo de 2 h de tratamento, sendo que o uso dos biosurfatantes menos concentrados (surfactina 0,1% e ramnolipídeo 0,25%) foram mais efetivos na remoção. A surfactina 0,1% reduziu 35,3 % do biofilme, enquanto que o ramnolipídeo removeu 23,1% (Tabela 5 e 6). A ação da surfactina foi mais eficaz no tempo de 2 h e 6 h de tratamento, enquanto que a ação do ramnolipídeo foi mais expressiva no tempo de 6 h, com redução de 30,9 % do biofilme de *Salmonella* Enteritidis.

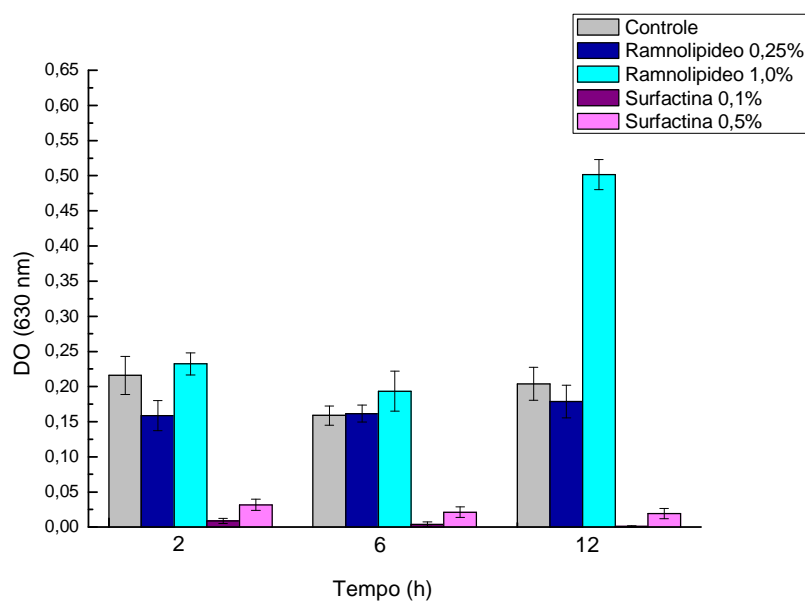


Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes*, em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Tabela 5. Porcentagem de remoção dos biofilmes bacterianos formados sobre a superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato com soluções de surfactina.

Microorganismo	Tratamento	% remoção		
		2h	6h	12h
<i>S. aureus</i>	Surfactina 0,1%	63,7 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	54,3 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	47,9 <sup>A</sup> <sub>a</sub>
	Surfactina 0,5%	57,3 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	62,4 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	37,9 <sup>A</sup> <sub>b</sub>
<i>L. monocytogenes</i>	Surfactina 0,1%	95,9 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	97,4 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	99,1 <sup>A</sup> <sub>a</sub>
	Surfactina 0,5%	85,2 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	86,6 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	90,9 <sup>B</sup> <sub>a</sub>
<i>S. Enteritidis</i>	Surfactina 0,1%	35,3 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	27,6 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	20,7 <sup>A</sup> <sub>b</sub>
	Surfactina 0,5%	12,8 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	27,0 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	10,9 <sup>A</sup> <sub>C</sub>

Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem significativamente  $p < 0,05$ . Para cada linha, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem significativamente  $p < 0,05$ .

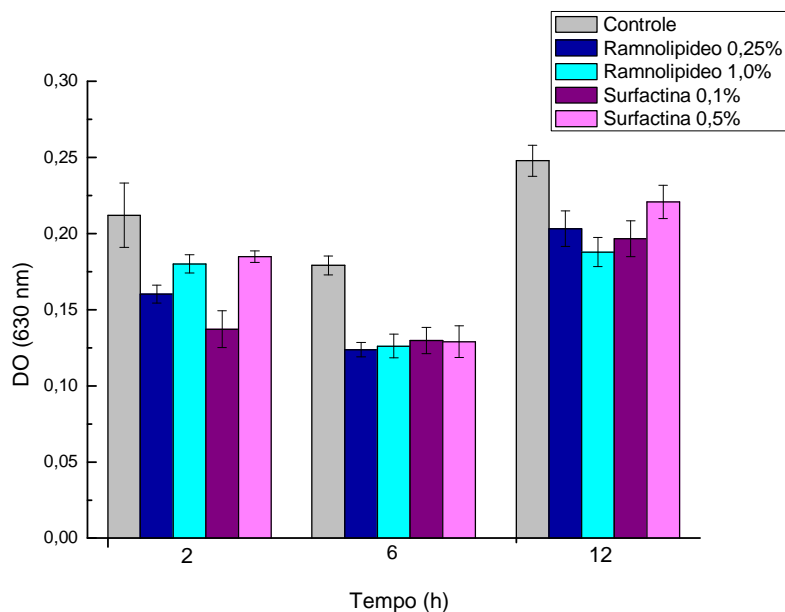


Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Tabela 6. Porcentagem de remoção dos biofilmes bacterianos formados sobre a superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato com soluções de ramnolipídeo.

Microorganismo	Tratamento	% remoção		
		2h	6h	12h
<i>S. aureus</i>	Ramnolipídeo 0,25%	58,5 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	52,8 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	32,5 <sup>A</sup> <sub>b</sub>
	Ramnolipídeo 1,0 %	46,5 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	46,9 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	19,1 <sup>B</sup> <sub>b</sub>
<i>L. monocytogenes</i>	Ramnolipídeo 0,25%	26,5 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	-1,7 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	12,7 <sup>A</sup> <sub>a</sub>
	Ramnolipídeo 1,0 %	-7,6 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	-21,7 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	-144,8 <sup>B</sup> <sub>b</sub>
<i>S. Enteritidis</i>	Ramnolipídeo 0,25%	23,1 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	30,9 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	16,3 <sup>A</sup> <sub>c</sub>
	Ramnolipídeo 1,0 %	13,5 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	28,9 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	20,9 <sup>A</sup> <sub>a</sub>

Para cada coluna os valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem significativamente  $p < 0,05$ . Para cada linha, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem significativamente  $p < 0,05$ .

## 5.8 Ação dos biosurfatantes na remoção de biofilme de cultura mista

A Figura 19 mostra a ação dos biosurfatantes sobre o biofilme de cultura mista dos microorganismos. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de surfactina por 2 h, como mostrado na Tabela 7, com redução do biofilme acima de 50 %. O ramnolipídeo também demonstrou maior capacidade de remoção durante as primeiras horas de tratamento. As concentrações de biosurfatantes utilizadas apenas diferiram entre si no tempo de 6 h de tratamento com ramnolipídeo.

Os resultados encontrados para os tratamentos sobre as culturas individuais mostram que a capacidade de remoção do ramnolipídeo é próxima da capacidade de remoção da surfactina com exceção do tratamento sobre *Listeria monocytogenes*. Desta maneira, o fato da ação da surfactina ser mais eficaz sobre a remoção do biofilme misto do que o ramnolipídeo pode estar relacionado com a remoção principalmente do biofilme de *Listeria monocytogenes*.

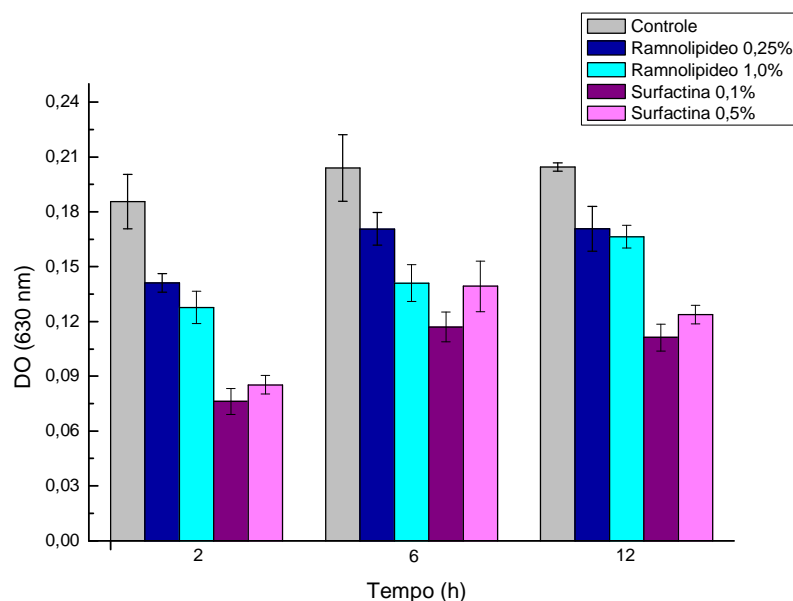


Figura 19. Efeito de diferentes concentrações de biosurfatantes na remoção de biofilmes mistos de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato. O biofilme foi formado em meio TSYE a 35 °C por 48 h. dados representam a média de no mínimo três repetições independentes  $\pm$  erro padrão.

Tabela 7. Porcentagem de remoção dos biofilmes de cultura mista de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Enteritidis formados sobre a superfície de poliestireno após diferentes tempos de contato com soluções de surfactina e ramnolipídeo.

Microorganismo	Tratamento	% remoção		
		2h	6h	12h
Cultura mista	Surfactina 0,1%	58,9 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	42,6 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	45,6 <sup>A</sup> <sub>b</sub>
	Surfactina 0,5%	54,0 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	31,7 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	39,5 <sup>A</sup> <sub>b</sub>
Cultura mista	Ramnolipídeo 0,25%	24,0 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	16,4 <sup>A</sup> <sub>b</sub>	16,5 <sup>A</sup> <sub>b</sub>
	Ramnolipídeo 1,0 %	31,2 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	30,9 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	18,6 <sup>A</sup> <sub>b</sub>

Em cada coluna os valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem significativamente  $p < 0,05$ . Para cada linha, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem significativamente  $p < 0,05$ .

## 5.9 Discussão sobre ação dos biosurfatantes na remoção de biofilmes pré-formados

Os resultados encontrados demonstraram que a ação dos biosurfatantes é mais significativa em curto período de tratamento (2 h).

O ramnolipídeo provocou aumento significativo da adesão (formação de biofilme) de *L. monocytogenes* após contato por 12 h. Costa (2010) relata em seus estudos que *P. aeruginosa* é capaz de crescer em meio de cultura tendo com única fonte de carbono o ramnolipídeo. Da mesma maneira, após tempos de contato maiores, a *Listeria monocytogenes* poderia produzir enzimas capazes de degradar o ramnolipídeo, utilizando-o como fonte de carbono, promovendo o crescimento celular, e reduzindo a quantidade de biosurfatante adsorvido, levando a um aumento da formação do biofilme. A presença de impurezas na solução de ramnolipídeo também pode ter contribuído para o aumento da formação de biofilme.

Em geral, o aumento da concentração não foi mais eficiente para remover os biofilmes, contrariamente aos resultados descritos por Dusane et al. (2010), que relatam que a concentração de 100 mM de ramnolipídeo foi capaz de romper 93 % do biofilme de *Bacillus pumilus* enquanto que em concentrações abaixo de 0,4 mM a remoção não foi evidenciada. A ação de ramnolipídeo em romper biofilmes é também relatada nos estudos de Irie, O`Toole e Yuk (2005), nos quais o ramnolipídeo foi capaz de remover significativamente biofilme de *Bordetella bronchiseptica*, patógeno do trato respiratório. Em relação a surfactina não há relatos na literatura sobre sua utilização na remoção de biofilmes.

A remoção de biofilme está relacionada à capacidade dos surfatantes em penetrar na interface entre a superfície sólida e o biofilme, e uma vez adsorvido nesta interface, promove a redução da tensão interfacial. Assim, a interação entre as células e a superfície seria reduzida e o biofilme removido mais facilmente (MCLANDBOROUGH et al., 2006).

### **5.10 Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV)**

A MEV ilustra a formação de biofilme de *L. monocytogenes* sobre poliestireno (Figura 20a e 20c), e a ação do tratamento com surfactina 0,1% por 2 h sobre o biofilme formado (Figura 20b e 20d). Após 48 h *L. monocytogenes* já havia formado um biofilme sobre a superfície, com grande produção de polímero extracelular. Com a adição de surfactina sobre o biofilme, foi possível observar a redução do MPE e das bactérias aderidas na superfície, demonstrando a eficiente ação do biosurfatante.

É possível observar nas micrografias a presença de poros e cavidades formadas no biofilme de *L. monocytogenes*. De acordo com Nikolaev (2007) já foi observado em culturas de *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *V. cholerae* e *P. tunicata* que a indução da morte de algumas células fornece alimento para as células remanescentes e contribui para a formação de poros e cavidades. Os canais presentes nas estruturas do biofilme permitem que haja fluxo de líquidos, nutrientes e a eliminação de resíduos gerados pelo metabolismo celular (MCLANDBOROUGH et al., 2006).



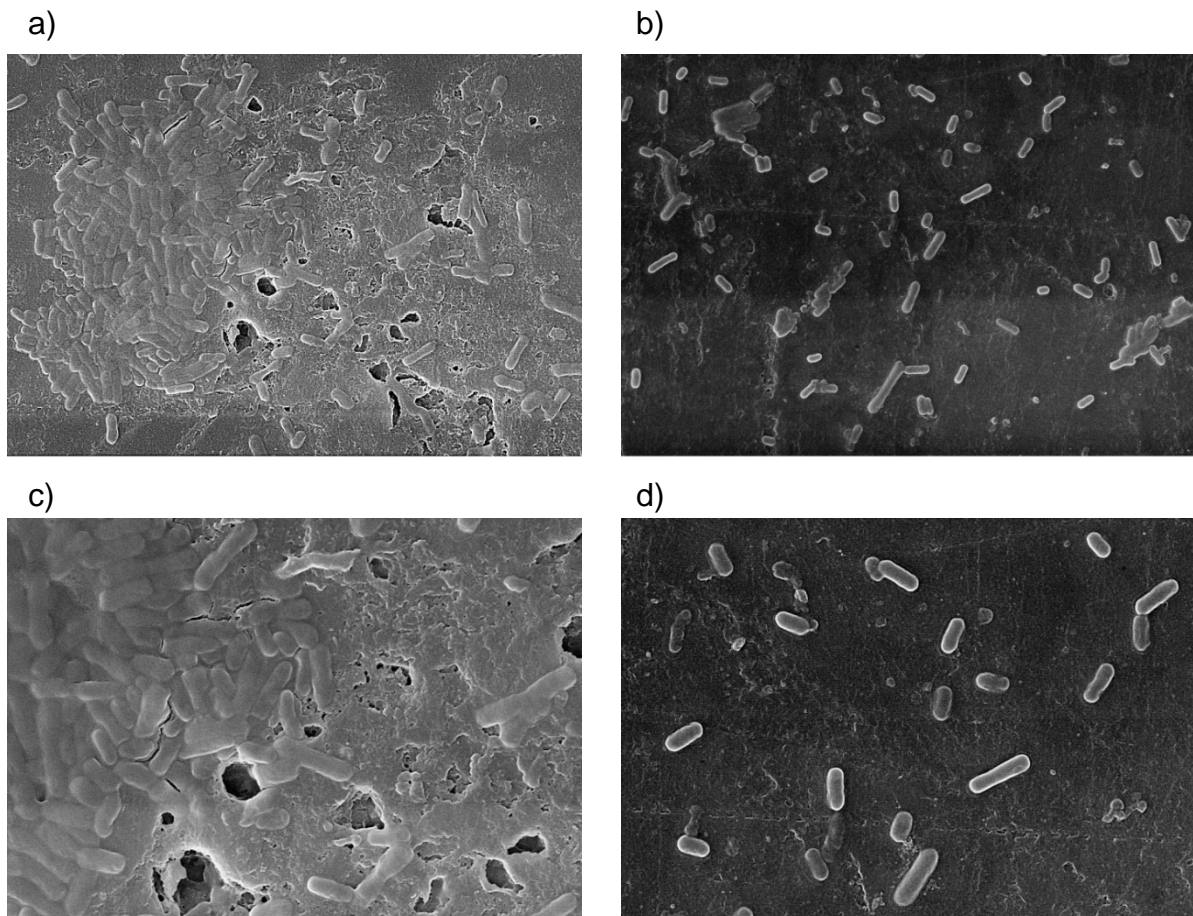


Figura 20. Imagens de MEV do biofilme de *Listeria monocytogenes* sobre a superfície de poliestireno após 48 h de incubação a) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 10000X); b) Com a adição de surfactina 0,1% por 2 h (Ampliação 10000X); c) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 20000X); d) Com a adição de surfactina 0,1% por 2 h (Ampliação 20000X).

As micrografias do biofilme de cultura mista formado durante 48 h sobre a superfície de poliestireno (Figura 21) mostraram a formação do biofilme e de polímeros extracelular. A formação de biofilmes com variedades de espécies pode representar uma vantagem para a bactéria, ou então uma espécie pode ter sua adesão reduzida pela presença de outra espécie (MCLANDBOROUGH et al., 2006). Isto porque, alguns microorganismos são capazes de produzir substâncias antagonistas, tais como bacteriocinas, biosurfatantes e outros compostos que

podem afetar o desenvolvimento de biofilmes com multi-espécies (SODAWSKA et al., 2010). Em seus estudos Sadowska et al. (2010) relatam que *P. aeruginosa* e *Lactobacillus acidophilus* causam parcial ou até total dispersão de células de *S. aureus*, inibindo o crescimento, adesão e a formação de biofilme desta espécie. Verkaik et al. (2010) descreveram que algumas bactérias que causam placa bacteriana dentária são capazes de formar biofilme mais rapidamente do que outras. Entretanto, quando se inicia a competição por nutrientes, as bactérias chamadas de “colonizadoras iniciais” podem ser excluídas do biofilme por produtos excretados pelas outras espécies. Na Figura 21a e 21c foi possível observar uma aparente predominância de *Staphylococcus aureus* formando aglomerados bacterianos.

Após tratamento com surfactina 0,1%, que apresentou melhor resultado de remoção (Tabela 7), observou-se nas micrografias (Figura 20b e 21d) uma redução das bactérias aderidas.

Comparando-se as Figuras 20 e 21 é possível observar a ação mais efetiva da surfactina na remoção de biofilme de *L. monocytogenes* do que em biofilme de cultura mista. Nota-se que o biofilme de *L. monocytogenes* apresenta grande quantidade MPE, o que sugere que a capacidade da surfactina em remover o biofilme esteja diretamente relacionado a remoção do MPE.

A menor eficiência da surfactina na remoção do biofilme de *S. aureus* e principalmente de *S. Enteritis* pode estar relacionado a quantidade de MPE, assim como sua composição química que pode ser menos suscetível a ação deste biosurfatante.

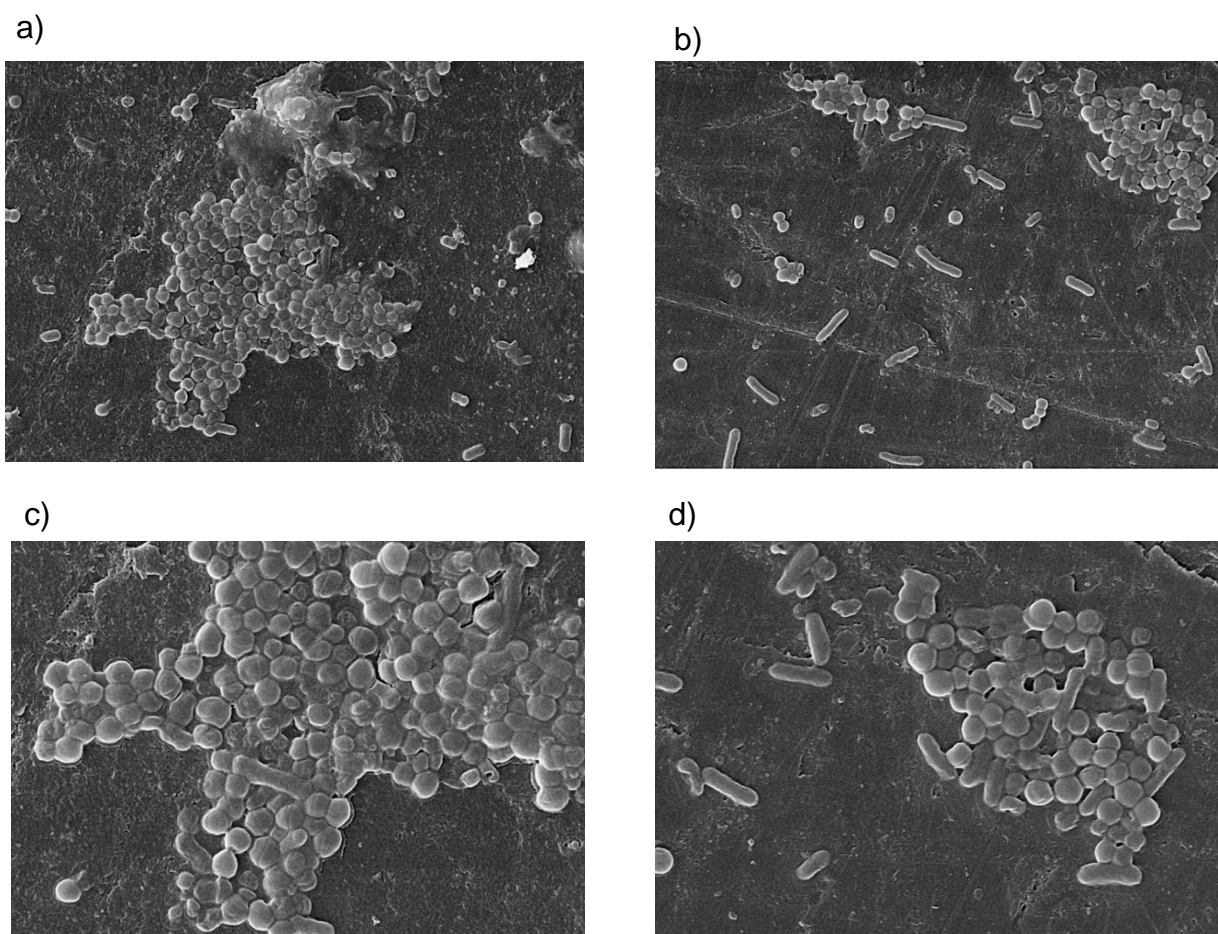


Figura 21. Imagens de MEV do biofilme formado por de cultura mista de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Enteritidis sobre a superfície de poliestireno após 48 h de incubação a) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 10000X); b) Após adição de surfactina 0,1% por 2 h (Ampliação 10000X); c) Sem adição de biosurfatante (Ampliação 20000X); d) Após adição de surfactina 0,1% por 2h (Ampliação 20000X);

### 5.11 Principais resultados

- O condicionamento da superfície com ramnolípídeo 1,0% reduziu em média 57,8% a adesão de *L. monocytogenes* na superfície de poliestireno, enquanto que a surfactina 0,25% reduziu em média 42,0% a adesão da bactéria.

- O condicionamento com surfactina 0,25% reduziu em média 42,3% a adesão de *S. Enteritidis* na superfície de poliestireno
- O condicionamento com ramnolipídeo 1,0% reduziu em média 67,8% a adesão de *S. aureus* na superfície de poliestireno.
- Os ramnolipídeos foram capazes de reduzir 44,5 % a adesão da cultura mista de *L. monocytogenes* e *S. aureus*.
- A concentração de ramnolipídeo 1,0% e de surfactina 0,25% foram as mais eficazes na redução da adesão dos patógenos.
- O condicionamento do poliestireno com os biosurfatantes reduziu a hidrofobicidade da superfície.
- As alterações mais significativas na hidrofobicidade da superfície foram observadas após condicionamento com ramnolipídeo 1,0 % (alteração do ângulo de contato de 84, 77° para 11, 45°).
- A redução na hidrofobicidade da superfície aliada a repulsão eletrostática foram fatores determinantes na atividade antiadesiva apresentada pelos ramnolipídeos.
- Os biosurfatantes foram mais eficientes como agentes antiadesivos das culturas individuais se comparadas às culturas mistas dos microorganismos.
- A surfactina 0,1% foi capaz de remover 95,9% do biofilme de *L. monocytogenes* sobre a superfície de poliestireno após 2h de contato.
- Os biofilmes de *Salmonella* Enteritidis foram menos suscetíveis a ação dos biosurfatantes.
- O biofilme de *S. aureus* apresentou remoção de 63,7% e 58,5% pela surfactina e pelo ramnolipídeo respectivamente, após 2 h de contato.

- A surfactina mostrou-se mais eficiente na remoção de biofilmes de culturas mistas do que os ramnolipídeos.
- O aumento do tempo de contato dos biofilmes com biosurfatantes não promoveu aumento da remoção dos biofilmes.
- O aumento da concentração dos biosurfatantes não resultou em um aumento na eficiência da remoção dos biofilmes.

### 5.12 Considerações finais

Neste trabalho buscou-se estudar as alterações da hidrofobicidade da superfície de poliestireno após condicionamento com biosurfatantes, e seu efeito sobre a adesão de patógenos alimentares em superfície de poliestireno. Observou-se, entretanto, que a redução da hidrofobicidade da superfície não necessariamente resulta em uma redução da adesão, e que isto pode estar relacionado com as características físico-químicas de cada microorganismo, além de outros fatores que podem estar envolvidos no processo de adesão, como apêndices celulares, produção de MPE, carga superficial, entre outros.

Desta maneira é necessária uma melhor compreensão das características físico-químicas das células, das suas alterações durante o processo de adesão e suas interações com a superfície, visto que não é possível se fazer uma generalização para a explicação do processo de adesão dos microorganismos.

Foi possível observar neste trabalho, que os biosurfatantes também podem ser utilizados para remover biofilmes principalmente de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Sua ação parece estar relacionada com a remoção do MPE.

A surfactina e o ramnolípídeo apesar de serem biosurfatantes de natureza aniônica apresentaram comportamento diferenciado em relação a atividade antiadesiva e capacidade de remoção de biofilmes. Isto demonstra que a composição química dos biosurfatantes influencia diretamente nos parâmetros estudados.

## 6. CONCLUSÃO

O ramnolipídeo e a surfactina apresentaram potencial para uso como agente antiadesivo, assim como para remover biofilmes de bactérias patogênicas de importância alimentar. A concentração do biosurfatante, a hidrofobicidade da superfície da bactéria e do poliestireno após os tratamentos mostraram-se fatores importantes envolvidos no processo de adesão.

As culturas mistas de microorganismos se mostraram mais resistentes a ação dos biosurfatantes, do que as culturas individuais.

A atividade antiadesiva e a capacidade de remoção mostraram-se dependentes da bactéria e do tipo de biosurfatante envolvido.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados encontrados neste trabalho mostram a potencialidade do uso dos biosurfatantes na redução da adesão e na remoção de biofilmes pré- formados. Entretanto, mais estudos são necessários para se otimizar a utilização dos biosurfatantes e também para a melhor compreensão dos fatores envolvidos no processo de adesão e de rompimento do biofilme causados pelos tratamentos com biosurfatante.

A ação dos biosurfatantes pode ser avaliada em outras temperaturas utilizadas no ambiente de processamento de alimentos com 25 ° C e 4° C, assim como se pode avaliar a eficiência dos mesmos em outras superfícies como aço inoxidável e vidro. Outros microorganismos de importância alimentar como *E. coli* *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Shigella* sp, também podem ser avaliados.

Avaliar os efeitos de pH, força iônica e tipo de nutrientes sobre a hidrofobicidade da superfície condicionada com os biosurfatantes, visando-se uma melhor compreensão dos resultados observados.

Avaliar a produção e caracterizar o MPE do biofilme bacteriano para melhor entendimento da adesão e da eficiência dos tratamentos com os biosurfatantes.

A capacidade em romper biofilmes pode ser avaliada por períodos menores do que 2 horas para se verificar a eficácia do biosurfatante.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and Iturin: A effects on *Bacillus subtilis* surface hidrofobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n. 10, p. 794-754, 2000.

ALLISON, D. G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v.19, n. 2, p. 139-150, 2003.

BANAT I. M.;FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI,G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C. P., MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BOLES, B. R.; THOENDEL, M.; SINGH, P.K. Rhamonolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilm. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1210-1223, 2005.

CARY, J.W.; LINZ, J.E.; BHATNAGAR, D. **Microbial foodborne diseases**. Lancaster: Technomic, 2000. 539p.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n.1, p. 22-30, 2003.

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Ramnolipídios e Polihidroxicanoatos (PHAs)**. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, N. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**, v. 71, n. 2, p. 183-186, 2009.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiological and Molecular Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUSANE, D. H.; NANCHARAI, V.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V.P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 242-248, 2010.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FOWLER, S.A.; STACY, D.M.; BLACKWELL, H.E. Design and synthesis of mycrocyclic peptomers as mimics of a quorum sensing signal from *Staphylococcus aureus*. **Organic Letters**, v. 10, p. 2329-2332, 2008.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a food-borne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

GANG, H.Z.; LIU, J.F.; MU, B.Z. Interfacial behavior of surfactin at the decane/water interface: A molecular dynamics simulation. **Journal of Physical Chemistry**, v.114, p.14947-14954, 2010.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 245-248, 2003.

HABIMANA, O.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; VESTBY, L.K.; NESSE, L.L.; HEIR, E. Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. **BMC Veterinary research**, v. 6, n. 1, p. 48-58. 2010.

HOFFMANN, F.L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, n. 9, p. 23-30, 2001

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.

IRIE, Y.; O'TOOLE, G. A.; YUK, M.H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 2, p. 237-243, 2005.

KALMOKOFF, M.L.; AUSTIN, J.W.; WAN, X.D.; SANDERS, G.; BANERJEE, S.; FARBER, J.M. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p.725-734, 2001.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J.P.; LAMERS, G.E.M.; THOMAS-OATES, J.E.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004.

LANDA, A.S.; VAN DER MEY, H.C.; BUSSCHER, H.J. A comparison of the detachment of an adhering oral streptococcal strain stimulated by mouthrinses and pre-brushing rinse. **Biofouling**, v. 9, p. 327-229, 1996.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 594-605, 2000

LY, M.H.; VO, N.H.; LE, T.M.; BELIN, J.M.; WACHÉ, Y. Diversity of the surface properties of Lactococci and consequences on adhesion to food components. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2006. 992p.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MANNE, S.; CLEVELAND, J.; GAUB, H.; STUCKY, G. HANSMA, P. Direct visualization of the surfactant hemimicelles by force microscopy of the electrical double layer. **Langmuir**, v. 12, p. 4409-4413, 1994.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 327-356, 2003.

MAYER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVES, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2000.

MCLANDSBOROUGH L.; RODRIGUEZ A.; PE´REZ-CONESA D.; WEISS J. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. **Foods Biophysics**, v.1, n. 2, p. 94-114, 2006.

METTLER, E.; CARPENTIER, B. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 57-65, 1998.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO 28. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 822-832, 2001.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of bacteriocidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MIRELES II, J.P.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 20, p. 5848-5854, 2001.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm —“City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 149-163, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

NITSCHKE M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; ARAÚJO, V.; COSTA, S.G.V.A.O.; PIRES, R.C.; ZERAIK, A.E.; FERNANDES, A.C.L.B.; FREIRE, D.M.G; CONTIERO, J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 241-247, 2009.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 621-630, 2011.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Salmonella* enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 318-323, 2007.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577-588, 2007.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, n. 5, p. 553-563, 1999.

PROKOPOVICH, P.; PERNI, S. An investigation of microbial adhesion to natural and synthetic polysaccharide-based films and its relationship with the surface energy components. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 195-202, 2009.

RHAMNOLIPIDS. Disponível em: <[www.rhamnolipids.com](http://www.rhamnolipids.com)>. Acesso em: 10 jun. 2011.

RAZA, A.Z.; KHALID, Z.M.; KHAN, M.S.; BANAT, I.M.; REHMAN, A. NAEEM, A., SADDIQUE, T.M. Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipids surfactants in different aqueous systems. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 6, p. 811-816, 2010.

RIEU, A.; LEMAÎTRE, J.P.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, n. 1-2, p. 76-82, 2008.

RIVARDO, F.; TURNER, R. J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactans produced by *Bacillus* spp. Prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 541-553, 2009.

RIVARDO, F.; MARTINOTTI, M.G.; TURNER, R.J.; CERI, H. Synergistic effect of lipopeptide biosurfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 4, p. 324-331, 2011.

RODRIGUES, L.R., BANAT, I.M., VAN DER MEI, H.C., TEIXEIRA, J.A., OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100 n. 3, p. 470-480, 2006.

ROSALSKA, B. *Staphylococcus aureus* biofilm as a target for single or repeated doses of oxacillin, vancomycin, linezolid and/or lysostaphin. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 5, p. 381-386, 2006.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

RUFINO, R.D; LUNA, J.M.; SARUBBO L.A.; RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1-5, 2011.

SADOWSKA, B.; WALENCKA, E.; WIECKOWSKA-SZAKIEL M.; RÓŻALSKA B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiológica**, v. 55, n. 5, p. 497-501, 2010.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAUER, K.; CAMPER, A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. **Journal of Bacteriology**, v. 308, p. 203-206, 2001.

SHAKERIFARD, P.; GANCEL, F.; JACQUES, P.; FAILLE, C. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. **Biofouling**, v. 25, n. 6, p. 533-541, 2009.

SHEN, H.H.; THOMAS, R.K.; CHEN, C. Y.; DARTON, R.C.; BAKER, S.C.; PENFOLD, J. Aggregation of the naturally occurring lipopeptide, surfactin, at interfaces and in solution: An unusual type of surfactant? **Langmuir**, v. 25, n. 7, p. 4211-4218, 2008

SHEN, H.H.; LIN, T.W.; THOMAS, R.K.; TAYLOR, D.J.F.; PENFOLD, J. Surfactin structures at interfaces and in solution: The effect of pH and Cations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 4427-4435, 2011.

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

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v.147, p. 3-9, 2001.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, with inorganic cations. **Biotechnology Letters**, v.14, n. 8, p. 713-718, 1992.

TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. theae. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 193-196, 2007.

VERKAIK, M. J.; HENK J. BUSSCHER, H.J.; RUSTEMA-ABBING, M.; SLOM, A .M.; ABBAS, F.; VAN DER MEI, H.C. Oral biofilm models for mechanical plaque removal. **Clinical Oral investigations**, v.14, n. 4, p. 403-409, 2010.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998

ZERAIK, A. N. **Biosurfatantes como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfície de poliestireno**. 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ZERAIK, A.E. NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hidrofobicity. **Current Microbiology**, v. 61, p. 554-559, 2010.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilm in the food processing industry- Should they be a concerned? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p.125-148, 1994.

WALENCKA, E.; ROZALSKA, S.; SADOWSKA, B.; ROZALSKA, S. The influence of *Lactobacillus acidophilus*- derived surfactants on Staphylococcal adhesion and biofilm formation. **Folia microbiology**, v. 53, n. 1, p. 61-66, 2006.