Ana Eliza Zeraik

**Biossurfatantes como agentes inibidores da adesão de
patógenos em superfícies de poliestireno**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marcia Nitschke

São Carlos

2009

Aos meus pais: Marcia e Otávio, que sempre me apoiaram, fornecendo o subsídio necessário para a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marcia Nitschke, por ter me orientado neste período, que apesar de curto, foi de intenso trabalho e aprendizagem. Agradeço pela confiança depositada, pela amizade e pela grande colaboração em minha formação.

À minha família, meus pais e minhas irmãs, Maria Luiza e Vivian por estarem sempre ao meu lado, fornecendo apoio, amor e incentivo incondicionais em todas as minhas escolhas, auxiliando-me diante das dificuldades e permitindo a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

Ao Marco, por todo o carinho, compreensão e apoio nestes anos e pela paciência nos últimos meses.

Aos meus amigos, especialmente à Lya, Jessica, Luana, Kelly e Bruna pela companhia, pelos conselhos e principalmente pela amizade.

Aos amigos, colegas e técnicos do IQSC, especialmente à Cidinha, pela amizade e pelos reagentes emprestados.

À Prof^a. Dr^a Eny Maria Vieira por permitir o uso da leitora de microplacas.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto por ceder água destilada e por permitir a utilização da balança analítica.

Ao Dr. Francisco José dos Santos pelo auxílio nas medidas de ângulo de contato.

À CAPES pela bolsa concedida.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas ...
Que já têm a forma do nosso corpo ...
E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre
aos mesmos lugares ...
É o tempo da travessia ...
E se não ousarmos fazê-la ...
Teremos ficado ... para sempre ...
À margem de nós mesmos...

Fernando Pessoa

RESUMO

O estabelecimento de biofilmes microbianos em superfícies é responsável por inúmeros problemas, já que estes podem constituir uma fonte de microrganismos patogênicos e deteriorantes. A formação dos biofilmes é precedida pela adesão dos microrganismos, assim, medidas que inibem ou reduzem essa adesão contribuem para a redução da formação de biofilmes. Uma alternativa para reduzir a adesão é o tratamento prévio das superfícies com biossurfatantes, agentes tensoativos de origem microbiana que apresentam baixa toxicidade, a vantagem de serem biodegradáveis, possuindo ainda atividade antimicrobiana e antiadesiva. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade dos biossurfatantes surfactina e ramnolípídeo como agentes inibidores da adesão de *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Serratia marcescens* ATCC 8100 em superfícies de poliestireno. Também foi estudada a influência de diferentes meios de cultura (TSYEA, ágar lactosado e ágar peptonado) e temperaturas (35°C, 25°C e 4°C) sobre a adesão bacteriana. A surfactina apresentou maior capacidade em reduzir a adesão das bactérias em estudo, quando comparada ao ramnolípídeo. O meio TSYEA foi o que promoveu maior adesão ao poliestireno para maioria das bactérias. O condicionamento da superfície com surfactina reduziu entre 63% e 66% a adesão de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *M. luteus* (cultivadas em TSYEA). As melhores respostas antiadesivas foram obtidas quando o condicionamento da superfície e o ensaio de adesão foram realizados a 4°C. A caracterização das superfícies de poliestireno (medidas de ângulo de contato) e das superfícies

bacterianas (teste MATS) forneceram informações que nos permitiram propor explicações sobre os fatores que influenciam o processo de adesão dos microrganismos nesta superfície, assim como o efeito antiadesivo exibido pela surfactina. Os resultados evidenciam a potencialidade do uso de surfactina como agente antiadesivo em superfícies de poliestireno, podendo atuar na inibição da adesão de vários patógenos.

Palavras-chave: Adesão bacteriana, biossurfatantes, surfactina, ramnolipídeo.

ABSTRACT

Development of microbial biofilms on surfaces leads to various problems, since then can be a source of pathogenic microorganisms. Biofilms development are preceded by microbial adhesion, thus, procedures that inhibit or reduce adhesion contribute to reduce biofilm formation. An alternative to decrease bacterial attachment is the preconditioning of surfaces with biosurfactants, surface active products of microbial origin. This group of compounds has low toxicity, are biodegradable and present antimicrobial and anti-adhesive properties. The main goal of this study was to evaluate the potencial use of surfactin and rhamnolipid biosurfactants in the reduction of the adhesion of *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 and *Serratia marcescens* ATCC 8100 on polystyrene surfaces. The research was carried out using three different nutritive media (TSYEA, lactose agar and peptone agar) and three different temperatures (35°C, 25°C e 4°C). Surfactin showed a higher capacity to reduce bacterial adhesion than rhamnolipid. When cultivation was performed in TSYEA, most of the bacterial species showed the highest values of adhesion to polystyrene. Surface preconditioning with surfactin reduces 63% to 66% the adhesion of *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *M. luteus* (culture media TSYEA). The most significant anti-adhesive results were obtained when both, preconditioning and adhesion assay were carried out at 4°C. Polystyrene surfaces characterization (contact angle measurements) and bacterial cells characterization (MATS test) provided information that allowed some explanation about the factors that influence microbial adhesion process on this surface and the

anti-adhesive effect caused by surfactin. The results showed that surfactin has a great potencial to be used as anti-adhesive compound on polystyrene surfaces, reducing the attachment of several pathogenic bacteria.

Key-words: Bacterial adhesion, biosurfactants, surfactin, rhamnolipid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência de oito etapas na formação do biofilme.....	27
Figura 2 - Diagrama mostrando o desenvolvimento de um biofilme como um processo de cinco etapas.....	29
Figura 3 - Estrutura da principal isoforma da surfactina.	39
Figura 4 - Estrutura das duas principais formas dos ramnolipídeos: a) mono-ramnolipídeo e b) di-ramnolipídeo.....	40
Figura 5 – Ensaio preliminar de adesão dos microrganismos em poliestireno.....	57
Figura 6 - Contagem da cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> pelo método da gota em: a) TSYEA, b) ágar lactosado, c) ágar peptonado.....	59
Figura 7 - Comparação da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em diferentes meios e temperaturas.	60
Figura 8 - Comparação da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes meios e temperaturas.	62
Figura 9 - Comparação da adesão de <i>Micrococcus luteus</i> em diferentes meios e temperaturas.	63
Figura 10 - Comparação da adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em diferentes meios e temperaturas.....	64
Figura 11 - Comparação da adesão de <i>Serratia marcescens</i> em diferentes meios e temperaturas.	65
Figura 12 - Ensaio de adesão das bactérias cultivadas em ágar lactosado a) a 35°C; b) a 4°C.	66
Figura 13 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Listeria monocytogenes</i> a 35° C. ...	70
Figura 14 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Listeria monocytogenes</i> a 25° C. ...	71
Figura 15 - Comparação da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> (cultivada em TSYEA) em poliestireno condicionado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	73
Figura 16 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Staphylococcus aureus</i> a 35°C.	73
Figura 17 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Staphylococcus aureus</i> a 25 °C.	74

Figura 18 - Comparação da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> (cultivado em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	75
Figura 19 - Ensaio de adesão <i>Staphylococcus aureus</i> em microplacas de polistireno condicionada a 4°C com surfactina e ramnolípido.	75
Figura 20 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Micrococcus luteus</i> a 35°C.....	76
Figura 21 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Micrococcus luteus</i> a 25°C.....	76
Figura 22 - Comparação da adesão de <i>Micrococcus luteus</i> (cultivado em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	77
Figura 23 - Ensaio de adesão <i>Micrococcus luteus</i> em microplacas de polistireno condicionada com surfactina.	78
Figura 24 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a 35°C.	79
Figura 25 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a 25°C.	79
Figura 26 - Comparação da adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cultivada em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	80
Figura 27 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Serratia marcescens</i> a 35°C.	81
Figura 28 - Atividade antiadesiva dos BS sobre <i>Serratia marcescens</i> a 25°C.	81
Figura 29 - Comparação da adesão de <i>Serratia marcescens</i> (cultivada em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	82
Figura 30 - Comparação da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> (cultivada em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.....	84
Figura 31 - Comparação da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> (cultivado em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.....	85
Figura 32 - Comparação da adesão de <i>Micrococcus luteus</i> (cultivado em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.....	87
Figura 33 - Comparação da adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cultivado em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.....	88
Figura 34 - Comparação da adesão de <i>Serratia marcescens</i> (cultivada em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.....	89
Figura 35 - Comparação da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> (cultivada em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	91

Figura 36 - Comparação da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> (cultivado em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	92
Figura 37 - Comparação da adesão de <i>Micrococcus luteus</i> (cultivado em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	93
Figura 38 - Adesão de <i>Micrococcus luteus</i> em ágar peptonado a 4°C.....	94
Figura 39 - Comparação da adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cultivada em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	95
Figura 40 - Adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em a) ágar peptonado b) TSYEA.	96
Figura 41 - Comparação da adesão de <i>Serratia marcescens</i> (cultivada em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.	97
Figura 42 - Micrografias da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em poliestireno com aumento de 5000 vezes a) controle b) superfície tratada com surfactina	99
Figura 43 - Micrografias da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em poliestireno com aumento de 15000 vezes a) controle b) superfície tratada com surfactina	99
Figura 44 - Colônias de <i>S. marcescens</i> cultivadas em: a) TSYEA; b) ágar lactosado; c) ágar peptonado.	108
Figura 45 - Ângulos de contato entre a água e a superfície de poliestireno condicionada com: a) surfactina; b) controle; c) ramnolípídeo.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de equipamentos e materiais utilizados	47
Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados	48
Tabela 3 - Concentrações celulares (UFC/mL) obtidas para os cinco microrganismos, nos três meios de cultura	58
Tabela 4 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> cultivada em meio TSYEA	72
Tabela 5 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivado em meio TSYEA	74
Tabela 6 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Micrococcus luteus</i> cultivado em meio TSYEA	77
Tabela 7 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio TSYEA	80
Tabela 8 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Serratia marcescens</i> em meio TSYEA	82
Tabela 9 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio ágar lactosado	84
Tabela 10 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio ágar lactosado	85
Tabela 11 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Micrococcus luteus</i> em meio ágar lactosado	86
Tabela 12 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio ágar lactosado	87
Tabela 13 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Serratia marcescens</i> em meio ágar lactosado	89
Tabela 14 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio ágar peptonado	90
Tabela 15 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio ágar peptonado	92

Tabela 16 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Micrococcus luteus</i> em meio ágar peptonado	93
Tabela 17 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio ágar peptonado	95
Tabela 18 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de <i>Serratia marcescens</i> em meio ágar peptonado	97
Tabela 19 - Teste de adesão a solventes em células bacterianas cultivadas em TSYEA	102
Tabela 20 - Teste de adesão a solventes em células bacterianas cultivadas em ágar lactosado	102
Tabela 21 - Teste de adesão a solventes em células bacterianas cultivadas em ágar peptonado	103
Tabela 22 - Medidas de ângulos de contato entre as superfícies de poliestireno e a água	109
Tabela 23 - Comparação da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em diferentes meios e temperaturas.	133
Tabela 24 - Comparação da adesão de <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes meios e temperaturas	133
Tabela 25 - Comparação da adesão de <i>Micrococcus luteus</i> em diferentes meios e temperaturas	134
Tabela 26 - Comparação da adesão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em diferentes meios e temperaturas.....	134
Tabela 27 - Comparação da adesão de <i>Serratia marcescens</i> em diferentes meios e temperaturas	135

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

Abs – Absorbância

AC – Ângulo de contato

ANOVA – Analysis of variance

ATCC – American Type Culture Collection

BS – Biossurfatantes

CMC – Concentração micelar crítica

DLVO – Derjaguin e Landau e Verwey e Overbeek

DO – Densidade ótica

EPS – Exopolissacarídeos

LPS – Lipopolissacarídeo

MATS – Microbial adhesion to solvents

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PE – Polietileno

PTFE – Politetrafluoretileno

PVC – Policloreto de vinila

RL. – Ramnolipídeo

SDS – Sodium dodecyl sulphate

Surf. – Surfactina

TSB – Tryptic soy broth

TSYEB - Tryptic soy broth and yeast extract

TSYEA – Trypticase soy and yeast extract agar

UFC – Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Biofilmes – Histórico	21
2.2 Biofilmes – Definição, características e estrutura	22
2.3 Biofilmes – Processo de formação	26
2.3.1 Adesão reversível	29
2.3.2 Adesão irreversível	30
2.3.3 Crescimento do biofilme	30
2.3.4 Maturação do biofilme	31
2.3.5 Dispersão	31
2.4 O Processo de adesão	32
2.5 Hidrofobicidade	34
2.6 Condicionamento de superfícies	35
2.7 Biossurfatantes	36
2.7.1 Surfactina	38
2.7.2 Ramnolipídeos	39
2.7.3 Efeito antiadesivo dos biossurfatantes	41
2.8 Microrganismos	42
2.8.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.8.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	43
2.8.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
2.8.4 <i>Micrococcus luteus</i>	45
2.8.5 <i>Serratia marcescens</i>	45
3 OBJETIVOS	46

15

3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Microrganismos.....	47
4.2 Reagentes e equipamentos	47
4.3 Preparo dos meios de cultura	49
4.4 Condições de cultivo	49
4.5 Padronização do inóculo bacteriano	50
4.6 Biossurfatantes	51
4.7 Quantificação da adesão bacteriana em poliestireno.....	51
4.8 Seleção dos microrganismos a serem estudados	52
4.9 Condicionamento da superfície com biossurfatantes e adesão bacteriana..	53
4.10 Caracterização físico-química das superfícies das células	53
4.11 Medidas de ângulo de contato	54
4.12 Microscopia eletrônica de varredura	55
4.13 Descarte do material	55
4.14 Análise estatística	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Seleção dos microrganismos a serem estudados	57
5.2 Padronização do inóculo bacteriano	58
5.3 Influência da temperatura e meios de cultura sobre a adesão das bactérias em poliestireno.....	60
5.4 Efeito antiadesivo dos BS sobre microrganismos cultivados nos diferentes meios de cultura	70
5.4.1 Meio TSYEA	70
5.4.2 Meio ágar lactosado	83
5.4.3 Meio ágar peptonado.....	90

5.5 Microscopia eletrônica de varredura	98
5.6 Caracterização físico-química das células bacterianas.....	100
5.6.1 Discussão do comportamento adesivo de <i>Listeria monocytogenes</i>	103
5.6.2 Discussão do comportamento adesivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	104
5.6.3 Discussão do comportamento adesivo de <i>Micrococcus luteus</i>	105
5.6.4 Discussão do comportamento adesivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 105	
5.6.5 Discussão do comportamento adesivo de <i>Serratia marcescens</i>	106
5.7 Caracterização da superfície de poliestireno	108
5.8 Discussão do comportamento antiadesivo dos BS	110
5.9 Principais resultados	117
5.10 Considerações finais	119
6 CONCLUSÃO.....	120
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
APÊNDICE A.....	133

1 INTRODUÇÃO

É inegável a importância dos microrganismos ao homem e ao meio ambiente, podendo estes agir benéficamente ou não. Os microrganismos estão presentes nos mais diversos ambientes (sendo a organização em comunidades a mais freqüente), colonizam superfícies de tecidos vivos ou superfícies inanimadas, compondo um complexo ecossistema microbiológico, do qual fazem parte microrganismos e substâncias extracelulares em associação com a superfície, dando origem aos biofilmes. Dentre os microrganismos que compõe os biofilmes, as bactérias são o grupo predominante e mais estudado, sendo responsáveis por muitos problemas relativos à contaminação de superfícies.

Assim, a percepção de bactérias na forma de biofilmes e não como organismos unicelulares, levou à necessidade de outras formas de controle dos microrganismos, pois este tipo de organização causa inúmeros problemas nas mais diversas áreas, como alimentícia e médica e possui o agravante de apresentar maior resistência a agentes sanitizantes e antimicrobianos, quando comparado aos microrganismos livres.

Para a formação de um biofilme, inicialmente a superfície é condicionada por moléculas presentes no meio, que se adsorvem no material, modificando suas propriedades, ocorrendo então a adesão do microrganismo à esta superfície. Inicialmente a adesão é reversível e o microrganismo pode ser facilmente removido, mas com o passar do tempo e com o aumento das forças de atração entre microrganismo-superfície, a adesão pode se tornar irreversível e dar origem aos biofilmes. Conseqüentemente, medidas que inibem ou reduzem a adesão microbiana, contribuem para a redução na formação de biofilmes.

Algumas tentativas têm sido direcionadas neste sentido, entre estas, o biocondicionamento de superfícies através do uso de biossurfatantes tem se mostrado uma nova alternativa para inibir a adesão de patógenos.

Os biossurfatantes (BS), compostos tensoativos produzidos por microrganismos, são moléculas que possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica e por isso reduzem a tensão interfacial entre duas superfícies, alterando as propriedades das superfícies com as quais entram em contato.

As principais vantagens do uso de biossurfatantes em comparação aos tensoativos sintéticos residem na natureza biodegradável, baixa toxicidade e atividade antimicrobiana que, aliada à atividade tensoativa, podem não só inibir a adesão, mas também a sobrevivência dos microrganismos contaminantes. O fato de apresentarem propriedades emulsionantes, torna esses compostos muito úteis para a indústria em geral, podendo ser incorporados em diferentes formulações como ingredientes multipropósito.

Dentre os biossurfatantes, se destacam a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, e os ramnolipídeos, de *Pseudomonas aeruginosa*, ambos de natureza aniônica, sendo que a surfactina pertence à classe dos lipopeptídeos e os ramnolipídeos são glicopeptídeos. Estes BS têm sido explorados por apresentarem potencial em inúmeras aplicações, como a biorremediação de poluentes e formulações de alimentos e cosméticos.

O número de publicações envolvendo adesão bacteriana em diferentes superfícies como silicone, vidro e plástico tem sido crescente, porém apenas uma pequena parte destas envolve o efeito antiadesivo de biossurfatantes em diversas espécies bacterianas, havendo uma grande diversidade de métodos e resultados.

Neste estudo será testada a atividade antiadesiva de dois biossurfatantes, a surfactina e os ramnolipídeos, frente a algumas bactérias de interesse médico e alimentar, visando estabelecer a potencialidade de uso desses compostos no controle da adesão bacteriana. Desta forma, pretende-se contribuir na pesquisa por novas alternativas de controle da adesão bacteriana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biofilmes – Histórico

Biofilmes têm sido descritos em muitos ambientes desde que Antony Van Leeuwenhoek, usando um simples microscópio construído por ele próprio, relatou a observação de uma comunidade de “animáculos” presentes na placa de seu dente em 1674^{1,2}. Mas foi apenas no século vinte que o estudo da complexa estrutura de um biofilme foi aprofundado, sendo o exame detalhado de sua estrutura possibilitado com o auxílio da microscopia eletrônica³.

Há evidências da formação de biofilmes em fósseis, especialmente em ambientes hidrotermais há bilhões de anos atrás, indicando que a habilidade de formar biofilmes é uma característica antiga e integral dos procariontes e um fator imprescindível para a sobrevivência em diversos ambientes⁴.

No contexto da evolução e adaptação é como se os biofilmes provessem homeostase (manutenção do equilíbrio interno, apesar das alterações exteriores) em face às severas condições da terra primitiva (temperaturas extremas, pH e exposição a luz ultravioleta) facilitando, desta forma, o desenvolvimento de interações entre as células⁴.

Um dos primeiros relatos de adesão de bactérias em superfícies foi feito em 1943 por Zobell⁵, no qual ele descreveu a adesão de bactérias marinhas em superfícies submersas, sugerindo que o acúmulo de nutrientes nas superfícies sólidas favorecia a adesão de bactérias.

Essa tendência de viver preferencialmente em comunidades sobre superfícies sólidas também foi relatada nesta época por Heukelekian e Heller⁶, que avaliaram o

aumento do crescimento de bactérias com a adição de uma superfície onde os microrganismos pudessem se fixar.

Em 1978 Costeron, Geesey e Cheng⁷ propuseram uma teoria para explicar a adesão de microrganismos e a formação de biofilmes em materiais, segundo a qual o biofilme estaria envolvido por uma matriz polimérica de glicocálice, que seria responsável pela adesão; verificaram também a maior resistência dos biofilmes aos antibióticos e às defesas do organismo como anticorpos e fagocitose, quando comparados às bactérias planctônicas.

2.2 Biofilmes – Definição, características e estrutura

Bactérias exibem dois modos distintos de comportamento: a forma planctônica, ou livre e o estado aderido, ou sésil, no qual as células estão aderidas umas as outras e usualmente a uma superfície sólida¹.

O modo predominante de microrganismos na natureza é aquele associado à superfícies e tem se discutido que a forma planctônica é principalmente um mecanismo de deslocamento de uma superfície à outra⁸.

As bactérias aderidas podem colonizar superfícies e estabelecer nela um biofilme. Segundo Costeron *et al*⁹, um biofilme consiste de células unitárias e microcolônias imersas em uma matriz predominantemente aniônica, altamente hidratada de exopolímeros bacterianos e macromoléculas exógenas aprisionadas a esta matriz.

Estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes⁹, já que nesta forma de organização, os organismos procariotos têm maior chance de sobrevivência, sendo mais protegidos dos predadores e de outros perigos

externos, tendo mais acesso a nutrientes (que usualmente se acumulam em superfícies sólidas) e devido à variabilidade genética que a vida em comunidade os proporciona^{10,11}.

Biofilmes podem ser descritos como sistemas auto-regulatórios, pois de acordo com o crescimento, partes vão se desprendendo e podem colonizar novas superfícies, permitindo que novas células se fixem ao biofilme original¹².

Praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser colonizada por bactérias, podendo o substrato ser abiótico (materiais inertes), como uma pedra, uma válvula cardíaca, uma tubulação, ou ser biótico (tecidos vivos), como a cavidade oral, a superfície de feridas ou o epitélio de animais e vegetais¹³.

Em muitos casos, os biofilmes podem ter uma ação benéfica, como no tratamento de efluentes domésticos e industriais, na colonização de raízes de leguminosas por bactérias fixadoras de nitrogênio¹⁴ e na produção de bebidas fermentadas, como o vinagre^{12,15}.

O estudo dos biofilmes tem se concentrado nas áreas nas quais a adesão de microrganismos tem um impacto negativo, como na formação de placas dentárias¹⁶, colonização de implantes médicos¹⁷, contaminação do sistema de água potável¹⁸ e em ambientes de processamento de alimentos^{19,20}.

Na indústria de alimentos, biofilmes causam sérios problemas, como a alteração das propriedades de fluxo, da eficiência da transmissão de calor, a obstrução de filtros ou válvulas e o aumento na taxa de corrosão da superfície, além do problema da contaminação dos produtos com bactérias patogênicas que se desprendem do biofilme^{14,19}.

No caso de uma infecção ocasionada por biofilmes, estes são capazes de espalhá-la pela dispersão de bactérias, na medida em que as células planctônicas liberadas podem causar novas infecções em várias outras partes do corpo¹. Infecções causadas por bactérias provenientes de biofilmes são mais problemáticas, já que bactérias aderidas podem resistir às respostas imunológicas do hospedeiro e são cerca de 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos, biocidas e às forças de cisalhamento que as células planctônicas²⁰.

Uma das possíveis justificativas da maior resistência atribuída aos biofilmes reside no fato de que os microrganismos envolvidos podem ter sua atividade metabólica reduzida, principalmente devido à redução de fornecimento de nutrientes e oxigênio. Aliada a dificuldade de penetração do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme e o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células².

As pesquisas utilizam usualmente células planctônicas, pois estas são mais fáceis de estudar e manipular e conseqüentemente, todos os antibióticos utilizados foram desenvolvidos para eliminar este tipo de organismo, porém, estes antibióticos freqüentemente não apresentam eficiência frente aos mesmos organismos na forma de biofilmes. O Instituto Nacional de Saúde (Bethesda, MD, EUA) estima que 80% das infecções são causadas por biofilmes²¹.

Dos microrganismos freqüentemente encontrados num biofilme, são as bactérias o grupo predominante, sendo muito comum na natureza que algas e/ou fungos sejam encontrados junto com bactérias nos substratos, principalmente em ambientes mais hidratados¹³. As elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as

principais características que fazem das bactérias organismos com grande capacidade de produção de biofilme²².

Biofilmes são sistemas heterogêneos, pois o processo difusional pelo qual os nutrientes, água e oxigênio são transportados, ocasiona um gradiente de concentração destes componentes e as bactérias se adaptam às condições químicas e ambientais que lhes são impostas²³. Assim, a estrutura dos biofilmes muda de acordo com as condições, devido à regulação genética e padrões de crescimento localizados, que fornecem flexibilidade para a rápida adaptação, que não é possível em organismos eucariotos⁴.

Os exopolissacarídeos (EPS) são os componentes principais da matriz dos biofilmes, sendo importante na maior resistência conferida a estes; são compostos majoritariamente por vários polissacarídeos e pequenas quantidades de proteínas e DNA, apresentando composição complexa e variável conforme a espécie de bactéria e mesmo na mesma espécie sob diferentes condições ambientais, sendo a celulose e a β -1,6 N-acetilglicosamina os componentes mais comuns da matriz do biofilme em muitas bactérias^{24,25}.

Bactérias Gram-negativas apresentam polissacarídeos neutros ou aniônicos, o que possibilita a associação de cátions divalentes como cálcio e magnésio que apresentam ligações cruzadas com o polímero e aumentam a força de ligação no biofilme. No caso de algumas bactérias Gram-positivas, a composição química do exopolissacarídeo pode ser diferente e primeiramente catiônica³. Além dos exopolissacarídeos, proteínas de superfície também estão envolvidas na formação do biofilme²⁵.

Muitas bactérias que constituem o biofilme apresentam um modo de comunicação intra e interespecie denominado *quorum sensing*, pelo qual moléculas sinalizadoras, os autoindutores, são secretadas e ao atingir uma concentração limite (sendo assim dependente da densidade celular) são reconhecidos e fazem com que as células apresentem um comportamento coordenado, podendo regular uma série de características fenotípicas, como produção de polímero extracelular, síntese de biosurfatante, produção de antibióticos, esporulação, competência para captação de DNA, bioluminescência, expressão de genes de virulência, entre outros²⁶.

2.3 Biofilmes – Processo de formação

O desenvolvimento de um biofilme é descrito por um conjunto de várias etapas, que varia conforme o autor, podendo conter quatro ou mais etapas²⁷.

Busscher e van der Mei²⁷ propuseram um modelo de oito etapas para a formação de biofilmes (Figura 1).

Figura 1 - Sequência de oito etapas na formação do biofilme.

a) Condicionamento do substrato; b) transporte de massa microbiana; c) adesão inicial; d) coadesão entre diferentes espécies; e) adesão irreversível; f) coagregação entre microrganismos em suspensão; g) crescimento dos microrganismos aderidos; h) dispersão de partes do biofilme.

Segundo este modelo, inicialmente ocorre o condicionamento da superfície pela adsorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos, o acúmulo destas moléculas na interface sólido-líquido leva a altas concentrações de nutrientes comparadas à fase fluida. Esta camada de condicionamento modifica o substrato, podendo facilitar a adesão bacteriana^{27,28}.

O condicionamento da superfície é seguido pelo transporte dos microrganismos até a superfície condicionada. Depois de transportados para a superfície do substrato, os microrganismos podem ou não aderir, dependendo das forças de interação.

A adesão inicial é geralmente reversível e esta é seguida pela coadesão (adesão entre os microrganismos aderidos), uma vez aderidos os colonizadores primários, colonizadores secundários coaderem aos já aderidos no substrato, iniciando a formação de um biofilme multiespécies.

A adesão irreversível, em que há produção de exopolissacarídeo constitui a quinta etapa neste modelo de desenvolvimento de biofilme.

Em seguida pode ocorrer a coagregação, que consiste na agregação entre microrganismos em suspensão, estes coagregados podem então aderir ao substrato.

A próxima etapa consiste no crescimento do biofilme, que evolui para sua maturação e a dispersão de partes do biofilme.

Comumente, um mecanismo de formação de biofilmes simplificado, envolvendo cinco etapas é descrito (Figura 2)²⁹.

Figura 2 - Diagrama mostrando o desenvolvimento de um biofilme como um processo de cinco etapas.

1) Adesão reversível; 2) adesão irreversível; 3) crescimento do biofilme; 4) maturação do biofilme; 5) dispersão.

2.3.1 Adesão reversível

A primeira etapa na formação do biofilme (no mecanismo de cinco estágios) é a adesão dos microrganismos à superfície condicionada, que pode ser um processo ativo ou passivo e depende da motilidade da bactéria ou do transporte das células planctônicas pela gravidade, difusão ou forças dinâmicas do fluido do meio se estiver em uma fase fluida¹⁹.

Inicialmente interações fracas são desenvolvidas entre as células e o substrato, correspondendo à adesão reversível, na qual a bactéria apresenta um movimento browniano e pode ser facilmente removida¹⁹. Este tipo de adesão

envolve interações por forças de longo alcance como forças de atração de van der Waals e forças eletrostáticas, sendo muito importante neste estágio as propriedades físico-químicas da superfície da célula, da superfície de contato e da disponibilidade de nutrientes¹².

2.3.2 Adesão irreversível

Nesta etapa estão envolvidas as forças de curto alcance como interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas³⁰. Além destas interações, a produção de polímeros de polissacarídeos, devido à estimulação provocada por proteínas de membrana da célula bacteriana⁸, e estruturas celulares como flagelos, fímbrias, estão também envolvidas na fixação da bactéria à superfície. São estas estruturas que possibilitam o contato entre a bactéria e o substrato quando forças repulsivas evitam que a superfície bacteriana entre em contato direto com a superfície¹⁹.

2.3.3 Crescimento do biofilme

Na próxima etapa, as bactérias aderidas irreversivelmente começam a desenvolver a arquitetura tridimensional do biofilme, as células aderidas crescem e se dividem, levando à formação de microcolônias e canais de água; também neste período muitas células alteram seus processos fisiológicos em resposta às condições ambientais, como por exemplo, passam a crescer em anaerobiose²⁹.

2.3.4 Maturação do biofilme

A maturação constitui a quarta etapa de desenvolvimento do biofilme, em que há a geração de uma complexa arquitetura, canais e poros para o transporte de nutrientes²⁹. Há o desenvolvimento da sinalização entre as células (*quorum sensing*), permitindo a troca de material genético como plasmídeos e enzimas¹⁹; o biofilme se torna mais resistente e diferente das células planctônicas, além da grande diferença com relação ao perfil de proteínas expressas³¹.

2.3.5 Dispersão

A última etapa no processo do ciclo de vida do biofilme corresponde à liberação de células planctônicas ou microcolônias que se desprendem do biofilme e podem vir a colonizar outra superfície.

A dispersão das células pode ser causada por perturbações externas, pode ser fisiologicamente regulada, ou causada pela perda de EPS ou proteínas de ligação da superfície⁴, correspondendo a um evento de controle do ponto de vista do biofilme e sendo a maior preocupação do ponto de vista médico e alimentar, pois o desprendimento de bactérias do biofilme é uma importante causa de infecção e contaminação alimentar.

2.4 O Processo de adesão

A adesão é um processo complexo, regulado por diversas características, como as propriedades superficiais do substrato e da superfície da célula bacteriana (como carga superficial e hidrofobicidade), a composição do filme que condiciona o substrato, a rugosidade e porosidade deste, o tempo de contato entre a bactéria e a superfície, bem como as propriedades microbiológicas (a presença de fímbrias, flagelo e exopolissacarídeos), o estágio de crescimento do microrganismo, a composição do meio de cultura, e condições ambientais (como pH, força iônica, temperatura)^{3,32,33}.

Os mecanismos geralmente aceitos para explicar a adesão de células bacterianas a uma superfície podem envolver duas etapas³⁴, a adesão reversível, seguida pela adesão irreversível (itens 2.3.1 e 2.3.2), ou três etapas.

No modelo de três etapas proposto por Busscher e Weerkamp³⁵, o processo é visto em termos da distância entre a bactéria e o substrato. Quando a distância célula-superfície é maior que 50 nm apenas as forças de longo alcance atuam, e a adesão é reversível; quando a separação se aproxima de 20 nm, aumenta a contribuição de forças de atração ou repulsão eletrostáticas (esta etapa pode ser reversível, mas se tornar irreversível com o tempo). A terceira etapa ocorre em distâncias menores que 15 nm, em que interações específicas ocorrem e levam à adesão irreversível.

Para entender as forças que determinam a adesão microbiana, pesquisadores têm tentado determinar se a adesão bacteriana às superfícies é governada pelas mesmas interações físico-químicas que regem a deposição de partículas coloidais

sem vida. Três teorias têm sido utilizadas: O modelo DLVO, a teoria termodinâmica e a DLVO estendida³⁶.

Ao considerar apenas as forças de longo alcance, uma teoria foi proposta para explicar a adesão reversível de microrganismos a vários substratos, baseada na teoria de estabilidade de colóides de Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948) (DLVO)³⁷.

Esta teoria tem sido usada para descrever a energia potencial total de interação (V_{TOT}) entre a célula e o substrato como o resultado de dois fatores, V_A resultante das interações de van der Waals (geralmente atrativas) e as interações repulsivas (V_R) resultantes da superposição da dupla camada elétrica da célula e do substrato (geralmente repulsivas devido à carga elétrica negativa da célula e do substrato), sendo estas forças dependentes da distância. Entretanto, esta teoria descreve apenas um dos vários componentes do processo de adesão que é a probabilidade de um microrganismo ultrapassar a barreira eletrostática que o separa do substrato³⁷.

De acordo com a teoria termodinâmica, a adesão é favorecida se esta conduz a uma diminuição da energia livre do sistema. A energia livre de Gibbs da interação pode ser calculada assumindo que as interfaces bactéria/meio líquido e sólido/meio líquido são substituídas pela interface bactéria/sólido¹⁶.

Como a maioria das interações entre bactéria e substrato ocorre em meio aquoso, deve-se considerar a contribuição das interações ácido-base de Lewis, já que estas representam geralmente 90% das interações não covalentes em água. Ao considerar as interações ácido-base e as interações hidrofóbicas, juntamente com

as duas forças presentes na teoria DLVO, van Oss sugere uma extensão dessa teoria, originando a teoria DLVO extendida ou XDLVO³⁸.

Entretanto essas teorias não levam em consideração os aspectos microbiológicos da adesão, como a presença de polímeros extracelulares, fímbrias, flagelos, o que muitas vezes leva a falhas, restringindo suas aplicações.

2.5 Hidrofobicidade

As Interações hidrofóbicas são consideradas por muitos autores como uma das principais características responsáveis pela adesão¹², sendo de dez a cem vezes mais fortes que as forças de longo alcance (forças de van der Waals e eletrostáticas)³⁹, estas interações podem ser definidas como a atração entre moléculas apolares ou ligeiramente polares quando imersas em água.

A força dessas interações não é devida a nenhuma atração intrínseca entre as moléculas não polares, resultando do fato de o sistema atingir a maior estabilidade termodinâmica ao minimizar o número de moléculas de água ordenadas (aumentando a entropia), requeridas para envolver as regiões hidrofóbicas das moléculas do soluto, já que a quebra de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água retira energia do sistema⁴⁰. Assim estas interações estão diretamente baseadas nas interações ácido-base de Lewis (doador-aceptor de elétrons) entre as moléculas de água³⁹.

A hidrofobicidade da superfície da célula é importante na adesão, já que as interações hidrofóbicas tendem a crescer com o aumento da natureza apolar das superfícies envolvidas, ou seja, da superfície da célula microbiana e da superfície do substrato.

A superfície da maioria das bactérias é carregada negativamente, mas contém componentes hidrofóbicos em sua superfície. A hidrofobicidade da célula bacteriana varia de acordo com a espécie e linhagem e é influenciada pelo modo e estágio de crescimento, bem como pela composição do meio de cultura⁴¹.

2.6 Condicionamento de superfícies

Em função das complexas características físico-químicas das superfícies de diferentes materiais bem como das bactérias, estas irão aderir de forma diferente aos diversos materiais aos quais forem expostas. Com relação à hidrofobicidade, os materiais podem ser divididos em duas classes principais: os hidrofílicos, freqüentemente com carga negativa e compostos de materiais inorgânicos como o vidro, metais ou minerais e aqueles relativamente hidrofóbicos, com baixa carga eletrostática, geralmente polímeros orgânicos como o plástico⁴².

Materiais hidrofílicos são freqüentemente usados em indústrias de alimentos, pois geralmente reduzem a adesão bacteriana, devido, em parte à baixa energia interfacial sólido-solução desta superfície e pelo fato de apresentarem carga semelhante à da superfície da célula bacteriana, embora haja diferenças na hidrofobicidade e carga superficial em diferentes bactérias.

Como a adesão é termodinamicamente favorecida se há uma diminuição da energia livre do sistema, a adesão se mostra menos favorável, teoricamente, em superfícies como o vidro, devido a sua baixa hidrofobicidade, quando comparadas ao aço inox, PVC, PE, silicone, entre outras¹⁸.

Assim, medidas preventivas eram baseadas somente na escolha do material a ser utilizado, entretanto estudos têm sido desenvolvidos no sentido de se modificar

as propriedades físico-químicas da superfície do material, para reduzir a força de atração entre microrganismos e superfícies com que estes possam entrar em contato⁴³.

Inúmeras alternativas para inibir a adesão microbiana têm sido reportadas, como o tratamento da superfície com compostos antimicrobianos ou a otimização da estrutura da superfície para que seja o mais resistente à corrosão e menos imperfeito possível, pois defeitos topográficos aumentam o número de sítios de adesão para microrganismos¹¹.

Alguns estudos sugerem uma nova estratégia, baseada no biocondicionamento de superfícies através do uso de compostos tensoativos produzidos por microrganismo, conhecidos como biossurfatantes.

2.7 Biossurfatantes

Surfatantes são moléculas anfipáticas (possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica) que apresentam atividade superficial, ou seja, atuam na interface entre duas fases de diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão superficial e interfacial, além de apresentarem capacidade emulsificante⁴⁴⁻⁴⁷.

Todos os surfatantes formam agregados em solução aquosa a partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), esses agregados de monômeros do surfatante são denominados micelas, estas possuem as regiões hidrofílica e hidrofóbica associadas espontaneamente em solução aquosa a partir da CMC, formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais⁴⁴⁻⁴⁷.

Abaixo da CMC o surfatante está predominantemente na forma de monômeros; e em concentração igual ou superior à CMC, o tensoativo está organizado majoritariamente na forma de micelas, constituindo-se a CMC uma propriedade intrínseca de cada surfatante, sendo dependente da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura). A eficiência dos surfatantes é baseada em sua capacidade de diminuir a tensão superficial, esta é relacionada com a CMC. Surfatantes eficientes apresentam uma baixa CMC⁴⁴⁻⁴⁷.

Estas propriedades fazem dos surfatantes uma das classes de compostos mais importantes e versáteis, possuindo inúmeras aplicações nas mais diversas áreas, podendo atuar como detergentes, emulsificantes, lubrificantes, espumantes, dispersantes, molhantes e solubilizantes⁴⁶.

Biossurfatantes ou biotensoativos são surfatantes de origem microbiana, pois muitos microrganismos, principalmente bactérias, produzem uma variedade destes compostos, que são classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana; variam desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A maioria dos biossurfatantes são aniônicos ou neutros, sendo as principais classes os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfatantes poliméricos e surfatantes particulados⁴⁷.

Existem ainda outros tipos de surfatantes naturais, sintetizados por plantas (saponinas) ou mesmo humanos (sais biliares), entretanto a maioria dos surfatantes comerciais é de origem petroquímica⁴⁶.

Os biotensoativos apresentam uma série de vantagens em relação aos tensoativos sintéticos: são biodegradáveis, menos tóxicos, são mais eficientes

(apresentam menor CMC), agem em extremos de temperatura, de pH, podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química. Diante destas vantagens podem ser utilizados em várias áreas, como a biorremediação de poluentes, indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica⁴⁸⁻⁵⁰.

Entretanto, seu alto custo de produção, aliado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros, limita o seu uso; porém o interesse por esse tipo de surfatante vem crescendo nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da preocupação ambiental.

2.7.1 Surfactina

A surfactina foi um dos primeiros biossurfatantes a serem descritos, data de 1968, quando Arima e colaboradores descobriram um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, que foi denominado surfactina devido à sua grande atividade superficial⁵¹. É sintetizada por várias espécies do gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus subtilis*, durante a fase estacionária de crescimento, quando os nutrientes são limitados⁵².

Pertence à classe dos lipopeptídeos e sua estrutura (Figura 3)⁵³ é composta por um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi, contendo de 12 a 16 átomos de carbonos, apresenta resíduos hidrofóbicos de aminoácidos e dois resíduos que lhe conferem carga negativa, os ácidos aspártico e glutâmico. É produzida naturalmente como uma mistura de vários peptídeos com diferentes comprimentos da cadeia alifática^{52,53}.

Figura 3 - Estrutura da principal isoforma da surfactina.

A surfactina é um biossurfatante muito versátil, possuindo aplicações na biorremediação de poluentes, aumentando a disponibilidade de alguns compostos hidrofóbicos como óleo, hidrocarbonetos poliaromáticos, pesticidas e conseqüentemente seu potencial para degradação por microrganismos. Além de ser um dos mais poderosos biossurfatantes conhecidos, a surfactina também possui propriedades antitumorais, antibacterianas e antivirais^{52,54,55}.

2.7.2 Ramnolipídeos

O primeiro biossurfatante a ser relatado, em 1949 por Jarvis e Johnson, que detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um glicopeptídeo⁵⁶. Os ramnolipídeos, produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* e outras espécies do gênero *Pseudomonas* são um dos mais bem conhecidos e caracterizados biossurfatantes. Suas propriedades dependem da composição e

distribuição das estruturas homólogas presentes, que são determinadas pela linhagem que o produz, das condições de cultura e composição do meio⁵⁷.

Pertencente à classe dos glicolipídios, são compostos por diferentes estruturas que variam de uma a duas moléculas de ramnose a uma ou duas moléculas de ácidos graxos, cujas cadeias variam de 8 a 14 moléculas de carbonos⁶³. É referido como uma mistura de espécies homólogas e são classificados em dois grupos principais: os mono-ramnolipídeos, que contêm uma unidade de ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanóico e di-ramnolipídeos, com duas moléculas de ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanóico (Figura 4)⁵⁷.

Figura 4 - Estrutura das duas principais formas dos ramnolipídeos: a) mono-ramnolipídeo e b) di-ramnolipídeo.

Por ser obtido em concentrações superiores aos outros biossurfatantes, apresenta alto potencial de produção comercial⁵⁷, sendo também conhecido como um potente composto antimicrobiano, apresentando uso nas indústrias farmacêutica, alimentícia e na indústria cosmética.

2.7.3 Efeito antiadesivo dos biossurfatantes

Em relação ao efeito antiadesivo dos biossurfatantes, hipóteses têm sido propostas através das quais a adsorção de biossurfatantes em superfícies altera sua hidrofobicidade, suas propriedades ácido-base e interfere no processo de adesão microbiana e no processo de dessorção⁵²

Estudos recentes demonstraram uma redução de mais de 90% na adesão de *Listeria monocytogenes* LO28 em amostras de aço inox tratadas com biossurfatante obtido de *Pseudomonas fluorescens*⁴³, enquanto não foi observada redução significativa em PTFE, os autores sugerem que mudanças nas propriedades superficiais do substrato têm efeito no comportamento adesivo desta bactéria.

Meylheuc *et al.*⁵⁹ reportaram uma redução de 75% a 99% na adesão de quatro linhagens de *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inox condicionadas com BS produzidos por *Lactobacillus helveticus* e *Pseudomonas fluorescens*. Mireles *et al.*⁶⁰ relataram que a surfactina de *Bacillus subtilis* inibiu a formação de biofilmes de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em cateteres polivinílicos e reduziu em 85% o biofilme previamente formado por *Salmonella enterica* em microplacas de PVC.

O condicionamento de superfícies de próteses de voz de silicone com ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* provocou uma na redução de 66% na taxa inicial de adesão de *Streptococcus salivarius* e *Candida tropicalis* e 48 % de redução na adesão (após 4 h) de *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* e *Candida tropicalis*¹⁷. O número de bactérias aderidas também em prótese de voz de silicone condicionada com BS produzido por *Streptococcus thermophilus* foi reduzido em 89% para *Rothia dentocariosa*, 97%

para *Staphylococcus aureus* e 67% e 70% para *Candida albicans* e *Candida tropicalis* respectivamente⁶¹.

Irie *et al.*⁶² demonstraram que o ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* foi efetivo na dispersão de biofilmes de *Bordetella bronchiseptica* em superfícies de vidro e poliestireno. A inibição da adesão de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em microplaca de poliestireno por biossurfatantes produzidos por *Lactobacillus acidophilus*⁵² e a atividade antiadesiva de dois biossurfatantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* verificada contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em poliestireno⁶³ estão entre as mais recentes pesquisas nesta área.

2.8 Microrganismos

2.8.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, na forma de coco, com 0,5 a 1 µm de diâmetro, que se apresenta em pares, pequenas cadeias ou na forma de cachos; não apresenta motilidade e é freqüentemente encontrada no ambiente como na água, ou no ar e no corpo humano, como na pele, no nariz, na garganta ou no cabelo, fazendo parte da população normal de microrganismos presentes na maioria das pessoas^{64,65}.

Sua patogenicidade se expressa na liberação de toxina em altos níveis, quando há um crescimento elevado deste microrganismo, o que pode levar a contaminação de alimentos, podendo ocasionar náusea, vômito, dores abdominais e prostração. Alimentos que requerem manuseio na preparação e que são mantidas a

temperaturas ligeiramente altas (as enterotoxinas apresentam temperatura ótima de produção entre 35-45°C) são geralmente propensas a apresentarem este tipo de contaminação⁶⁴.

Este patógeno pode crescer sob condições de alta pressão osmótica e baixa umidade, sua temperatura ótima é 30 a 37°C, mas pode crescer de 7 a 48,5°C, seu pH ótimo é de 7-7,5, mas é estável de 4,2 a 9,3, o que permite seu desenvolvimento em uma variedade de alimentos⁶⁶.

A formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de infecções associadas à biomateriais, como cateteres, próteses, válvulas cardíacas e lentes de contato, estas infecções atingem milhões de pacientes no mundo todo ano⁶⁷. Este tipo de infecção geralmente não responde aos antibióticos convencionais, o que requer a remoção do biomaterial infectado, aumentando a taxa de mortalidade destes pacientes⁶⁸.

2.8.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, na forma de cocobacilo, apresenta motilidade e é anaeróbica facultativa. Comumente encontrada no solo, na água e no ar, pode contaminar alimentos, especialmente laticínios, mas também é encontrada em carnes não cozidas, peixes e vegetais. Quando estes alimentos contaminados são ingeridos, podem causar listeriose, uma séria infecção que atinge especialmente pessoas mais suscetíveis como mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pessoas imunologicamente comprometidas^{69,70}.

Constitui o principal patógeno de alimentos e possui resistência em condições adversas, que normalmente limitariam o crescimento de bactérias, este patógeno

pode aderir à superfícies em um intervalo de temperatura de 4°C a 45 °C, possuindo a capacidade de crescer sob refrigeração, também pode crescer em alta concentração salina e em uma faixa de pH de 4,4 a 9,6^{71,72}.

2.8.3 *Pseudomonas aeruginosa*

As células de *Pseudomonas aeruginosa* possuem a forma de bastonete de 2 a 4 µm de comprimento, é um microrganismo Gram-negativo, aeróbico, que se locomove por meio de flagelos e em condições adequadas pode produzir dois tipos de pigmentos, um amarelo esverdeado, a fluoresceína e outro azul esverdeado, a piocianina. *Pseudomonas* são muito comuns no solo, na água, em plantas e animais. *Pseudomonas aeruginosa* possui mínimas exigências nutricionais e tem predileção por umidade, podendo também crescer em temperatura de refrigeração^{73,74}.

Biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* têm sido muito estudados devido a sua facilidade em colonizar superfícies sob diversas condições e sua importância médica. A virulência deste patógeno está associada com sua habilidade de aderir à superfície da célula hospedeira, formando biofilme e secretando toxinas e enzimas hidrolíticas⁷³.

Pseudomonas aeruginosa é o terceiro patógeno mais comum relacionado à infecções hospitalares, apresentando difícil tratamento, devido a sua alta resistência aos antibióticos e à formação de biofilmes também resistentes⁷⁵, considerado importante patógeno oportunista, causa infecções crônicas nos pulmões de pacientes com fibrose cística, e causa severas infecções em pacientes imunocomprometidos⁷³.

2.8.4 *Micrococcus luteus*

Bactérias na forma cocos, geralmente organizadas em tétrades, não apresentam motilidade, são Gram-positivas e aeróbicas. Produzem pigmento amarelo insolúvel em água. Este microrganismo é encontrado na pele humana, na água e no solo. A prolongada fase estacionária deste organismo origina células em estado dormente, o que permite que sobreviva por muito tempo em ambientes extremos^{76,77}.

Micrococcus luteus era geralmente considerado um não patógeno, mas pesquisas recentes mostraram que esta bactéria pode ser um patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos, sendo relatados casos de meningite, pneumonia, endocardite causada por infecção em válvulas cardíacas e choque séptico, sendo considerado um patógeno emergente em infecções hospitalares⁷⁸.

2.8.5 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens se diferencia por produzir um pigmento vermelho, a prodigiosina, trata-se de uma bactéria oportunista Gram-negativa, na forma de bastonete, que possui motilidade e é anaeróbica facultativa. Ocorre naturalmente no solo, água e no intestino de seres humanos e animais.

É uma bactéria oportunista associada a várias infecções humanas, como pneumonia, meningite e endocardite, está presente em cerca de 2% das infecções hospitalares, onde pode colonizar o trato urinário, feridas, pele ou instrumentos médicos como cateteres, e apresenta resistência a muitos antibióticos^{79,80}.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar a potencialidade do uso de biossurfatantes como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfície de poliestireno.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a habilidade dos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Serratia marcescens* em aderir sobre poliestireno.
- Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura (TSYEA, ágar lactosado e ágar peptonado) e temperaturas (35°C, 25°C e 4°C) na adesão dos patógenos em microplacas de poliestireno.
- Verificar o efeito do condicionamento da superfície de poliestireno com biossurfatantes (surfactina e ramnolipídeos) sobre a adesão bacteriana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Serratia marcescens* ATCC 8100.

4.2 Reagentes e equipamentos

Na Tabela 1 encontram-se os equipamentos e materiais utilizados e na Tabela 2 os reagentes.

Tabela 1 - Lista de equipamentos e materiais utilizados

Equipamento	Marca
Espectrofotômetro UV-Visível BioMate3	Thermo Scientific
Leitora de microplaca	Thermoplate
Medidor de ângulo de contato, OCA 15	Dataphysics
Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo 440	LEO
Metalizador, modelo 020	BAL-TEC Medical
Câmara de fluxo laminar	VECO
Autoclave vertical	Phoenix
Estufa bacteriológica	Adamo
Agitador de tubos tipo vortex	Siger
Placa de Microtitulação com 96 poços estéril de poliestireno e fundo em “U”, estéril e transparente	Kartell
Placa de Petri estéril	Pleion

Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados

Reagente	Pureza	Marca
Ágar tripticase de soja		Criterion
Extrato de carne		Criterion
Extrato de Levedura		Criterion
Lactose		DIFCO
Ágar bacteriológico		Acumedia
Peptona		DIFCO
Cloreto de sódio	99 %	QHEMIS
Hidrogenofosfato de sódio P.A.	99 %	VETEC
Dihidrogenofosfato de potássio P.A.	99%	VETEC
Cristal violeta P.A.		Synth
Álcool Metílico P.A.	99,8%	QHEMIS
Álcool Etílico P.A.	95%	QHEMIS
Ácido Acético Glacial P.A.	99,7%	QHEMIS
n-Hexano	95%	Tedia
Éter etílico	98%	Fmaia
Clorofórmio	99,8%	QHEMIS
Hexadecano	90-100%	J.T. Baker

4.3 Preparo dos meios de cultura

Diferentes meios de cultura foram empregados, de modo a avaliar a influência destes no crescimento e na adesão bacteriana, foram estes: TSYEA (ágar tripticase de soja e extrato de levedura), ágar lactosado e ágar peptonado, com a seguinte composição:

- TSYEA: Ágar tripticase de soja (40 g/L) e extrato de levedura (6 g/L).
- Ágar lactosado: Lactose (5 g/L), peptona (5 g/L), extrato de carne (3 g/L) e ágar (20 g/L).
- Ágar peptonado: Peptona de carne (10 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), hidrogenofosfato de sódio (9 g/L), dihidrogenofosfato de potássio (1,5 g/L) e ágar (20 g/L).

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

4.4 Condições de cultivo

As culturas foram mantidas em estoque, congeladas a -20°C. A partir destas foram feitos estoques em ágar inclinado, inoculando-se uma alçada de cada cultura em tubos contendo o meio de cultura em estudo, depois de incubados em estufa a 35°C por 24 h, as culturas eram armazenadas em geladeira, a 4°C, para utilização por um período de um mês, e então substituídas por novos estoques a partir das culturas congeladas.

4.5 Padronização do inóculo bacteriano

Para determinação da concentração celular foi utilizado o método da gota, desenvolvido por Miles & Misra⁸¹ em 1938, o qual se baseia em diluições seriadas (de 10^{-1} a 10^{-9}) e contagem em placa do número de células viáveis.

A partir das culturas em estoque, foram feitos pré-inóculos em tubos contendo o meio em estudo, estes foram incubados a 35°C por 24 h. O cultivo resultante foi inoculado em placas contendo o mesmo meio de cultura e estas foram incubadas novamente nas mesmas condições. À placa resultante foi adicionada solução de NaCl 0,86%, (volume variável de 6 a 10 mL por placa, dependendo do crescimento do microrganismo em cada meio) e a superfície foi raspada com alça de platina para remoção de toda massa celular.

Esta suspensão foi submetida a diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} e gotas de 15 µL referentes a cada diluição foram depositadas nas placas e incubadas a 35°C por 24 h, então se realizou a contagem das colônias nas gotas que possuíam de 5 a 50 UFC. O número de células viáveis foi determinado pela média do número de colônias, multiplicado pela diluição, obtendo-se assim o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de solução.

A densidade ótica da suspensão 10^{-1} foi determinada a 610 nm, para posterior comparação com demais suspensões, de modo a se obter uma estimativa do número de células da suspensão por meio de sua turbidez. Desta forma foi padronizado o número de células viáveis da suspensão a ser utilizada nos experimentos.

4.6 Biossurfatantes

Amostras de surfactina obtida de *B. subtilis* e ramnolipídeos de *P. aeruginosa* produzidas conforme metodologia estabelecida em trabalhos anteriores^{82,83} foram aplicadas para o condicionamento da superfície de poliestireno.

A surfactina utilizada neste estudo possuía concentração micelar crítica (CMC) de 33 mg/L, tensão superficial de 26,9 mN/m e pureza de 78%. O ramnolipídeo apresentava CMC de 43,21 mg/L, tensão superficial de 30,96 mN/m e 65% de pureza⁸³.

Foram utilizadas soluções aquosas na concentração de 0,1% (m/v) para a surfactina e 0,4% (m/v) para os ramnolipídeos. Estas soluções foram esterilizadas por meio de filtração em membrana 0,22 µm.

4.7 Quantificação da adesão bacteriana em poliestireno

As suspensões bacterianas foram preparadas a partir das culturas mantidas em estoque, através de pré-inóculo em tubo e inóculo em placa de Petri, de modo à sempre se trabalhar com culturas de 24 h. Às placas com as culturas de 24 h era adicionada solução salina 0,86%, até concentração 1×10^9 UFC/ mL, a qual era verificada por meio das medidas de DO a 610 nm.

Para monitorar a habilidade das bactérias estudadas em aderir a material plástico, utilizaram-se microplacas de poliestireno contendo 96 poços. Alíquotas de 200 µL de cada suspensão bacteriana foram depositadas na microplaca, que foi incubada na temperatura selecionada durante 6 h. Com amostras sendo retiradas a

cada hora, de modo a se estipular um tempo de adesão para serem realizados os experimentos futuros.

Após lavagem com água esterilizada, a fixação das bactérias aderidas foi realizada com a adição de 200 µL de metanol durante 15 minutos. As microplacas foram então coradas com 200 µL de cristal violeta 1% por 15 minutos, o excesso de corante foi retirado lavando-se as microplacas com água. Depois de secas, foram adicionados 200 µL de ácido acético glacial 33% para solubilizar o corante. As medidas de absorbância foram realizadas em uma leitora de microplacas a 630 nm (adaptação da técnica descrita por Rodrigues *et al.*¹⁷).

4.8 Seleção dos microrganismos a serem estudados

Para a seleção dos microrganismos a serem estudados, testes preliminares de adesão foram realizados, para isso utilizou-se uma cultura de 24 h de cada microrganismo em placa contendo meio TSYEA, a suspensão foi feita com 5 mL de solução salina e a microplaca incubada por 6 h a 35°C.

Os microrganismos testados foram: *Salmonella choleraesuis* subsp. *Choleraesuis* sorotipo Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112.

4.9 Condicionamento da superfície com biossurfatantes e adesão bacteriana

Para verificar o efeito do condicionamento da superfície com BS na adesão bacteriana, as microplacas foram previamente tratadas com os agentes biossurfatantes, nas concentrações de 0,1% (m/v) para a surfactina e 0,4% (m/v) para o ramnolipídio. As microplacas foram em seguida incubadas por 24 h na temperatura em estudo e então o BS foi retirado. Os poços da microplaca foram lavados três vezes com água destilada estéril para remover o excesso de BS e depois de secos foram adicionados a estes 200 µL da suspensão bacteriana, então foi realizado o procedimento de coloração com cristal violeta, lavagem, solubilização com ácido acético e leitura da absorbância como descrito no item 4.7.

Este ensaio foi realizado para os microrganismos cultivados em três meios de cultura, TSYEA, ágar lactosado e ágar peptonado. O condicionamento e adesão das bactérias foram realizados a 35°C, 25°C e 4°C.

4.10 Caracterização físico-química das superfícies das células

Para avaliar a hidrofobicidade e as propriedades ácido-base de Lewis de cada espécie bacteriana, foi utilizado o teste MATS (microbial adhesion to solvents) que consiste em um método de partição que se baseia na comparação da afinidade da célula microbiana a um solvente polar e a outro apolar⁸⁴.

Os solventes utilizados foram clorofórmio e hexadecano, éter dietílico e hexano. Inicialmente suspensões bacterianas de concentrações entre 1×10^8 e $1 \times$

10^9 UFC mL⁻¹ foram preparadas em NaCl 0,15 M e as absorbâncias destas suspensões foram inicialmente medidas em 400 nm (Abs1).

Em seguida, 2,4 mL de cada suspensão foram misturados com 0,4 mL do solvente em estudo e submetidos à vortex máximo por 2 minutos, formando uma emulsão. Depois de observada a separação de fases (cerca de 15 minutos), a absorbância da fase aquosa foi medida (Abs2) e a adesão expressa como: % adesão = $(1 - \text{Abs2} / \text{Abs1}) \times 100^{43,84}$.

4.11 Medidas de ângulo de contato

Amostras de poliestireno cortadas na forma de quadrados de 2 cm x 2 cm foram inicialmente lavadas, para isso foram submetidas ao ultrassom com álcool etílico 95% por 10 minutos, enxaguadas e colocadas novamente em ultrassom com água e detergente por mais 10 minutos. Em seguida foram lavadas com água corrente, água destilada e deixadas secar em papel absorvente.

As amostras foram deixadas imersas em soluções de surfactina 0,1% e ramnolípídeo 0,4%, em temperatura ambiente por 24 h, lavadas com 10 mL de água e deixadas secar. Ao controle não foi realizado este tratamento. Sobre os quadrados foram então depositadas gotas de água de 16 µL e o ângulo entre esta e a superfície foi determinado utilizando-se o aparelho para medição de ângulos de contato OCA 15, no modo gota sésil a 20°C.

4.12 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de poliestireno foram cortadas em quadrados de 1 cm x 1 cm e lavadas da mesma forma descrita no item 4.11.

As amostras foram imersas em surfactina por 24 h a 4°C, lavadas com 10 mL de água e imersas em suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* por 4 h, em seguida as amostras foram lavadas com 10 mL de água.

As bactérias aderidas foram desidratadas através da imersão em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes, 10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, permanecendo 15 minutos em cada solução, e deixadas secar em estufa a 35°C por 12 h. As amostras foram recobertas com uma camada de cerca de 10 nm de ouro em um metalizador e examinadas em microscópio eletrônico de varredura, operando com feixe de elétrons de 20 kV.

4.13 Descarte do material

Todo o material descartável contendo bactérias patogênicas foi autoclavado a 121°C por 20 minutos, antes de ser descartado em lixo comum. O material não descartável foi deixado de molho em solução hipoclorito de sódio ou formaldeído (Lysoform) por 24 h antes de ser lavado.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média de três repetições independentes, com oito replicatas em cada experimento. A comparação entre as superfícies condicionadas e o controle foi feita através da análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o Software Origin 7.5. As barras de erro presentes nas Figuras representam o desvio padrão da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos microrganismos a serem estudados

Os ensaios de adesão foram todos realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços, esta técnica possibilitou a realização de várias replicatas do mesmo experimento, de forma simples e rápida.

Os resultados dos testes preliminares de adesão dos microrganismos (descritos no item 4.8) em superfície de poliestireno são mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Ensaio preliminar de adesão dos microrganismos em poliestireno.

A partir destes resultados, os microrganismos que apresentaram maior capacidade de aderência nas microplacas de poliestireno foram selecionados para os experimentos futuros, foram estes: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,

Serratia marcescens ATCC 8100, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19112.

5.2 Padronização do inóculo bacteriano

Selecionadas as bactérias de estudo, realizou-se a padronização do inóculo nos três meios de cultura estudados. Realizou-se o procedimento de contagem pelo método da gota, de forma a se relacionar o número de células viáveis com as medidas de absorbância a 610 nm para que estas fossem usadas como referência para os experimentos futuros realizados nas mesmas condições. Na Tabela 3 são listadas as concentrações obtidas.

Tabela 3 - Concentrações celulares (UFC/mL) obtidas para os cinco microrganismos, nos três meios de cultura

Microrganismo	Meio de cultura		
	TSYEA	ágar lactosado	ágar peptonado
<i>Micrococcus luteus</i>	$7,33 \times 10^9$ (1,28*)	$7,44 \times 10^9$ (0,94)	$1,35 \times 10^9$ (0,34)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,70 \times 10^{10}$ (1,63)	$1,89 \times 10^9$ (1,13)	$1,78 \times 10^9$ (0,40)
<i>Listeria monocytogenes</i>	$1,03 \times 10^{10}$ (0,37)	$2,01 \times 10^9$ (0,15)	$5,05 \times 10^8$ (0,05)
<i>Serratia marcescens</i>	$8,33 \times 10^9$ (1,01)	$1,69 \times 10^{10}$ (0,79)	$2,58 \times 10^{10}$ (0,64)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,35 \times 10^9$ (0,52)	$8,55 \times 10^9$ (0,51)	$1,055 \times 10^{10}$ (0,47)

*Valores de absorbância a 610 nm

No primeiro meio estudado, TSYEA, foram adicionados 10 mL de solução salina 0,86% para o preparo das suspensões, ao utilizar ágar lactosado e ágar peptonado, este volume foi diminuído para 6 mL, chegando a 4 mL para *Listeria monocytogenes* em ágar peptonado, em função da diminuição do crescimento dos microrganismos nestes meios quando comparados ao primeiro, esta correção nos

volumes foi feita de forma a tentar se obter uma concentração semelhante nas três condições.

A Figura 6 ilustra as placas referentes à contagem de *Staphylococcus aureus* nas diluições 10^{-5} e 10^{-6} utilizando-se o método da gota, nos três meios de cultura. Pode-se observar que o número de colônias presentes nas gotas da placa com meio TSYEA é maior que nos outros meios, sendo que na diluição 10^{-5} não é possível se distinguir colônias, diferente do observado em ágar lactosado e peptonado na mesma diluição, mesmo quando volume inferior de solução salina foi adicionado às placas.

Figura 6 - Contagem da cultura de *Staphylococcus aureus* pelo método da gota em: a) TSYEA, b) ágar lactosado, c) ágar peptonado.

5.3 Influência da temperatura e meios de cultura sobre a adesão das bactérias em poliestireno

Os resultados referentes aos ensaios de adesão das diferentes bactérias em diferentes meios e temperaturas são apresentados nas Figuras 7 a 11.

O estudo da influência da temperatura na adesão bacteriana foi realizado utilizando-se uma suspensão bacteriana e incubando-a em diferentes temperaturas, de forma a minimizar erros devido à preparação de diferentes suspensões.

A Figura 7 mostra a comparação entre a adesão de *Listeria monocytogenes* nas diferentes condições estudadas.

Figura 7 - Comparação da adesão de *Listeria monocytogenes* em diferentes meios e temperaturas.

Listeria monocytogenes apresentou uma adesão pronunciadamente maior quando cultivada em TSYEA, resposta esta em concordância com os resultados de

Dubravka *et al.*⁸⁵, que afirmaram que a produção de biofilmes por esta bactéria é maior em meios ricos em nutrientes. Os resultados de Hood e Zotolla (1997)⁸⁶ mostraram também uma alta produção de biofilme em TSB por *Listeria monocytogenes*, enquanto esta não cresceu em meio mais pobre em nutrientes.

No presente estudo, o meio TSYEA corresponde ao meio mais rico em nutrientes, enquanto os meios de ágar lactosado e peptonado são os mais pobres e de fato o ágar peptonado não proporcionou um bom crescimento para esta bactéria, que apresentou os menores valores de adesão quando cultivada neste meio (Figura 7). Assim a composição do meio parece influenciar na adesão de *Listeria monocytogenes* e, portanto na formação de biofilmes por esta bactéria.

A temperatura também influenciou na adesão desta bactéria ao poliestireno, apresentando os maiores valores a 35°C (Figura 7), o que concorda com os resultados de Dubravka *et al.*⁸⁵, que relataram que o decréscimo na temperatura de incubação resultou em um decréscimo na adesão de *Listeria monocytogenes*, obtendo seus maiores valores a 37°C em meio TSYEB, entretanto o tempo de incubação usado por este autor foi de 48 h.

Em baixas temperaturas de crescimento, a superfície da célula de *Listeria monocytogenes* se mostrou fortemente hidrofílica⁸⁵, sugerindo algumas modificações na composição de sua parede celular, o aumento da hidrofiliidade das células a baixas temperaturas torna a colonização de substratos hidrofóbicos como o poliestireno mais difícil⁸⁷.

Embora em nosso estudo tenha sido empregado sempre o inóculo crescido a 35°C, e então submetido à diferentes temperaturas por 4 h em solução salina, a temperatura de contato entre o microrganismo e a superfície influenciou na adesão.

Em ágar lactosado e ágar peptonado a adesão também foi maior a 35°C, porém menor em 25°C no primeiro e não apresentou diferença significativa na adesão entre 25°C e 4°C em ágar peptonado.

Os resultados do ensaio de adesão de *Staphylococcus aureus* nos três meios e três temperaturas utilizadas se encontram na Figura 8.

Figura 8 - Comparação da adesão de *Staphylococcus aureus* em diferentes meios e temperaturas.

Staphylococcus aureus também apresentou melhor crescimento e adesão quando cultivado no meio mais rico em nutrientes (TSYEA), sendo seu menor crescimento em ágar lactosado. A temperatura mostrou influenciar sua adesão de forma variável nos diferentes meios.

Em TSYEA, a adesão de *Staphylococcus aureus* mostrou diferença na temperatura de 35°C em relação à 25°C e 4°C, mas não houve uma diferença significativa entre estas. Em ágar lactosado a adesão a 35°C não diferiu significativamente da adesão a 25°C, mas ambas foram diferentes da adesão a 4°C,

a qual foi pronunciadamente menor (Fig 12). Em ágar peptonado, a adesão a 35°C e 25°C foram estatisticamente diferentes, mas estes valores individualmente não diferiram da adesão a 4°C.

Quando *Micrococcus luteus* foi avaliado nestas condições obtiveram-se os dados que se encontram na Figura 9.

Figura 9 - Comparação da adesão de *Micrococcus luteus* em diferentes meios e temperaturas.

Micrococcus luteus mostrou também os maiores valores de adesão quando cultivados em TSYEA e os menores em ágar peptonado, a variação em sua adesão com a temperatura se mostrou decrescente com o decréscimo da temperatura em TSYEA e variável nos outros meios. Em ágar lactosado, não houve diferença entre 35°C e 25°C, apenas a 4°C a adesão se apresentou significativamente maior (Fig.12). Em ágar peptonado a adesão não se mostrou significativamente influenciada pela temperatura.

Para *Pseudomonas aeruginosa* os resultados são mostrados na Figura 10.

Figura 10 - Comparação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes meios e temperaturas.

Pseudomonas aeruginosa apresentou um bom crescimento nos três meios (Tabela 3). Embora o número de células viáveis tenha sido semelhante nos três meios, a adesão se mostrou influenciada pela composição nutricional do meio de crescimento, sendo decrescente com o decréscimo de nutrientes disponíveis, apresentando a maior adesão quando cultivado em TSYEA e a menor em ágar peptonado, meio mais pobre nutricionalmente.

A temperatura de incubação mostrou influenciar fortemente a adesão, sendo, de forma geral, crescente com o decréscimo da temperatura em todos os meios estudados (Fig. 12).

Pseudomonas aeruginosa mostrou uma capacidade superior à dos outros microrganismos em aderir à superfície mantida a 4°C, indicando uma possível adaptação deste microrganismo às condições de baixa temperatura.

O comportamento adesivo de *Serratia marcescens* encontra-se na Figura 11.

Figura 11 - Comparação da adesão de *Serratia marcescens* em diferentes meios e temperaturas.

Comportamento inverso ao dos outros microrganismos foi observado por *Serratia marcescens*, que apresentou os menores valores de adesão quando cultivado em TSYEA. Os maiores valores de adesão foram obtidos a partir de crescimento em ágar lactosado, seguido pelo cultivo em ágar peptonado.

A temperatura não mostrou grande influência na adesão. Em ágar peptonado apenas a adesão a 35°C se mostrou diferente da adesão a 4°C, a adesão a 25°C não diferiu significativamente das outras temperaturas. Em ágar lactosado não houve diferença na adesão entre as temperaturas (Fig. 12) e em TSYEA houve uma pequena, porém significativa diferença na adesão, sendo que esta diminuiu com a redução da temperatura.

Os dados correspondentes às Figuras 9 a 11 encontram-se no apêndice A.

A Figura 12 ilustra as microplacas coradas correspondentes ao ensaio de adesão em ágar lactosado a 35°C e 4°C.

a

b

Figura 12 - Ensaio de adesão das bactérias cultivadas em ágar lactosado a) a 35°C; b) a 4°C.

As propriedades superficiais dos microrganismos dependem essencialmente da composição química de sua superfície celular, extremamente complexa devido à presença de vários componentes como lipídeos, lipopolissacarídeos, proteínas de membrana e apêndices como fímbrias e flagelos. Essa composição é influenciada

por condições ambientais, como temperatura e condições nutricionais e a alteração de tais condições pode modificar propriedades como carga superficial e a hidrofobicidade da bactéria, interferindo em sua adesão⁸⁸.

Buscando encontrar uma correlação entre a disponibilidade de nutrientes e o comportamento adesivo das bactérias estudadas, pôde-se observar que a maioria, exceto *Serratia marcescens*, apresentou uma adesão maior quando crescidas no meio mais rico em nutrientes, o TSYEA.

Muitos pesquisadores têm tentado relacionar a produção de biofilme com o meio de crescimento, sendo encontrada uma diversidade de resultados. Alguns autores afirmam que em alguns casos, meios com baixa concentração de nutrientes promovem um aumento na aderência, e, portanto, na formação de biofilmes, como afirmado por Stepanovic *et al.*⁸⁹ para *Salmonella* spp, mas neste mesmo estudo, foi verificado que *Listeria monocytogenes* apresentava maior formação de biofilmes quando crescia em meio mais rico em nutrientes.

Hood e Zottola⁸⁶ que estudaram a formação de biofilmes por cinco espécies de bactérias, concluíram que o meio que produzia a maior quantidade de biofilme era diferente para cada microrganismo testado.

Alguns estudos sugerem que bactérias de culturas crescidas em condições metabólicas ótimas têm um aumento na sua capacidade adesiva⁹⁰, o que foi também evidenciado em nosso estudo para quatro das cinco bactérias estudadas, exceto para *Serratia marcescens*.

Quanto à variação do comportamento adesivo das bactérias com a temperatura de contato, grande parte dos trabalhos indica mudanças na adesão de bactérias cultivadas sob diferentes temperaturas^{85,88}. Em nosso ensaio a

temperatura do cultivo foi de 35°C e o ensaio de adesão ocorreu em temperaturas variáveis, esta alteração foi suficiente para causar mudanças no comportamento adesivo das bactérias, provavelmente devido à resposta causada pelo stress provocado pela mudança de temperatura.

O stress induz a variações na síntese de alguns componentes celulares, principalmente proteínas, as causas do stress variam e incluem: valores extremos de temperaturas, pH, alta concentração salina, oxidantes, detergentes, álcool ou privação de nutrientes, e grande parte das bactérias desenvolvem mecanismos para resistir a estas condições⁹¹.

Phan-Thanh e Gormon⁹¹ submeteram *Listeria monocytogenes* a choque térmico em temperaturas entre 49°C e 4°C e em períodos que variaram de 15 min (para temperaturas altas) até 2 a 3 h (a 4°C). Detectaram que mais da metade das proteínas sintetizadas por este microrganismo a temperatura normal (25°C) foram suprimidas nestas condições de stress, ao mesmo tempo em que a síntese de um grande número de proteínas aumentou e novas proteínas foram sintetizadas.

Meylheuc, van Oss e Bellon-Fontaine⁴³ afirmaram também que o período de 2 h em que *Listeria monocytogenes* LO28 foi submetida à variação de temperatura, de 37°C (temperatura de crescimento) para 20°C (temperatura de adesão) foi suficiente para modificar características superficiais desta bactéria e, portanto interferir em sua adesão.

Considerando os estudos acima citados, o período de 4 h de incubação pode ser suficiente para induzir mudanças no perfil das proteínas capazes de modificar características superficiais das espécies, o que pode afetar seu comportamento

adesivo, sendo estas mudanças, variáveis conforme a bactéria e mais pronunciadas na variação entre 35°C e 4°C.

Além disso, a diminuição da temperatura pode diminuir o metabolismo microbiano, influenciar a motilidade e as forças atrativas que afetam a adesão.

A maioria das bactérias estudadas, quando cultivadas em TSYEA apresentou maior adesão a 35°C e menor adesão a 4°C, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentou maior adesão a 4°C em todas as condições nutricionais. Em ágar lactosado e ágar peptonado, esta variação se mostrou mais variável e menos pronunciada.

Ao se expandir estas observações para o ponto de vista prático, a redução da temperatura de superfícies suscetíveis à contaminação microbiana pode constituir uma alternativa para diminuir a contaminação causada por algumas bactérias, para isso, estudos mais detalhados acerca dos mecanismos envolvidos nesta redução da adesão bacteriana são necessários.

É interessante observar o comportamento da *P. aeruginosa*, que apresentou uma maior adesão quando submetida ao contato com superfície em baixa temperatura, indicando que o stress causado por essa variação de temperatura apresentou um efeito favorável em sua adesão sob essas condições. Este dado concorda com o fato de tratar-se de uma bactéria psicrófila, que se desenvolve bem em temperaturas de refrigeração, estando envolvida na deterioração de alimentos refrigerados⁹², o que é uma evidência da boa adaptação desse microrganismo a se desenvolver em ambientes sob baixa temperatura.

5.4 Efeito antiadesivo dos BS sobre microrganismos cultivados nos diferentes meios de cultura

5.4.1 Meio TSYEA

Foi realizado primeiramente, um estudo cinético para a determinação da atividade antiadesiva dos BS em função do tempo. As temperaturas de ensaio foram 35°C e 25°C e o meio de cultura TSYEA, composto por ágar tripticase de soja e extrato de levedura (Item 4.3), foi utilizado para o crescimento dos microrganismos.

As Figuras 13 e 14 mostram a cinética de adesão da *Listeria monocytogenes* durante 6 h a 35°C e a 25°C, respectivamente, em superfícies de poliestireno tratadas com surfactina 0,1%, ramnolípido 0,4% e não tratadas (controle).

Figura 13 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Listeria monocytogenes* a 35° C.

Figura 14 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Listeria monocytogenes* a 25° C.

Obtido este perfil cinético, o tempo de 4 h foi selecionado para a realização dos experimentos futuros, já que neste período de incubação, os microrganismos apresentaram uma boa aderência ao material, não apresentando grande aumento na adesão nas horas subseqüentes.

Foi então verificado o efeito antiadesivo da surfactina e do ramnolipídeo também a 4°C, mas apenas em um período fixo de 4 h de contato.

Na Tabela 4 são apresentados os valores de absorbância média das bactérias aderidas na microplaca sem tratamento (controle) e submetidas a tratamento de 24 h com surfactina e ramnolipídeo a 35°C, 25°C e 4°C, depois de 4 h de contato entre a superfície e a suspensão. A temperatura de adesão foi sempre igual à temperatura de condicionamento da superfície, se o condicionamento foi feito a 4°C, por exemplo, o ensaio de adesão também foi realizado nesta temperatura.

A partir da diferença entre os valores médios de absorbância do controle e das superfícies condicionadas com os BS, foi calculada a porcentagem de redução da adesão bacteriana em cada condição, estes valores encontram-se também na Tabela 4. A Figura 15 ilustra a comparação entre a adesão de *Listeria monocytogenes* nas superfícies tratadas nas três temperaturas de estudo.

Tabela 4 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Listeria monocytogenes* cultivada em meio TSYEA

<i>Listeria monocytogenes</i> (em TSYEA)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle	35°C	0,421*	0,020	
Surfactina		0,265*	0,021	36,83
Ramnolípídeo		0,331 *	0,035	21,25
Controle	25°C	0,413*	0,035	
Surfactina		0,221*	0,031	46,44
Ramnolípídeo		0,386	0,026	6,50
Controle	4°C	0,294*	0,033	
Surfactina		0,101*	0,022	65,82
Ramnolípídeo		0,277	0,030	5,79

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Os resultados demonstram uma redução significativa quando a surfactina foi utilizada para condicionar a superfície, obtendo-se a maior inibição na adesão quando o condicionamento foi realizado a 4°C (65% de inibição na adesão).

O ramnolípídeo alcançou uma inibição significativa na adesão de *Listeria monocytogenes* apenas no ensaio de adesão a 35°C dentre as condições analisadas.

Figura 15 - Comparação da adesão de *Listeria monocytogenes* (cultivada em TSYEA) em poliestireno condicionado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Os resultados dos testes de adesão nas microplacas para o *Staphylococcus aureus*, são ilustrados nas Figuras 16, 17 e 18 e mostrados na Tabela 5.

Figura 16 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Staphylococcus aureus* a 35°C.

Figura 17 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Staphylococcus aureus* a 25 °C.

Tabela 5 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Staphylococcus aureus* cultivado em meio TSYEA

<i>Staphylococcus aureus</i> (em TSYEA)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle	35°C	0,396*	0,029	
Surfactina		0,229 *	0,033	42,02
Ramnolipídeo		0,312 *	0,032	21,18
Controle	25°C	0,419*	0,029	
Surfactina		0,185 *	0,030	55,99
Ramnolipídeo		0,328 *	0,032	21,72
Controle	4°C	0,351*	0,037	
Surfactina		0,122 *	0,020	66,02
Ramnolipídeo		0,293 *	0,029	16,62

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 18 - Comparação da adesão de *Staphylococcus aureus* (cultivado em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

A adesão de *Staphylococcus aureus* foi reduzida em 66% quando surfactina foi utilizada no tratamento das microplacas a 4°C, sendo também significativa nas outras temperaturas e sempre superior à inibição provocada pelo ramnolípido.

A Figura 19 ilustra o ensaio de adesão de *S. aureus* nas microplacas tratadas com os BS e o controle. A intensidade da coloração reflete a maior adesão bacteriana.

Figura 19 - Ensaio de adesão *Staphylococcus aureus* em microplacas de polistireno condicionada a 4°C com surfactina e ramnolípido.

Da mesma forma, os resultados destes ensaios para o *Micrococcus luteus* encontram-se nas Figuras 20, 21 e 22 e na Tabela 6.

Figura 20 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Micrococcus luteus* a 35°C.

Figura 21 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Micrococcus luteus* a 25°C.

Tabela 6 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Micrococcus luteus* cultivado em meio TSYEA

<i>Micrococcus luteus</i> (em TSYEA)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle Surfactina Ramnolipídeo	35°C	0,623*	0,023	
		0,412*	0,021	33,92
		0,674*	0,031	-8,15
Controle Surfactina Ramnolipídeo	25°C	0,404*	0,023	
		0,216*	0,019	46,47
		0,445 *	0,012	-10,07
Controle Surfactina Ramnolipídeo	4°C	0,157*	0,019	
		0,058*	0,010	62,92
		0,193*	0,017	-22,67

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 22 - Comparação da adesão de *Micrococcus luteus* (cultivado em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Micrococcus luteus apresentou inibição significativa na adesão em todas as temperaturas estudadas quando a superfície foi tratada com surfactina, sendo o melhor resultado obtido a 4°C (62% de redução). Para este microrganismo, o condicionamento da superfície com ramnolipídeo ocasionou um leve aumento na

adesão. A Figura 23 ilustra o ensaio de cinética de adesão na microplaca tratada com surfactina a 25°C.

Figura 23 - Ensaio de adesão *Micrococcus luteus* em microplacas de polistireno condicionada com surfactina.

Controle colunas ímpares e surfactina colunas pares.

Para a *Pseudomonas aeruginosa* nas mesmas condições, os resultados são mostrados nas Figuras 24, 25 e 26 e na Tabela 7.

Figura 24 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Pseudomonas aeruginosa* a 35°C.

Figura 25 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Pseudomonas aeruginosa* a 25°C.

Tabela 7 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em meio TSYEA

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (em TSYEA)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
35°C				
Controle		0,374*	0,032	
Surfactina		0,546 *	0,038	-45,96
Ramnolipídeo		0,557 *	0,038	-48,82
25°C				
Controle		0,406*	0,026	
Surfactina		0,462 *	0,040	-13,64
Ramnolipídeo		0,475 *	0,039	-17,03
4°C				
Controle		0,498	0,035	
Surfactina		0,504	0,035	-1,25
Ramnolipídeo		0,523	0,040	-4,95

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 26 - Comparação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* (cultivada em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Para *Pseudomonas aeruginosa* não foi observada redução na adesão com os tratamentos com BS em nenhuma das temperaturas estudadas, pelo contrário, o condicionamento com os BS provocou um aumento em sua adesão em 25 °C e principalmente a 35°C. A 4°C não foi observada diferença significativa na adesão.

Os resultados referentes à *Serratia marcescens* são mostrados nas Figuras 27, 28 e 29 e na Tabela 8.

Figura 27 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Serratia marcescens* a 35°C.

Figura 28 - Atividade antiadesiva dos BS sobre *Serratia marcescens* a 25°C.

Tabela 8 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Serratia marcescens* em meio TSYEA

<i>Serratia marcescens</i> (em TSYEA)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle Surfactina Ramnolipídeo	35°C	0,129 0,111 0,133	0,017 0,018 0,015	 14,12 -2,75
	25°C	0,122* 0,100* 0,126	0,014 0,017 0,018	 17,58 -3,33
	4°C	0,141* 0,111 * 0,149	0,013 0,014 0,019	 21,39 -5,95

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 29 - Comparação da adesão de *Serratia marcescens* (cultivada em TSYEA) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Os resultados de *Serratia marcescens* mostram uma redução significativa na adesão apenas quando a superfície foi condicionada com surfactina a 25°C e 4°C, e estas reduções são consideradas baixas quando comparadas às reduções

observadas para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*.

Os estudos de cinética de adesão dos microrganismos mostram que a aderência pode aumentar em função do tempo (*L. monocytogenes* e *M. luteus*), ou permanecer constante, (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*). De forma semelhante, Hood e Zottola⁸⁶ afirmaram que ao se avaliar variação da adesão bacteriana em um curto período de tempo (até 12 h), em alguns casos foi encontrado um aumento linear do número de células aderidas e em outros este número permaneceu constante.

5.4.2 Meio ágar lactosado

O segundo meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos foi o ágar lactosado, que apresenta em sua composição nutricional, lactose, peptona e extrato de carne (Item 4.3).

Os cinco microrganismos em estudo foram cultivados neste meio e suspensões feitas a partir de cada cultura foram colocadas em contato com a microplaca de poliestireno (tratadas com os BS) por 4 h.

Os resultados destes ensaios antiadesivos para a *Listeria monocytogenes* são mostrados na Tabela 9 e na Figura 30.

Tabela 9 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Listeria monocytogenes* em meio ágar lactosado

<i>Listeria monocytogenes</i> (em ágar lactosado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
35°C				
Controle		0,181*	0,024	
Surfactina		0,125*	0,019	31,02
Ramnolipídeo		0,171	0,023	5,61
25°C				
Controle		0,194*	0,024	
Surfactina		0,129 *	0,017	33,59
Ramnolipídeo		0,186	0,017	4,34
4°C				
Controle		0,124*	0,022	
Surfactina		0,073*	0,018	41,52
Ramnolipídeo		0,110	0,008	11,88

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 30 - Comparação da adesão de *Listeria monocytogenes* (cultivada em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Quando cultivada em ágar lactosado *Listeria monocytogenes* cresceu mais lentamente, com menor número de células viáveis para o mesmo período de incubação (Tabela 3). A inibição na adesão provocada pela surfactina foi menor

quando comparada com ao mesmo ensaio em TSYEA enquanto que o tratamento com ramnolípídeo não se mostrou significativo.

Para o *Staphylococcus aureus*, os resultados deste ensaio antiadesivo são mostrados na Tabela 10 e na Figura 31.

Tabela 10 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Staphylococcus aureus* em meio ágar lactosado

<i>Staphylococcus aureus</i> (em ágar lactosado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
35°C				
Controle		0,174*	0,024	
Surfactina		0,108*	0,022	37,85
Ramnolípídeo		0,131*	0,027	24,74
25°C				
Controle		0,171*	0,025	
Surfactina		0,093*	0,021	45,67
Ramnolípídeo		0,121*	0,026	29,17
4°C				
Controle		0,168*	0,025	
Surfactina		0,083*	0,027	50,43
Ramnolípídeo		0,124*	0,031	26,13

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 31 - Comparação da adesão de *Staphylococcus aureus* (cultivado em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

O crescimento de *Staphylococcus aureus* em ágar lactosado também se mostrou menor quando comparado com TSYEA em número de células viáveis (Tabela 3). O tratamento das superfícies com os BS foi capaz de inibir sua adesão em todas as temperaturas estudadas.

Ao cultivar *Micrococcus luteus* em ágar lactosado e realizar os experimentos de adesão em superfícies de poliestireno, os dados gerados foram os apresentados na Tabela 11 e na Figura 32.

Tabela 11 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Micrococcus luteus* em meio ágar lactosado

<i>Micrococcus luteus</i> (em ágar lactosado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
	35°C			
Controle		0,259*	0,026	
Surfactina		0,170*	0,020	34,21
Ramnolipídeo		0,324*	0,025	-25,35
	25°C			
Controle		0,248*	0,027	
Surfactina		0,170*	0,012	31,47
Ramnolipídeo		0,325*	0,021	-31,11
	4°C			
Controle		0,267*	0,024	
Surfactina		0,120*	0,022	55,02
Ramnolipídeo		0,363*	0,030	-35,84

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

No caso do *Micrococcus luteus*, apenas a surfactina apresentou resultados satisfatórios nas três temperaturas, chegando a inibir a adesão desta bactéria em 55% a 4°C. O ramnolipídeo provocou um aumento na adesão deste microrganismo nas microplacas, semelhante ao comportamento observado quando *M. luteus* foi cultivado em TSYEA.

Figura 32 - Comparação da adesão de *Micrococcus luteus* (cultivado em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

O perfil de adesão de *Pseudomonas aeruginosa* nas mesmas condições é mostrado na Tabela 12 e na Figura 33.

Tabela 12 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em meio ágar lactosado

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (em ágar lactosado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle Surfactina Ramnolipídeo	35°C	0,168	0,027	
		0,173	0,032	-3,35
		0,180	0,025	-7,07
Controle Surfactina Ramnolipídeo	25°C	0,181	0,027	
		0,178	0,026	2,08
		0,192	0,033	-5,30
Controle Surfactina Ramnolipídeo	4°C	0,441	0,030	
		0,455	0,027	-3,12
		0,452	0,033	-2,55

Figura 33 - Comparação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* (cultivado em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Não foi observada alteração significativa na adesão de *Pseudomonas aeruginosa* frente ao condicionamento das superfícies com ambos os BS e nas diferentes temperaturas, quando esta foi cultivada em ágar lactosado.

Os resultados correspondentes à *Serratia marcescens* encontram-se na Tabela 13 e são ilustrados na Figura 34.

Serratia marcescens cultivada em ágar lactosado apresentou maior inibição em sua adesão quando a superfície foi tratada com surfactina (31%, 42% e 45% a 35°C, 25°C e 4°C respectivamente) quando comparada à inibição exibida quando este mesmo tratamento foi efetuado nesta bactéria cultivada em TSYEA (a 35 °C não houve redução significativa e a 25°C e 4°C, 18% e 21% de redução na adesão respectivamente). Ao tratar a superfície com ramnolipídeo também não foi observada alteração significativa no comportamento adesivo deste microrganismo em poliestireno.

Tabela 13 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Serratia marcescens* em meio ágar lactosado

<i>Serratia marcescens</i> (em ágar lactosado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle Surfactina Ramnolipídeo	35°C	0,330*	0,029	
		0,229*	0,026	30,66
		0,340	0,013	-3,21
Controle Surfactina Ramnolipídeo	25°C	0,296*	0,024	
		0,174*	0,017	41,22
		0,312	0,025	-5,53
Controle Surfactina Ramnolipídeo	4°C	0,386*	0,028	
		0,214*	0,022	44,67
		0,371	0,020	3,76

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 34 - Comparação da adesão de *Serratia marcescens* (cultivada em ágar lactosado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

5.4.3 Meio ágar peptonado

O comportamento dos microrganismos foi também estudado quando estes foram submetidos a crescimento em ágar peptonado, meio de cultura que contém peptona, cloreto de sódio, hidrogenofosfato de sódio e dihidrogenofosfato de potássio (Item 2.4).

Listeria monocytogenes apresentou um crescimento inferior, não sendo obtida uma concentração de células viáveis equivalente à dos outros meios (Tabela 3). Além da dificuldade de crescimento desta bactéria em ágar peptonado, seus valores de adesão apresentaram-se bastante inferiores ao observados nos outros meios, como mostra a Tabela 14 e a Figura 35.

Tabela 14 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Listeria monocytogenes* em meio ágar peptonado

<i>Listeria monocytogenes</i> (em ágar peptonado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
	35°C			
Controle		0,073	0,028	
Surfactina		0,059	0,018	19,12
Ramnolípídeo		0,085	0,014	-15,10
	25°C			
Controle		0,063	0,016	
Surfactina		0,048	0,014	23,98
Ramnolípídeo		0,068	0,019	-8,88
	4°C			
Controle		0,054	0,022	
Surfactina		0,040	0,018	25,68
Ramnolípídeo		0,056	0,024	-4,21

Figura 35 - Comparação da adesão de *Listeria monocytogenes* (cultivada em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Através dos dados demonstrados na Figura 35, observa-se que não houve redução significativa na adesão de *L. monocytogenes* quando ágar peptonado foi usado como meio de cultivo.

Os resultados relativos ao *Staphylococcus aureus* são mostrados na Tabela 15 e Figura 36.

Staphylococcus aureus, uma das bactérias que apresentou melhor resposta antiadesiva aos tratamentos nos meios TSYEA e ágar lactosado quando cultivado em ágar peptonado, demonstrou valores de inibição na adesão inferiores em superfícies condicionadas com surfactina, 7%, 22% e 27% em 35°C, 25°C e 4°C, respectivamente enquanto em ágar lactosado os valores de redução foram 38%, 46% e 50% e em TSYEA 42%, 56% e 66% também para 35°C, 25°C e 4°C respectivamente. Com ramnolipídeo, redução significativa foi observada apenas a 4°C.

Tabela 15 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Staphylococcus aureus* em meio ágar peptonado

<i>Staphylococcus aureus</i> (em ágar peptonado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
35°C				
Controle		0,370*	0,030	
Surfactina		0,344*	0,030	6,93
Ramnolipídeo		0,379	0,035	-2,45
25°C				
Controle		0,309*	0,026	
Surfactina		0,242*	0,027	21,74
Ramnolipídeo		0,292	0,029	5,51
4°C				
Controle		0,273*	0,024	
Surfactina		0,200*	0,021	26,85
Ramnolipídeo		0,250*	0,026	8,23

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 36 - Comparação da adesão de *Staphylococcus aureus* (cultivado em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Os resultados correspondentes ao *Micrococcus luteus* encontram-se na Tabela 16 e na Figura 37.

Tabela 16 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Micrococcus luteus* em meio ágar peptonado

<i>Micrococcus luteus</i> (em ágar peptonado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle Surfactina Ramnolipídeo	35°C	0,295*	0,018	
		0,187*	0,015	36,69
		0,378*	0,026	-28,26
Controle Surfactina Ramnolipídeo	25°C	0,287*	0,023	
		0,196*	0,028	31,72
		0,389*	0,023	-35,58
Controle Surfactina Ramnolipídeo	4°C	0,386*	0,031	
		0,218*	0,028	43,68
		0,494*	0,023	-27,94

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 37 - Comparação da adesão de *Micrococcus luteus* (cultivado em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Em ágar peptonado, *Micrococcus luteus* apresentou um comportamento semelhante ao obtido nos outros dois meios, uma significativa redução com a utilização de surfactina, e um aumento com o uso de ramnolipídeo, sendo que a temperatura não exerceu grande influência neste comportamento entre 35°C e 25°C;

a 4°C, um aumento nos valores de inibição da adesão foram observados em todos os meios.

A Figura 38 ilustra a inibição na adesão de *M. luteus* provocada pela surfactina e seu aumento ocasionado pelo condicionamento da superfície com ramnolípídeo.

Figura 38 - Adesão de *Micrococcus luteus* em ágar peptonado a 4°C.

A primeira coluna corresponde ao controle, a segunda e a terceira aos tratamentos com surfactina e ramnolípídeo respectivamente.

A Tabela 17 e a Figura 39 mostram os resultados para *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em ágar peptonado.

Tabela 17 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em meio ágar peptonado

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (em ágar peptonado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle Surfactina Ramnolipídeo	35°C	0,154 0,143 0,162	0,018 0,018 0,018	 7,56 -5,13
	25°C	0,14* 0,126* 0,167*	0,018 0,026 0,024	 10,02 -18,93
	4°C	0,228* 0,133* 0,260*	0,029 0,030 0,026	 41,87 -13,96

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 39 - Comparação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* (cultivada em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Quando cultivada em ágar peptonado, *Pseudomonas aeruginosa*, que não respondeu de forma satisfatória aos tratamentos em TSYEA e ágar lactosado, mostrou uma significativa redução em seu comportamento adesivo em superfície condicionada com surfactina a 25°C e 4°C, embora nestas temperaturas também

tenha sido observado um aumento na adesão nas superfícies tratadas com ramnolípídeo.

A Figura 40 ilustra a comparação entre a adesão em poliestireno quando esta bactéria foi cultivada em ágar peptonado e em TSYEA; a segunda coluna, referente ao tratamento com surfactina aparece com coloração mais clara para *Pseudomonas aeruginosa* em ágar peptonado e mais escura quando este microrganismo é cultivado em TSYEA.

Figura 40 - Adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em a) ágar peptonado b) TSYEA.

Ao estudar a adesão da *Serratia marcescens* cultivada em ágar peptonado nas microplacas de poliestireno, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 18 e na Figura 41.

Tabela 18 - Efeito do condicionamento de superfícies de poliestireno sobre adesão de *Serratia marcescens* em meio ágar peptonado

<i>Serratia marcescens</i> (em ágar peptonado)				
Tratamento	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão	% Redução
Controle	35°C	0,322*	0,026	
Surfactina		0,231*	0,023	28,15
Ramnolipídeo		0,338	0,021	-4,87
Controle	25°C	0,403*	0,025	
Surfactina		0,316*	0,024	21,53
Ramnolipídeo		0,436*	0,027	-8,23
Controle	4°C	0,356*	0,028	
Surfactina		0,210*	0,024	40,95
Ramnolipídeo		0,363	0,030	-1,91

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 41 - Comparação da adesão de *Serratia marcescens* (cultivada em ágar peptonado) em poliestireno tratado com os BS a 35°C, 25°C e 4°C.

Em ágar peptonado, *Serratia marcescens* apresentou um comportamento semelhante ao mostrado quando crescia em ágar lactosado, ou seja, significativa redução na adesão à superfície condicionada com surfactina enquanto que a adesão

nas superfícies condicionadas com ramnolipídeo não foi influenciada, a não ser pelo leve aumento na adesão observada a 25°C.

Nota-se, pelos resultados apresentados, que a surfactina foi eficiente em quase todas as condições na inibição da adesão microbiana. Os maiores valores de inibição foram exibidos a 4°C quando os microrganismos eram cultivados em TSYEA. O ramnolipídeo mostrou um efeito variável de acordo com o microrganismo e a condição estudada, inibindo razoavelmente a adesão em poucos casos, em outros não apresentou alteração significativa ou chegou a aumentar a adesão de algumas bactérias (*M. luteus* e *P. aeruginosa*)

Visando determinar quais fatores estão influenciando as diferentes taxas de redução observadas, em relação aos microrganismos e do ponto de vista da superfície do material, testes de caracterização de ambos se tornam necessários. Assim, foram realizados testes de caracterização das superfícies de poliestireno, por medidas de ângulo de contato e caracterização das propriedades superficiais das células bacterianas, quando cultivadas sob diferentes condições nutricionais por meio do teste MATS.

5.5 Microscopia eletrônica de varredura

Para ilustrar o efeito antiadesivo da surfactina sobre de *Staphylococcus aureus* em poliestireno, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura, sendo que o condicionamento e a adesão foram realizados a 4°C. As imagens obtidas por MEV concordam com os resultados dos testes de adesão em microplaca, evidenciando-se a diferença na quantidade de microrganismos aderidos na

superfície referente ao controle e naquela que recebeu tratamento com surfactina (Figuras 42 e 43).

a

b

Figura 42 - Micrografias da adesão de *Staphylococcus aureus* em poliestireno com aumento de 5000 vezes a) controle b) superfície tratada com surfactina

a

b

Figura 43 - Micrografias da adesão de *Staphylococcus aureus* em poliestireno com aumento de 15000 vezes a) controle b) superfície tratada com surfactina

5.6 Caracterização físico-química das células bacterianas

O teste MATS foi utilizado para a avaliação das propriedades ácido-base e hidrofobicidade das superfícies das células de cada cultura bacteriana estudada e em cada meio de crescimento.

Duplas de solventes com componentes de tensão superficial de Lifshitz- van der Waals semelhantes foram utilizadas, são estas: clorofórmio, um solvente ácido e hexadecano, apolar, e éter, um solvente fortemente básico e hexano, também apolar.

Maior afinidade das células pelo clorofórmio indica que a superfície da célula tem propriedades básicas (ou seja, doadora de elétrons). A propriedade ácida (ou aceptora de elétrons) da superfície celular é expressa pela maior afinidade ao solvente básico (éter). O caráter básico pode resultar da presença de grupos carboxilatos na superfície do microrganismo. O caráter hidrofílico é relacionado com a alta concentração de polissacarídeos e a baixa concentração de hidrocarbonetos⁹³. A hidrofobicidade é avaliada pela maior afinidade das células bacterianas aos solventes apolares.

A porcentagem de células aderidas ao hexadecano foi usada para medir a hidrofobicidade da superfície celular. Segundo Chae *et al.*⁹⁴, a hidrofobicidade celular medida pela adesão ao hexadecano pode ser classificada em quatro grupos: Fortemente hidrofílica, quando menos de 10% das células aderem ao hexadecano; moderadamente hidrofílica, entre 10 e 29% de células ligadas ao hexadecano; moderadamente hidrofóbica, entre 30 e 54%, e fortemente hidrofóbica, mais de 55% das células com maior afinidade por hexadecano.

A importância das interações hidrofóbicas na adesão bacteriana se tornou evidente diante das observações de que muitas bactérias aderiam mais prontamente a substratos hidrofóbicos que hidrofílicos e do fato de muitas bactérias aderentes possuírem propriedades superficiais hidrofóbicas⁹⁵.

Sommer, Martin-Rouas e Mettler⁹⁶ mostraram que a hidrofobicidade da parede celular está relacionada com a adesão a substratos inertes, sendo que para superfícies hidrofóbicas, as interações hidrofóbicas são consideradas as principais forças envolvidas e, portanto a hidrofobicidade da parede celular exerce uma forte influência na adesão. Para superfícies hidrofílicas, interações eletrostáticas se mostraram dominantes e a carga da superfície bacteriana se torna mais importante que os outros fatores. Como neste estudo, todos os ensaios de adesão foram realizados em superfície hidrofóbica (poliestireno) e em alta força iônica (NaCl 0,15 M), que minimiza as possíveis atrações eletrostáticas, espera-se encontrar uma correlação entre a hidrofobicidade da célula bacteriana e sua adesão ao poliestireno.

Os resultados dos testes de adesão aos solventes para os microrganismos encontram-se na Tabela 19 para o meio de cultura TSYEA, na Tabela 20 para o ágar lactosado e na Tabela 21 para o ágar peptonado.

Tabela 19 - Teste de adesão a solventes em células bacterianas cultivadas em TSYEA

Microrganismo	% Adesão (TSYEA)			
	Clorofórmio	Hexadecano	Éter	Hexano
<i>L. monocytogenes</i>	83,75 ± 1,67	76,21 ± 4,82	19,25 ± 1,50	67,26 ± 2,78
<i>S.aureus</i>	96,98 ± 0,87	94,94 ± 1,65	44,46 ± 6,30	94,58 ± 3,53
<i>M. luteus</i>	91,87 ± 0,79	89,69 ± 2,00	47,79 ± 6,83	74,20 ± 3,2
<i>P. aeruginosa</i>	16,54 ± 3,37	4,12 ± 1,48	27,44 ± 1,89	2,92 ± 1,08
<i>S. marcescens</i>	50,90 ± 5,36	37,31 ± 4,11	40,92 ± 5,84	24,48 ± 4,17

Tabela 20 - Teste de adesão a solventes em células bacterianas cultivadas em ágar lactosado

Microrganismo	% Adesão (ágar lactosado)			
	Clorofórmio	Hexadecano	Éter	Hexano
<i>L. monocytogenes</i>	88,18 ± 1,73	81,57 ± 5,13	56,02 ± 4,07	75,06 ± 5,75
<i>S.aureus</i>	99,41 ± 0,16	97,77 ± 0,79	23,98 ± 3,86	93,33 ± 2,26
<i>M. luteus</i>	92,00 ± 1,40	88,28 ± 2,63	63,42 ± 2,19	81,73 ± 4,41
<i>P. aeruginosa</i>	41,08 ± 4,52	18,52 ± 3,24	39,04 ± 3,90	15,00 ± 1,31
<i>S. marcescens</i>	69,54 ± 4,58	76,05 ± 3,95	96,42 ± 0,98	56,91 ± 4,65

Tabela 21 - Teste de adesão a solventes em células bacterianas cultivadas em ágar peptonado

Microrganismo	% Adesão (agar peptonado)			
	Clorofórmio	Hexadecano	Éter	Hexano
<i>L. monocytogenes</i>	78,53 ± 3,08	55,29 ± 4,06	32,21 ± 2,13	54,62 ± 4,33
<i>S.aureus</i>	96,47 ± 0,77	93,99 ± 0,71	32,22 ± 4,75	76,90 ± 5,17
<i>M. luteus</i>	89,02 ± 0,85	81,68 ± 3,40	44,12 ± 4,15	54,62 ± 4,33
<i>P. aeruginosa</i>	75,77 ± 5,29	5,52 ± 2,49	47,36 ± 4,32	10,39 ± 4,74
<i>S. marcescens</i>	61,1 ± 4,56	86,78 ± 3,83	90,36 ± 4,82	55,42 ± 2,25

5.6.1 Discussão do comportamento adesivo de *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes em todas as condições apresentou maior afinidade por clorofórmio quando comparada ao hexadecano, indicando o predomínio de propriedades básicas ou doadora de elétrons de sua superfície celular, sendo esta propriedade maior em ágar peptonado, uma vez que a diferença de adesão no par clorofórmio-hexadecano foi maior.

Da mesma forma, pouca afinidade pelo solvente básico (éter) foi obtida em comparação ao solvente apolar associado, o hexano, sendo fracas suas propriedades ácidas ou aceptoras de elétrons, mas essas propriedades se tornaram mais pronunciadas quando cultivada em ágar lactosado.

Resultados semelhantes foram obtidos por Chavant *et al.*⁸⁷, que verificaram em *Listeria monocytogenes* LO28 uma aderência de cerca de 85% em clorofórmio e 80% em hexadecano, quando esta era cultivada a 37°C e se encontrava na fase estacionária de crescimento e meio rico em nutrientes, condição similar a deste

experimento, quando o microrganismo crescia em TSYEA, em que foi obtida adesão de 84% e 76% para clorofórmio e hexadecano respectivamente.

Quanto à hidrofobidade de sua superfície, *L. monocytogenes*, embora apresentasse superfície celular fortemente hidrofóbica, a menor hidrofobicidade foi verificada quando esta bactéria foi cultivada em ágar peptonado, o que contribui para explicar sua menor adesão em poliestireno, uma superfície hidrofóbica, nestas condições de crescimento. A adesão ao hexadecano não mostrou grande diferença quando este microrganismo foi cultivado em TSYEA ou ágar lactosado, embora a adesão ao poliestireno tenha sido superior quando TSYEA foi utilizado como meio de cultura.

5.6.2 Discussão do comportamento adesivo de *Staphylococcus aureus*

A maior afinidade por clorofórmio indica a predominância de propriedades básicas em *Staphylococcus aureus* quando cultivado nos três diferentes meios, sua superfície celular apresenta fraca característica ácida, evidenciada por sua baixa afinidade ao solvente básico em comparação com hexano, embora a adesão ao éter seja consideravelmente maior em TSYEA e menor em ágar lactosado.

Esta predominante característica doadora de elétrons em sua superfície foi também verificada por Hamadi e Latrache⁹⁷, que utilizaram para este teste a mesma linhagem ATCC 25923, utilizada neste estudo.

Este microrganismo apresenta forte caráter hidrofóbico em sua superfície, pois sua afinidade por hexadecano foi superior a 94% em todas as condições estudadas, assim a hidrofobicidade não é suficiente para explicar a diferença de

adesão deste microrganismo quando cultivado em diferentes condições nutricionais, sendo sua adesão maior quando em TSYEA e menor em ágar lactosado.

5.6.3 Discussão do comportamento adesivo de *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus também apresentou predominância de características básicas em sua superfície, e fracas propriedades ácidas, apresentando menor afinidade pelo éter quando comparado ao hexano e maior afinidade pelo clorofórmio em comparação ao hexadecano em todos os meios estudados. A adesão ao clorofórmio foi semelhante em todas as condições (aproximadamente 90%) e a adesão ao éter foi maior em ágar lactosado, indicando que neste meio as características ácidas de sua superfície celular são ligeiramente maiores.

Este microrganismo também foi classificado como fortemente hidrofóbico em todas as condições estudadas, entretanto a hidrofobicidade se mostrou ligeiramente menor em ágar peptonado, o que pode ser considerado um dos fatores que contribuem para a menor adesão deste microrganismo em poliestireno quando cultivado neste meio. A hidrofobicidade em TSYEA e ágar lactosado se mostrou semelhante (cerca de 89%).

5.6.4 Discussão do comportamento adesivo de *Pseudomonas aeruginosa*

Devido à sua baixa adesão ao hexadecano em TSYEA e ágar peptonado (4,12% e 5,52% respectivamente), *Pseudomonas aeruginosa* foi classificada como fortemente hidrofílica nestes meios e moderadamente hidrofílica em ágar lactosado (18,52%). Esta bactéria aderiu preferencialmente ao clorofórmio e ao éter quando

comparado aos solventes apolares, exibindo, portanto, características ácidas e básicas semelhantes, o que concorda com os resultados de Hamadi e Latrache⁹⁷, que utilizaram também a linhagem ATCC 27853, porém cultivada em ágar Luria Bertani e obtiveram propriedades ácidas e básicas similares para esta bactéria. Em nossos resultados, a maior semelhança nas propriedades ácidas e básicas ocorreu em ágar lactosado, em TSYEA as propriedades ácidas se destacaram levemente e em ágar peptonado houve predominância de características básicas.

5.6.5 Discussão do comportamento adesivo de *Serratia marcescens*

Quando cultivada em TSYEA, *Serratia marcescens* mostrou maior afinidade ao clorofórmio se comparada ao hexadecano e ao éter se comparada ao hexano, apresentando semelhantes propriedades ácidas e básicas. Em ágar lactosado e ágar peptonado, aderiu em maior proporção ao hexadecano e ao éter quando comparados com seus respectivos pares (clorofórmio e hexano) apresentando a predominância propriedades ácidas e fracas propriedades básicas.

Em TSYEA essa bactéria foi classificada como moderadamente hidrofóbica e nos outros dois meios fortemente hidrofóbica, o que pode explicar a menor adesão em poliestireno desta bactéria em TSYEA. Apesar da maior adesão em poliestireno ocorrer quando *S. marcescens* foi cultivada em ágar lactosado, sua hidrofobicidade se mostrou ligeiramente maior em ágar peptonado.

A hidrofobicidade desta bactéria pode ser relacionada com a produção de um pigmento vermelho, a prodigiosina, de característica apolar, havendo evidências de que sua produção aumentaria a hidrofobicidade das células⁹⁸. A produção deste pigmento por *Serratia marcescens* tem se mostrado influenciada pela composição

do meio de cultura. Segundo Song *et al.*⁹⁸, sua produção é aumentada em meio enriquecido com caseína, porém quando esta foi substituída pelo seu hidrolisado (contido no meio TSYEA), o pigmento raramente foi produzido, sugerindo que sua produção está associada com a atividade de caseína hidrolases na célula.

Da mesma forma, quando Solé *et al.*⁹⁹ cultivaram *Serratia marcescens* em ágar tripticase de soja, não foi observada a produção de pigmento. Quando meio de indução deste pigmento (contendo prolina) foi suplementado com vários açúcares, em alguns casos, foi observado efeito inibidor da produção de prodigiosina, por exemplo, na presença de glicose, enquanto a presença de lactose não inibiu esta produção⁹⁹.

A produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* foi observada preferencialmente em ágar lactosado e ágar peptonado, enquanto que em TSYEA pequena produção deste pigmento foi observada. Ao ser cultivada nos meios mais pobres nutricionalmente, *S. marcescens*, em resposta ao maior stress nutricional, provavelmente atingiu a fase estacionária de crescimento mais rapidamente, estimulando a produção de metabólitos secundários, como a prodigiosina⁹⁹.

Por ser um pigmento hidrofóbico, a produção de prodigiosina aumentaria a aderência do microrganismo em poliestireno, também hidrofóbico, o que concorda com as observações deste estudo. A Figura 44 ilustra as colônias de *S. marcescens* nos três meios de cultura, nota-se a maior intensidade do pigmento vermelho nos meios ágar lactosado e ágar peptonado.

Figura 44 - Colônias de *S. marcescens* cultivadas em: a) TSYEA; b) ágar lactosado; c) ágar peptonado.

5.7 Caracterização da superfície de poliestireno

O ângulo de contato com a água fornece informações sobre o grau de hidrofobicidade da superfície ou das células. Segundo Vogler¹⁰⁰, a amostra é considerada hidrofóbica quando o ângulo entre a superfície e a gota de água for maior que 65° e hidrofílica quando este ângulo for menor que 65°.

De acordo com este critério, a superfície de poliestireno estudada foi considerada hidrofóbica. Quando o poliestireno foi condicionado com surfactina, a superfície se tornou menos hidrofóbica (o ângulo de contato com a água diminuiu) e ao ser tratada com ramnolípídeo tornou-se ligeiramente mais hidrofóbica (houve um aumento no ângulo de contato com a água) quando comparadas com o controle (Tabela 22 e Figura 45).

Tabela 22 - Medidas de ângulos de contato entre as superfícies de poliestireno e a água

	Tratamento		
	Controle	Surfactina	Ramnolipídeo
Ângulo de contato (°)	81,65* $\pm$ 3,45	75,73* $\pm$ 2,99	84,43* $\pm$ 3,56

* Estatisticamente diferentes a $p = 0,05$

Figura 45 - Ângulos de contato entre a água e a superfície de poliestireno condicionada com: a) surfactina; b) controle; c) ramnolipídeo.

O condicionamento de superfícies hidrofóbicas como silicone, com biossurfatante de *Streptococcus thermophilus* A, reduziu a hidrofobicidade desta superfície⁴⁷, o que foi verificado por medidas de ângulo de contato. No estudo de Nitschke *et. al.*¹⁰¹, o condicionamento de superfície de polipropileno (também hidrofóbica) por surfactina e ramnolipídeo não mostrou alteração significativa nos ângulos de contato com a água, porém esta diferença se mostrou evidente com o condicionamento de aço inoxidável, que mostrou uma redução no ângulo de contato quando condicionado com surfactina e uma aumento ao utilizar ramnolipídeo, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Embora tenha sido observada uma alteração no ângulo de contato com a água depois das superfícies terem sido tratadas com os BS, essa alteração não foi suficiente para mudar a característica da superfície (hidrofóbica).

Apesar do tratamento com os BS não ter demonstrado grande variação em relação ao ângulo de contato entre a água e a superfície, observou-se a inibição da adesão de microrganismos nestas superfícies (principalmente com a surfactina), indicando que outros fatores podem estar envolvidos neste processo.

5.8 Discussão do comportamento antiadesivo dos BS

A atividade antiadesiva dos biossurfatantes contra vários patógenos (item 2.6.1) indica seu potencial para a utilização na proteção de biomateriais e compostos utilizados na indústria alimentícia. Entretanto os mecanismos envolvidos nesta atividade ainda não foram bem esclarecidos, sendo dependentes das propriedades do biossurfatante, da bactéria e da superfície⁴⁴.

Segundo Rodrigues *et al.*¹⁷, os agentes surfatantes reduzem as interações hidrofóbicas e assim, reduzem a adesão microbiana a superfícies. Substratos hidrofóbicos são preferencialmente colonizados por microrganismos, possivelmente pela maior facilidade em remover a camada de água que envolve tanto a bactéria quanto a superfície, facilitando o contato entre estes e, portanto a adesão. Se esta superfície for condicionada com um biossurfatante que a torna mais hidrofílica, a adesão se tornaria dificultada e assim, menor.

Para Walencka *et al.*⁴⁴, a maneira pela qual os biossurfatantes influenciam as interações bactéria-superfície estão mais relacionadas com mudanças na tensão superficial e carga da superfície celular bacteriana. Estes fatores são muito

importantes na superação da repulsão eletrostática inicial entre o microrganismo e o substrato. Surfatantes devem afetar ambos, interações célula-célula e célula-superfície.

Também Walenka *et al.*⁴⁴, avaliaram a influência de BS produzido por *Lactobacillus acidophilus* na hidrofobicidade da superfície celular de *S. aureus* e *S. epidermidis*. O primeiro mostrou uma diminuição em sua hidrofobicidade após co-incubação com o BS por 1 dia a 37°C, mas *S. epidermidis* não mostrou alteração na hidrofobicidade celular.

Em nosso estudo, acredita-se que a hidrofobicidade da célula não tenha sofrido alteração significativa a ponto de influenciar sua adesão, já que as células não foram colocadas em contato direto com os BS. As superfícies de poliestireno sofreram condicionamento de 24 h com os BS, que foram então retirados, a superfície lavada para a retirada de seu excesso e então colocada em contato com os microrganismos. Portanto, as alterações provocadas pelo condicionamento da superfície com os BS ocorreram provavelmente nas características da superfície do material.

Como a maior redução na adesão ocorreu com *S. aureus*, caracterizado como sendo altamente hidrofóbico e a redução na hidrofobicidade da superfície, relacionada com a diferença entre os ângulos de contato com a água não foram tão pronunciados, outros fatores podem estar envolvidos nesta inibição, tais como repulsão eletrostática. Esta repulsão pode ser dependente da maneira pela qual as moléculas de BS estão organizadas na superfície do material, este pode ter a parte polar voltada para o exterior e a parte apolar em contato com o poliestireno, o que provocaria certa repulsão eletrostática quando a célula bacteriana (também com

carga negativa) se aproximasse desta superfície condicionada. Além disso, deve ser considerado o fato dos BS formarem agregados micelares, pois a concentração dos BS utilizados foi acima da CMC.

Alterações físico-químicas da superfície, tais como carga ou propriedades ácido-base, poderiam ser evidenciadas através de medidas de ângulo de contato entre o material e três solventes: água, formamida e α -bromonaftaleno e a aplicação do modelo matemático proposto por van Oss³⁹. Por esse modelo um aumento na carga negativa do material poderia ser indiciado pelo aumento em suas propriedades básicas. Entretanto, em nosso estudo foi efetuada apenas a medida do ângulo de contato com a água.

A variação no ângulo de contato nos forneceu uma evidência de decréscimo na hidrofobicidade da superfície com o uso da surfactina, contribuindo para explicar a diminuição das interações hidrofóbicas, mas a diferença na hidrofobicidade da superfície é pequena quando comparada à grande inibição na adesão observada, sugerindo que outros fatores estejam envolvidos, como possivelmente, o carácter ácido-base da superfície, a presença de fímbrias e flagelo ou a produção de EPS pelos microrganismos⁹⁴.

A surfactina mostrou uma eficiência bastante superior ao ramnolipídeo, fato que foi descrito também por outros autores.

Segundo Mireles, Toguchi e Harshey⁴⁶, a surfactina apresentou grande eficiência na inibição da formação de biofilmes em cateteres por *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, enquanto o ramnolipídeo foi o menos eficiente entre os surfatantes testados (100 μ g de surfactina, 0,25% de Tween 80, 100 μ g de ramnolipídeo e 0,2% de SDS).

Rodrigues *et al.*¹⁰² investigaram o efeito de biossurfatantes produzidos por bactérias probióticas (*Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A) e de ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129. Os resultados mostraram que o ramnolípídeo foi o menos eficiente no decréscimo da adesão inicial (4 h de contato) de vários microrganismos em próteses de voz de silicone.

A utilização de ramnolípídeo no condicionamento do poliestireno foi capaz de inibir da adesão de *S. aureus* e *L. monocytogenes* em algumas condições. Entretanto, observou-se o aumento na adesão de *M. luteus*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens* em algumas condições e a adesão não foi influenciada em outras. O pequeno aumento no ângulo de contato com a água pode auxiliar na explicação deste comportamento, o pequeno aumento da hidrofobicidade da superfície pode ter ocasionado aumento nas interações hidrofóbicas entre alguns microrganismos e o substrato e não ter influenciado significativamente essas interações em outros.

A surfactina foi eficiente na redução da adesão de quase todos os microrganismos testados, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*, que mostrou uma redução significativa na adesão apenas quando cultivada em ágar peptonado. Da mesma forma, Mireles, Toguchi e Harshey⁴⁶ afirmaram que biofilmes formados por esta bactéria não foram afetados pela surfactina e sugerem que a alteração na hidrofiliabilidade da superfície de contato possa constituir em um modo de conter esse microrganismo, pois verificaram que *Pseudomonas aeruginosa* não formou biofilmes em superfície hidrofílica de vidro nas condições por este grupo testadas⁴⁶.

P. aeruginosa foi o microrganismo que mostrou o maior caráter hidrofílico e as menores respostas aos tratamentos, sendo que estes fatores podem estar relacionados. Provavelmente, a inibição da adesão pode ocorrer pela diminuição

das interações hidrofóbicas entre célula-superfície, o caráter hidrofílico de *P. aeruginosa* pode indicar que seu mecanismo de adesão é diferente daquele apresentado pelos demais microrganismos, não majoritariamente movido por interações hidrofóbicas.

Além disso, esta bactéria apresentou uma redução significativa na adesão quando cultivada em ágar peptonado (40% a 4°C), e pelos valores do teste MATS nota-se que neste meio foi observado o maior caráter básico de sua superfície (76% de adesão em clorofórmio, contra 16% em TSYEA e 41% em ágar lactosado). Da mesma forma, os microrganismos que apresentaram as maiores reduções na adesão apresentaram também forte caráter básico. As bactérias Gram-positivas foram as que apresentaram as maiores propriedades básicas.

O caráter básico pode ser resultante da presença de grupos carboxilatos presentes na superfície do microrganismo, sendo que esses grupos apresentam carga negativa em pH neutro. Considerando que a surfactina é um biossurfatante de caráter aniônico e que a maior redução na adesão foi observada nos microrganismos que apresentaram as maiores propriedades básicas, sugere-se que esta maior redução no comportamento adesivo possa ser resultante de uma maior repulsão eletrostática.

Quanto aos diferentes resultados obtidos ao utilizar surfactina e ramnolipídeo no condicionamento das superfícies, inúmeros fatores podem ter contribuído para essa diferença, pois embora os dois BS sejam aniônicos, estes pertencem a diferentes classes de biossurfatantes (lipopeptídeos e glicolipídeos), possuindo, portanto, composição química distinta. Além disto, a orientação das moléculas

quando adsorvidas na superfície pode ser diferente, assim como suas propriedades superficiais e pureza¹⁰¹.

Mesmo quando se utiliza o mesmo tipo de biossurfatante, pode haver diferença entre os resultados, pois a composição dos homólogos pode ser diferente, influenciando em suas propriedades.

Foi observada maior suscetibilidade das espécies Gram-positivas (*S.aureus*, *L. monocytogenes* e *M. luteus*) ao efeito antiadesivo da surfactina, quando comparada às espécies Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *S. marcescens*). Enquanto *P. aeruginosa* não reduziu sua adesão na maioria das condições estudadas, *S. marcescens*, apresentou uma redução de cerca de 20% em TSYEA, enquanto nesta mesma condição, as bactérias Gram-positivas chegaram a reduzir a adesão em cerca de 65%.

Em ágar lactosado a suscetibilidade de *S. marcescens* se torna mais próxima daquela exibida pelas bactérias Gram-positivas, sugerindo que seu pigmento possa estar envolvido no efeito observado. A presença do pigmento tornou a célula mais hidrofóbica (Tabelas 20 e 21) o que pode ter aumentado a contribuição de interações hidrofóbicas entre bactéria-superfície. Ao condicionar a superfície com surfactina, houve redução de sua hidrofobicidade e conseqüentemente pode ter ocorrido a diminuição de interações hidrofóbicas que resultaram na maior redução na adesão de *S. marcescens*.

Sotirova *et al.*¹⁰³ demonstraram que ao colocar ramnolípídeo em contato direto com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as Gram-positivas apresentaram maior suscetibilidade à ação de ramnolípídeo, uma vez que a membrana externa das bactérias Gram-negativas agiria como uma barreira à

penetração do BS; essa barreira foi atribuída principalmente à presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa. No nosso caso, apesar de não haver esse contato direto com o BS, a diferença na composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas parece ter influenciado de alguma forma a inibição provocada pela surfactina, talvez esse fato possa ser associado ao maior caráter básico exibido por essas bactérias, como discutido anteriormente. O ramnolipídeo mostrou-se eficaz apenas em algumas condições sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes*, ambas Gram-positivas.

Rivardo *et al.*⁴⁹ verificaram que o recobrimento de superfícies de poliestireno com dois BS promoveu uma ação antiadesiva específica frente a *E. coli* CFT073 e *S. aureus* ATCC 29213. Segundo este, o BS produzido por *B. licheniformis* V9T14 reduziu em 97% a formação de biofilme pela bactéria Gram-negativa, enquanto foi ineficiente para a Gram-positiva, de maneira inversa o BS produzido por *B. subtilis* V19T21 diminuiu em 90% a formação de biofilme pela espécie Gram-positiva, não exercendo influência na formação de biofilme pela espécie Gram-negativa. A especificidade do biossurfatante produzido por *B. subtilis* na inibição de bactérias Gram-positivas concorda com os resultados de nosso estudo, pois, embora a ação antiadesiva da surfactina não tenha sido específica para as bactérias Gram-positivas, se mostrou mais pronunciada nestes casos.

Quanto à maior redução na adesão da maioria dos microrganismos ter sido obtida na temperatura de 4°C, é interessante notar que a temperatura de condicionamento das superfícies utilizada por Rodrigues *et al.*^{17,47} é também de 4°C, em vários estudos deste grupo. Provavelmente esta melhor resposta antiadesiva em baixa temperatura pode ser associada a um aumento no número de moléculas de

biossurfatante adsorvidas na superfície, já que o aumento na temperatura de adsorção de um sistema irá geralmente diminuir a adsorção de surfactantes iônicos¹⁰⁴.

5.9 Principais resultados

- O meio de cultura exerceu influência na adesão dos microrganismos estudados, sendo que a maioria (exceto *S. marcescens*) apresentou maior adesão em TSYEA, meio mais rico em nutrientes.
- A temperatura influenciou a adesão ao poliestireno, sendo esta em geral menor a 4°C e maior a 35°C, apenas *P. aeruginosa* mostrou maior adesão a 4°C em todos os meios avaliados.
- Dentre os BS testados, a surfactina apresentou maior atividade antiadesiva.
- Os microrganismos Gram-positivos, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *M. luteus* apresentaram maior suscetibilidade à atividade antiadesiva da surfactina, sendo que em TSYEA foram obtidos os maiores valores de redução na adesão destes microrganismos, na faixa de 63% a 66% a 4°C.
- O ramnolípídeo foi capaz de reduzir a adesão de *S. aureus* quando cultivado em TSYEA e em ágar lactosado em todas as temperaturas, em ágar peptonado a 4°C e de *L. monocytogenes* no primeiro meio, mas apenas a 35°C.
- Os melhores resultados de inibição na adesão microbiana foram obtidos quando o condicionamento e a adesão foram realizados a 4°C.
- O tratamento da superfície com surfactina modificou o ângulo de contato com a água de 82° para 76°, reduzindo a hidrofobicidade, enquanto que para o

ramnolipídeo, os valores foram de 82° para 84°, ou seja, aumentando a hidrofobicidade.

- O teste de adesão a solventes e o ângulo de contato foram ferramentas que permitiram determinar algumas características envolvidas na atividade antiadesiva observada quando a superfície de poliestireno foi condicionada com os BS. Entretanto, esses parâmetros não foram suficientes para explicar o comportamento dos microrganismos frente a todas as condições testadas.
- As bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes*, *S. aureus* e *M. luteus*) apresentaram forte hidrofobicidade em sua superfície celular e a predominância de propriedades básicas.
- *P. aeruginosa*, foi o único microrganismo a apresentar propriedades majoritariamente hidrofílicas em todas as condições, a predominância de características básicas foi observada somente quando esta bactéria foi cultivada em ágar peptonado, única condição em que foi observada suscetibilidade à atividade antiadesiva da surfactina.
- *S. marcescens* apresentou maior hidrofobicidade em ágar lactosado e peptonado (possivelmente pela presença de prodigiosina), características ácidas e básicas semelhantes em TSYEA e predominante ácidas nos outros meios.

5.10 Considerações finais

Ao tentar relacionar a hidrofobicidade celular de cada microrganismo quando crescidos sob diferentes condições nutricionais, com o comportamento adesivo nas mesmas condições, pouca correlação pode ser encontrada. Somente em alguns casos foi possível relacionar o aumento da hidrofobicidade com o aumento da adesão do microrganismo em poliestireno, entretanto, sabe-se que outros fatores, tais como carga superficial, a presença de fímbrias, flagelo, o pH, força iônica ou EPS podem estar envolvidos no processo de adesão. Conseqüentemente existe uma grande dificuldade de se fazer predições sobre o comportamento adesivo dos microrganismos baseados em apenas algumas características celulares, dificuldade esta descrita também por muitos outros autores, mesmo com a análise de mais fatores envolvidos no processo^{93,105}.

Entretanto, é de extrema importância que as propriedades superficiais e adesivas dos microrganismos continuem a ser estudadas, pois a adesão bacteriana, que precede o desenvolvimento de biofilmes, é responsável por inúmeros problemas em vários setores industriais e médicos, e embora haja uma grande diversidade de resultados, estes só nos fazem lembrar a complexidade do processo de adesão microbiana e formação de biofilmes. Os resultados mostrados neste trabalho demonstram claramente que para cada microrganismo existe um comportamento adesivo e uma resposta antiadesiva específica, o que torna muito difícil a generalização do comportamento destes, sendo necessários estudos complementares com cada microrganismo, para que se possa futuramente associar a atividade antiadesiva de cada BS com cada situação particular.

Resultados interessantes foram observados com relação ao efeito da variação da temperatura na adesão e resposta antiadesiva apresentada pelos microrganismos estudados. A maioria apresentou menor adesão a 4°C (principalmente em meio rico em nutrientes) e maior resposta antiadesiva também nesta temperatura. Estas observações podem auxiliar o controle de microrganismos indesejáveis, variando-se a temperatura do material ou a temperatura de seu condicionamento.

6 CONCLUSÃO

O condicionamento de superfícies sólidas com biossurfatantes comprovou ser uma alternativa de reduzir a adesão de microrganismos. A surfactina apresentou um excelente potencial para ser utilizada como agente inibidor da adesão de vários patógenos de importância alimentar e médica, destacando a potencialidade do uso industrial desta classe de compostos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos presentes resultados, torna-se evidente que os BS são uma alternativa viável para inibição da adesão de microrganismos patogênicos em superfícies, entretanto um estudo mais detalhado acerca dos mecanismos dessa inibição bem como dos fatores envolvidos na adesão de cada microrganismo ainda é necessário.

Sugere-se que sejam estudados para cada espécie bacteriana, além das propriedades ácido-base de Lewis e hidrofobicidade acessadas pelo teste MATS, a produção de polissacarídeos pela quantificação de açúcares totais, e a presença de apêndices celulares como fímbrias e flagelo e a carga elétrica bruta da célula através da mobilidade eletroforética. Além disso, uma caracterização da energia superficial do sólido envolvido na adesão, por meio de modelo matemático de van Oss é também sugerida.

A realização do teste MATS com os microrganismos submetidos a crescimento a 35°C e adesão durante 4 h em diferentes temperaturas, seria interessante para avaliar se ocorreram mudanças nas propriedades superficiais das bactérias neste período.

Como a surfactina mostrou-se bastante eficaz, estudar outros tipos de surfactina, frente a outros microrganismos e superfícies, de forma a avaliar a extensão de sua atividade antiadesiva.

Sugere-se ainda que um estudo com uma espécie de microrganismo e uma superfície utilizando as análises descritas acima, poderia fornecer mais argumentos para explicar a adesão de determinado organismo em determinado material. Feita estas caracterizações, as condições (meios de cultura ou temperatura) poderiam ser

variadas, separadamente, e a avaliação das alterações provocadas individualmente, seriam realizadas. Dessa forma talvez seja possível entender melhor este complexo processo que é a adesão microbiana, tornando-se mais fácil o desenvolvimento de estratégias para evitá-la.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEHROTRA, M.D.A. Bacterial biofilms. **Pediatric Asthma, Allergy & Immunology**, v. 20, n. 3, p. 191-195, 2007.
2. DONLAN, R.M.; COSTERON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
3. DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/02-0063htm>>. Acesso em: 10 jul. 2008.
4. STOODLEY, L.H.; COSTERON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.
5. ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v. 46, n. 1 p. 39-56, 1943.
6. HEUKELEKIAN, H.; HELLER, A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. **Journal of Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 547-558, 1940.
7. COSTERON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86-95, 1978.
8. LINDSAY, D.; HOLY, A. What food professionals should know about bacterial biofilms. **British Food Journal**, v. 108, n. 1, p. 27-37, 2006.
9. COSTERON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.
10. JOHNSON, L.R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 251, p. 24-34, 2008.
11. BOWER, C.K.; DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 33-44, 1999.
12. HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.
13. PALMER, R.J.; WHITE, D.C. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 435-440, 1997.

14. DUNNE, M.W. See any good biofilm lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.
15. MACEDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. Águas & Águas. **Revista Fármacos e Medicamentos**, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2000.
16. BOWER, C.K.; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.
17. RODRIGUES, L.R.; BANAT, M.I.; 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.
18. SIMÕES, L.C.; SIMÕES, M.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J. Potencial of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47 p. 174-183, 2007.
19. KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.
20. SCHEMBRI, M.A.; GIVSKOV, M.; KLEMM, P. An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. **Science's STKE**, 2002. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/2002/132/re6>>. Acesso em: 20 ago. 2008.
21. SCHACHTER, B. Slimy business – the biotechnology of biofilms. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 361-365, 2003.
22. SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3-9, 2001.
23. STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.
24. VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54881-54886, 2004.
25. LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 2006.
26. NADELL, C.D.; XAVIER, J.B.; LEVIN, S.A.; FOSTER, K.R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 171-179, 2008.

27. BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. In: ALLISON, D. G.; GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; WILSON, M. **Community structure and co-operation in biofilms**. New York: Cambridge University Press, 2000. p. 25-36.
28. GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.
29. STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
30. PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 577-588, 2007.
31. SAUER, K.; CAMPER, A.K.; EHRLICH, G.D.; COSTERON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 1140-1154, 2002.
32. FAILLE, C.; JULLIEN, C.; BELLON-FONTAINE, M.N.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 728-738, 2002.
33. BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A. CONTER, M.; LANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2007.
34. MARSHALL, P.A.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.
35. BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 165-173, 1987.
36. KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.
37. HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 14, p. 105-119, 1999.

38. VAN OSS, C.J. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. **Journal of Molecular Recognition**, v. 16, p.177-190, 2003.
39. VAN OSS, C.J.; CHAUDHURY, M.K.; GOOD, R.J. Interfacial Lifshitz-van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. **Chemical Reviews**, v. 88, p. 927-941, 1988.
40. LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: SARVIER, 2002. p. 69.
41. GOULTER, R.M.; GENTLE, I.R.; DYKES, G.A. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. **Letters in Applied Microbiology**, 2009. In press.
42. AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 30, p. 141-152, 1997.
43. MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C.J.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 822-832, 2001.
44. MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
45. SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potencial biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2008.
46. NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
47. NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.O. Biosurfactants in Food Industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.
48. COSTA, S.G.V.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, C. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 34-38, 2008.
49. NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *B. subtilis* in cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-596, 2004.
50. NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Cassava Flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 106, p. 295-302, 2003.

51. ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.
52. WALENCKA, E.; RÓZALSKA, S.; SADOWSKA, B.; RÓZALSKA, B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. **Folia Microbiologica**, v. 53, n. 1, p. 61-66, 2008.
53. BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA, M.R.J.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.
54. VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin produced by *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, p. 289-297, 1997.
55. VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 44-49, 1997.
56. JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **The Journal of the American Chemical Society**, v.71, n. 12, p. 4124-4126, 1949.
57. NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005.
58. MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.
59. MEYLHEUC, T.; METHIVIER, C.; RENAULT, M.; HENRRY, J.M.; PRADIER, C.M.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 128-137, 2006.
60. MIRELES, J.R.; 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.

61. RODRIGUES, L.; VAN DER MEI, H.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 102-112, 2006.
62. IRIE, Y.; O'TOLLE, G.A.; YUK, M.H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p. 237-243, 2005.
63. RIVARDO, F.; TURNER, R.J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M.G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009. In press.
64. BREMER, P.J.; FLETCHER, G.C.; OSBORN, C. *Staphylococcus aureus*. **Crop & Food Research**, 2004. Disponível em: <http://www.crop.cri.nz/home/research/marine/pathogens/staphylococcus.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2008.
65. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 317-322.
66. LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M.; *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
67. MACK, D.; BECKER, P.; CHATTERJEE, I.; DOBINSKY, S.; KNOBLOCH, J.K.M.; PETERS, G.; ROHDE, H.; HERRMANN, M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. **International Journal of Molecular Microbiology**, v. 294, p. 203-212, 2004.
68. WALDVOGEL, F.A.; BISNO, A.L. **Infections associated with indwelling medical devices**. 3.ed. Washington: Copyrighted Material, 2000. p. 74-79.
69. CHEN, B.Y.; KIM, T.J.; JUNG, Y.S.; SILVA, J.L. Attachment strength of *Listeria monocytogenes* and its internalin-negative mutants. **Food Biophysics**, v. 3, p. 329-332, 2008.
70. LIU, L.; O'CONNER, P.O.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1059-1066, 2008.
71. TRESSE, O.; SHANNON, K. ; PINON, A.; MALLE, P.; VIALETTE, M.; MIDELET-BOURDIN, G. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1569-1578, 2007.

72. MAI, T.L.; CONNER, D. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3 p. 282-286, 2007.
73. KAYSER, F.H. Bacteria as Human Pathogens. In: KAYSER, F.H; BIENZ, K.A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R.M. **Medical Microbiology**. New York: Thieme, 2005. p. 229-345.
74. FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I.; HAAS, V.J. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 7-11, 2007.
75. MOREAU-MARQUIS, S.; STANTON, B.A.; O'TOOLE, G.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, p. 595-599, 2008.
76. GREENBLATT, C.L. *Micrococcus luteus* - Survival in Amber. **Microbial Ecology**, v. 48, p. 120-127, 2004.
77. KEEP, N.H.; WARD, J.M.; COHEN-GONSAUD, M.; HENDERSON, B. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. **TRENDS in Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 271-276, 2006.
78. ALTUNTAS, F. Catheter-related bacteremia due to *Kocuria rosea* in a patient undergoing peripheral blood stem cell transplantation. **BMC Infectious Diseases**, 2004. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/4/62>>. Acesso em: 20 ago. 2008.
79. SONG, M.J. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 157-161, 2006.
80. VASCONCELOS, F.F. Perfil de resistência da bactéria da espécie *Serratia marcescens* isolada de infecções hospitalares no hospital geral de fortaleza. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 38, n. 1, p. 35-37, 2006.
81. MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.
82. NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.112, p. 163-172, 2004.
83. NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.; 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.

84. BELLON-FONTAINE, M.N.; RAULT, J.; VAN OSS, C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 7, p. 47-53, 1996.
85. DUBRAVKA, M.; RUZICA, A.; MISIC, D.; BRANKA, V.; RATAJAC, R. Investigation of biofilm formation in vitro ability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from animals. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 57, n. 5-6, p. 429-440, 2007.
86. HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.
87. CHAVANT, P.; MARTINIE, B.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.N.; HEBRAUDI, M. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 728-737, 2002.
88. HEMERY, G.; CHEVALIER, S.; BELLON-FONTAINE, M.N.; HARAS, D.; ORANGE, N. Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 49-54, 2007.
89. STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* ssp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.
90. HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless-steel surfaces at various temperatures and pH values. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 5, p. 1549-1562, 1988.
91. PHAN-THANH, L.; GORMON, T. Analysis of cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 16, p. 444-450, 1995.
92. FRANCO, B.D.G.M. Importância dos microrganismos nos alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 7.
93. 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. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.
94. CHAE, M.S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, v. 23, p. 250-259, 2006.

95. PAUL, J.H.; JEFREY, W.H. The effect of surfactants on the attachment of estuarine and marine bacteria to surfaces. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p. 224-228, 1984.
96. SOMMER, P.; MARTIN-ROUAS, C.; METTLER, E. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. **Food Microbiology**, v.16, p. 503-505, 1999.
97. HAMADI, F.; LATRACHE, H. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 134-139, 2008.
98. SONG, M.J.; BAE, J.; LEE, D.S.; KIM, C.H.; KIM, J.S.; KIM, S.W.; HONG, S.I. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 157-161, 2006.
99. SOLE, M.; FRANCIA, A.; RIUS, N.; LORÉN, J.G. The role of pH in the 'glucose effect' on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 81-84, 1997.
100. VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.
101. NITSCHKE, M.; ARAÚJO, L.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 surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 241-247, 2009.
102. RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 81, n. 2, p. 358-370, 2007.
103. SOTIROVA, A.V.; SPASOVA, D.I.; GALABOVA, D.N.; KARPENKO, E.; SHULGA, A. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, v. 56, p. 639-644, 2008.
104. MYERS, D. **Surfactant Science and Technology**. 3.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006, p. 337-349.
105. LI, J.; McLANDSBOROUGH L.A., The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 185-193, 1999.

APÊNDICE A

Tabela 23 - Comparação da adesão de *Listeria monocytogenes* em diferentes meios e temperaturas.

<i>Listeria monocytogenes</i>			
Meio de cultura	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão
TSYEA	35°C	0,554 ^a	0,032
	25°C	0,493 ^b	0,034
	4°C	0,354 ^c	0,031
Ágar lactosado	35°C	0,207 ^a	0,028
	25°C	0,140 ^b	0,021
	4°C	0,167 ^c	0,018
Ágar peptonado	35°C	0,071 ^a	0,019
	25°C	0,038 ^b	0,012
	4°C	0,039 ^b	0,015

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (p=0,05)

Tabela 24 - Comparação da adesão de *Staphylococcus aureus* em diferentes meios e temperaturas

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Meio de cultura	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão
TSYEA	35°C	0,437 ^a	0,040
	25°C	0,404 ^b	0,040
	4°C	0,390 ^b	0,043
Ágar lactosado	35°C	0,241 ^a	0,026
	25°C	0,223 ^a	0,020
	4°C	0,123 ^b	0,012
Ágar peptonado	35°C	0,273 ^a	0,026
	25°C	0,319 ^b	0,035
	4°C	0,294 ^{ab}	0,037

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (p=0,05)

Tabela 25 - Comparação da adesão de *Micrococcus luteus* em diferentes meios e temperaturas

<i>Micrococcus luteus</i>			
Meio de cultura	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão
TSYEA	35°C	0,692 ^a	0,028
	25°C	0,548 ^b	0,034
	4°C	0,417 ^c	0,036
Ágar lactosado	35°C	0,347 ^a	0,034
	25°C	0,372 ^a	0,041
	4°C	0,480 ^b	0,039
Ágar peptonado	35°C	0,218 ^a	0,032
	25°C	0,243 ^a	0,031
	4°C	0,222 ^a	0,033

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (p=0,05)

Tabela 26 - Comparação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes meios e temperaturas

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Meio de cultura	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão
TSYEA	35°C	0,672 ^a	0,054
	25°C	0,546 ^b	0,047
	4°C	0,750 ^c	0,034
Ágar lactosado	35°C	0,238 ^a	0,025
	25°C	0,341 ^b	0,023
	4°C	0,512 ^c	0,037
Ágar peptonado	35°C	0,144 ^a	0,019
	25°C	0,114 ^b	0,021
	4°C	0,223 ^c	0,019

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (p=0,05)

Tabela 27 - Comparação da adesão de *Serratia marcescens* em diferentes meios e temperaturas

<i>Serratia marcescens</i>			
Meio de cultura	Temperatura	Abs média	Desvio Padrão
TSYEA	35°C	0,299 ^a	0,031
	25°C	0,273 ^b	0,030
	4°C	0,227 ^c	0,033
Ágar lactosado	35°C	0,480 ^a	0,029
	25°C	0,506 ^a	0,036
	4°C	0,509 ^a	0,038
Ágar peptonado	35°C	0,327 ^a	0,032
	25°C	0,343 ^{ab}	0,037
	4°C	0,362 ^b	0,032

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (p=0,05)