Estevão Alan Vieira

Ação antimicrobiana de ramnolipídeos sobre células sésseis e planctônicas de *Staphylococcus aureus*: efeito do pH

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

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

São Carlos
2018

RESUMO

Intoxicações alimentares são uma das causas mais significativas de mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo as contaminações bacterianas as responsáveis pela maioria dos casos. Dentre elas destacam-se as causadas por espécies de *Staphylococcus*, que são nocivas tanto pela infecção do organismo hospedeiro, quanto pela intoxicação por enterotoxinas termoestáveis presentes em alimentos contaminados e mal acondicionados. Além disso, a capacidade de *S. aureus* formarem biofilmes confere maior proteção contra agentes de controle. Neste contexto, torna-se importante desenvolver novos métodos visando inibir estes agentes patogênicos. Uma alternativa ao emprego de conservantes sintéticos é a utilização de biossurfatantes, como os ramnolipídeos (RL) que, além de apresentarem alta estabilidade a temperatura, pH e concentração salina, apresentam baixa toxicidade e são biodegradáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH na atividade antimicrobiana dos RL sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095) e comparar seu efeito ao do dodecil sulfato de sódio (SDS). Os resultados mostraram que o pH exerce grande influência na ação dos surfatantes, sendo mais efetiva em valores de pH menores. Em pH 5, os RL apresentaram ação bactericida (CBM=19,5 mg L⁻¹) superior ao SDS (CBM=39,1 mg L⁻¹), sendo capazes de inibir e remover 80% dos biofilmes em concentrações de 156,2 mg L⁻¹ e reduzir em cerca de 40 % a hidrofobicidade da superfície celular de *S. aureus*. Em valores de pH maiores a ação dos RL não superou a do SDS, porém estes ainda mostraram resultados promissores, principalmente na remoção de biofilmes evidenciado pela microscopia confocal. A espectroscopia FTIR revelou que quando em pH 6, 7 e 8 *S. aureus*, possivelmente, induz alterações em sua membrana celular a fim de diminuir a sensibilidade aos surfatantes. As imagens de MEV mostraram que os RL promovem deformações nas células, podendo levá-las a ruptura. O aumento da força iônica, promovido pela adição de NaCl no meio, favoreceu a ação antimicrobiana dos RL, o que torna a aplicação dos RL em alimentos bastante promissora.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, biofilmes, biossurfatantes, ramnolipídeos, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Food poisoning can be considered one of the most significant causes of mortality in developed and developing countries with bacterial contamination being responsible for the majority of cases. Among them are those caused by *Staphylococcus* species that can be harmful, both from the infection of the host organism as the intoxication by thermostable enterotoxins present in contaminated and poorly conditioned food. In addition, the ability to form biofilms gives *S. aureus* greater protection against control agents. Under this context, it becomes important to develop new methods to inhibit those pathogens. An alternative to the use of synthetic preservatives are biosurfactants such as rhamnolipids (RL), which shows high stability to temperature, pH and salt concentration along with the fact that they have low toxicity and are biodegradable. The aim of this study was to evaluate the effect of pH on the antimicrobial activity of RL on planktonic and sessile *Staphylococcus aureus* cells (ATCC 8095) and compare its effect to that of the sodium dodecyl sulfate (SDS). The results showed that pH exerts a great influence on the action of surfactants, with greater effectiveness at lower pH. At pH 5, RL presented higher bactericidal action (CBM = 19.5 mg L⁻¹) than SDS (CBM = 39.1 mg L⁻¹), also being able to inhibit and remove 80% of biofilms at concentrations of 156.2 mg L⁻¹ and reduce the hydrophobicity of *S. aureus* cell surface by about 40%. At higher pH values, the action of RL did not exceed that of SDS, nevertheless they showed promising results, mainly on the removal of biofilms evidenced by confocal microscopy. FTIR spectroscopy revealed that at pH 6, 7 and 8, *S. aureus* possibly induces changes in its cell membrane in order to decrease the sensitivity to surfactants. The MEV images showed that the RL cause deformations in the cells, which can lead to rupture. The increase in ionic strength, promoted by the addition of NaCl in the medium, favored the antimicrobial action of RL, which makes the application of RL in foods very promising.

Keywords: antimicrobial activity, biofilms, biosurfactants, rhamnolipids, *Staphylococcus aureus*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pela oportunidade concedida;

A Capes pelo apoio financeiro;

A Prof. Dr^a Marcia Nitschke pela orientação e solicitude prestada;

Aos técnicos do laboratório Marília Milanetto e João Pedro por todo o auxílio oferecido;

Aos amigos do grupo de Biotecnologia Microbiana: Jakeline Ferreira, Debora Mayer, Crisiane Marangon, Paula Bertuso, Rafael Sardeli, Paulo Lisboa, João Fabri, Drusila Veloso, Pedro Marcondes e Marília Milanetto pelos momentos agradáveis juntos, por toda a ajuda e por cada tubo de ensaio emprestado;

Ao grupo de Química Inorgânica Estrutural e Biológica e ao Prof. Dr. Victor Deflon pela disposição do equipamento de FTIR para realização de análises;

Ao departamento de Engenharia de Materiais e ao técnico Wagner Correr pela realização das análises de MEV;

Ao Instituto de Física de São Carlos e ao técnico Sebastião pela realização das análises de microscopia confocal;

Aos familiares pela confiança e incentivo;

minha gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de células de <i>S. aureus</i> capturada por microscopia eletrônica.	<u>1646</u>
Figura 2 - Ilustração esquemática da formação de biofilmes.	<u>2020</u>
Figura 3 - Representação da estrutura química do dodecilsulfato de sódio.	<u>2124</u>
Figura 4 - Representação da estrutura química dos RL. A) mono-ramnolípido (α -L-ramnopiranosil- β -hydroxidecanoil- β -hydroxidecanoato e B) di-ramnolípido (α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hydroxidecanoil- β -hydroxidecanoato).	<u>2323</u>
Figura 5 - Ensaio time kill de <i>S. aureus</i> sob ação de RL e SDS em pH 5.	<u>4243</u>
Figura 6 - Ensaio time kill de <i>S. aureus</i> sob ação de RL e SDS em pH 6.	<u>4344</u>
Figura 7 - Ensaio time kill de <i>S. aureus</i> sob ação de RL e SDS em pH 7.	<u>4545</u>
Figura 8 - Ensaio time kill de <i>S. aureus</i> sob ação de RL e SDS em pH 8.	<u>4645</u>
Figura 9 - Representação esquemática das formas de adsorção de surfatantes na superfície celular (a. abaixo da CMC, b. acima da CMC).	<u>5049</u>
Figura 10 - Ilustração representativa da conversão sensível ao pH de agregados de RL.	<u>5150</u>
Figura 11 - Atividade dos surfatantes sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> em pH 5 (a. inibição da formação, b. redução de células viáveis).	<u>5251</u>
Figura 12 - Atividade dos surfatantes sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> em pH 6 (a. inibição da formação, b. redução de células viáveis).	<u>5352</u>
Figura 13 - Redução de células viáveis de biofilmes de <i>S. aureus</i> após tratamento com surfatantes em a. pH 7 e b. pH 8.	<u>5352</u>
Figura 14 - Imagens de microscopia confocal mostrando a ação dos RL na inibição da formação de biofilmes de <i>S. aureus</i> em pH 5, 6 e 7.	<u>5655</u>
Figura 15 - Imagens de microscopia confocal mostrando a ação dos RL na remoção de biofilmes de <i>S. aureus</i> em pH 5, 6 e 7.	<u>5756</u>
Figura 16 - Espectros de FTIR de <i>S. aureus</i> em pH 5, 6, 7 e 8 (imagem inferior com enfoque nas bandas de lipídeos de membrana).	<u>6059</u>
Figura 17 - Ilustração das alterações que podem ocorrer na membrana plasmática bacteriana a fim de aumentar sua rigidez. Em a) aumento do número de saturações, e em b) aumento do comprimento das cadeias dos ácidos graxos dos fosfolipídeos de membrana.	<u>6463</u>

Figura 18 - Imagens de MEV de <i>S. aureus</i> cultivados em pH 5, 6 e 7 sem a presença de surfatantes (setas em branco indicam células no processo de divisão e em amarelo indicam células recém fissionadas).	<u>6766</u>
Figura 19 - Imagem de MEV de <i>S. aureus</i> em pH 5 tratadas com SDS em 5000 mg L ⁻¹	<u>6867</u>
Figura 20 - Imagem de MEV de <i>S. aureus</i> em pH 5 tratadas com RL em 9,8 mg L ⁻¹ . (setas em branco indicando a presença de material particulado e setas em amarelo indicando células com morfologia anormal).	<u>6968</u>
Figura 21- Imagens de MEV indicando as principais alterações morfológicas de células de <i>S. aureus</i> submetidas ao tratamento com RL 9,8 mg L ⁻¹ em pH 5 (a, alteração na fissão das células filhas e b, alteração no anel periférico de divisão) (setas em branco indicando comportamento anômalo).	<u>7069</u>
Figura 22 - Imagens de MEV de <i>S. aureus</i> comparando amostras controle e amostras tratadas com concentrações subletais de RL em pH 5, 6 e 7.....	<u>7274</u>
Figura 23 - Imagem de MEV de <i>S. aureus</i> em pH 5 tratadas com RL em 19,5 mg L ⁻¹	<u>7472</u>
Figura 24 - Imagem de MEV de <i>S. aureus</i> em pH 7 tratadas com RL em 5000 mg L ⁻¹	<u>7573</u>
Figura 25 - Imagem de MEV de <i>S. aureus</i> em pH 6 tratadas com RL em 39,1 mg L ⁻¹ (setas em branco indicando material particulado e setas em amarelo indicando rompimento celular).....	<u>7674</u>
Figura 26 - Imagens de MEV de <i>S. aureus</i> em pH 5 e 6 tratadas com RL em 5000 mg L ⁻¹	<u>7775</u>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CIM e CBM de RL e SDS sobre *S. aureus* em diferentes valores de pH. 40~~41~~

Tabela 2 - Valores de CIM e CBM dos RL na presença de NaCl em diferentes concentrações. 41~~42~~

Tabela 3 - Alteração no percentual hidrofóbico da superfície celular após tratamento com os surfatantes. 49~~48~~

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura Americana);

CBM – concentração bactericida mínima;

CIM – concentração inibitória mínima;

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute;

CLSM – *confocal laser scanning microscopy* (microscopia confocal de varredura a laser);

CMC – concentração micelar crítica;

DMSO – dimetilsulfóxido;

DO – densidade ótica;

DTA – doenças transmitida por alimentos;

EPS – exopolissacarídeos ou *extracellular polymeric substances*,

FTIR – Fourier transform infrared (infravermelho com transformada de Fourier);

HSC – hidrofobicidade da superfície celular;

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry;

MEV – microscopia eletrônica de varredura;

MSCRAMM - microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (componentes da superfície microbiana reconhecedores de moléculas adesivas da matriz);

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;

pH – potencial hidrogeniônico

PIA – polimeric intercellular adhesin (adesina polimérica intercelular);

PNAG - N-acetilglucosamina polimérica;

PTFE – politetrafluoroetileno;

RL – ramnolipídeos (diRL: di-ramnolipídeo e monoRL: mono-ramnolipídeo);

SDS – dodecil sulfato de sódio;

TSYEA – tryptone soya yeast extract Agar (ágar triptona de soja e extrato de levedura);

TSYEB – tryptone soya yeast extract broth (caldo triptona de soja e extrato de levedura);

UFC – unidade formadora de colônias;

UV-Vis – ultravioleta – visível.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1242
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1545
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1545
2.2 Biofilmes	1848
2.3 Ramnolipídeos (RL) e dodecilsulfato de sódio (SDS).....	2124
2.4 Mecanismos de ação de agentes antimicrobianos de aplicação industrial	2424
2.5 Hidrofobicidade da superfície celular (HSC).....	2626
2.6 Técnicas que auxiliam na elucidação do mecanismo de ação dos surfatantes	2727
2.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	2727
2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	2929
2.6.3 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).....	3030
3 OBJETIVOS.....	3132
3.1 Objetivos específicos.....	3132
4 METODOLOGIA	3233
4.1 Microrganismos e meios de cultura	3233
4.2 Padronização do inóculo	3233
4.3 Ramnolipídeos (RL).....	3233
4.4 Dodecil sulfato de sódio (SDS).....	3334
4.5 Avaliação da atividade dos surfatantes em células planctônicas	3334
4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	3334
4.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	3435
4.5.3 Curva de sobrevivência (ensaio <i>time kill</i>)	3435
4.5.4 Determinação da hidrofobicidade da superfície celular	3536
4.6 Avaliação da atividade dos surfatantes em biofilmes de <i>S. aureus</i>	3637

4.6.1 Inibição da formação de biofilmes	<u>3637</u>
4.6.2 Redução de viabilidade celular em biofilmes pré-formados	<u>3638</u>
4.6.3 Microscopia confocal de varredura a laser	<u>3738</u>
4.7 Investigação do mecanismo antimicrobiano	<u>3839</u>
4.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho	<u>3839</u>
4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	<u>3840</u>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	<u>4041</u>
5.1 Atividade antibacteriana em células planctônicas	<u>4041</u>
5.1.1 Determinação da CIM e CBM.....	<u>4041</u>
5.1.2 Ensaio <i>time kill</i>	<u>4142</u>
5.1.3 Determinação da hidrofobicidade da superfície celular	<u>4847</u>
5.2 Atividade antibacteriana em células sésseis	<u>5251</u>
5.2.1 Inibição da formação de biofilmes e redução de células viáveis em biofilmes pré-formados	<u>5251</u>
5.2.2 Microscopia confocal	<u>5453</u>
5.3 Investigação do mecanismo de ação.....	<u>5857</u>
5.4 Microscopia eletrônica de varredura	<u>6665</u>
6 CONCLUSÃO	<u>7977</u>
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	<u>8078</u>
8 REFERÊNCIAS	<u>8179</u>

1 INTRODUÇÃO

Intoxicações alimentares são foco de grande preocupação no âmbito da saúde pública, podendo ser consideradas uma das mais significativas causas de morbimortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BEHRMAN et al., 1995). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) 600 milhões de pessoas no mundo adoecem por doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo que destes, 420 mil morrem a cada ano.

Contaminações bacterianas são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicações alimentares (KARRARAS, 2000). Dentre elas se destacam as causadas pelas espécies do gênero *Staphylococcus*. Esse gênero de bactéria apresenta a característica de produzir enterotoxinas que são termoestáveis dificultando sua eliminação. Uma vez contaminado por essas toxinas, o alimento, se ingerido, pode causar uma série de complicações gastrointestinais podendo evoluir para quadros mais severos (SANTOS et al., 2007).

Além de serem nocivos via intoxicação, *S. aureus* também são responsáveis por causarem infecções devido a sua capacidade de multiplicação e disseminação nos tecidos do hospedeiro. Estas infecções podem ser simples como espinhas e furúnculos, ou até mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia (SANTOS et al., 2007).

Os mecanismos de patogenicidade atribuídos à *S. aureus* estão relacionados aos seus fatores de virulência que podem ser toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à parede celular ou excretadas pelas células; que atuam contra as defesas do hospedeiro favorecendo a colonização dos tecidos infectados (CUNHA; CUNHA, 2007).

Um dos fatores que favorece a virulência de *S. aureus* é a formação de biofilmes. Biofilmes podem ser definidos como uma comunidade microbiana composta por células que podem estar aderidas à um substrato, à uma interface ou umas às outras, envoltas por uma matriz de polímero extracelular. Tais células, nesta forma, exibem um fenótipo alterado no que se refere ao crescimento, à expressão gênica e à produção de proteínas (DONLAN; CONSTERTON, 2002). Estas estruturas conferem vantagens aos microrganismos por fornecer-lhes certo nível de proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e ação de antimicrobianos (DONLAN; CONSTERTON, 2002; BOWER; DAESCHEL, 1999).

Neste contexto, nota-se a importância de serem desenvolvidas novas tecnologias para o controle desses agentes patogênicos, tanto na forma planctônica, como em formações mais complexas como os biofilmes.

Além da preocupação com a contaminação de alimentos, os consumidores passaram a se preocupar cada vez mais com a presença de aditivos artificiais incorporados nos alimentos (IBRAHIM; YANG, 2008). Os biossurfatantes surgiram como uma importante ferramenta para inovação e sustentabilidade, preenchendo a atual demanda do mercado; pois, além de apresentarem baixa toxicidade e serem biodegradáveis, são produzidos a partir de substratos renováveis, o que corrobora com os princípios da química verde (MULLIGAN et al., 2014)

Uma ampla variedade de biossurfatantes vem demonstrando atividade antimicrobiana, porém, atualmente a classe mais promissora é a dos ramnolipídeos (RL) produzidos por *P. aeruginosa*. Os RL são considerados seguros para consumo; e seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos foi aprovado pela *U.S. Environmental Protection Agency* (NITSCHKE; COSTA, 2007). Devido a suas propriedades tensoativas e emulsificantes, os RL apresentam grande versatilidade e por isso vem sendo considerados ingredientes multi-propósito para a indústria alimentícia (NITSCHKE; SILVA, 2017).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos RL ainda não foi elucidado completamente, porém, por se tratar de moléculas com poder tensoativo, sabe-se que exercem ação sobre as membranas celulares (ARAÚJO et al., 2013).

O pH do meio exerce grande influência no crescimento e viabilidade de células microbianas. Cada espécie apresenta um intervalo de pH ótimo para seu crescimento, sendo o de 6,5 a 7,5 para a grande maioria das bactérias, porém *S. aureus*, podem continuar viáveis em um intervalo que varia de 4 a 9,8 (FRANCO, 2008). Neste intervalo, propício ao desenvolvimento de *S. aureus*, enquadram-se os alimentos classificados como de baixa acidez: carnes e derivados, peixes, leite, ovos e a maioria dos vegetais (RAY, 2000), os mais frequentemente contaminados pelo patógeno.

Apesar da grande importância do pH no desenvolvimento bacteriano, pouco se sabe sobre a influência deste fator intrínseco sobre a atividade antimicrobiana dos RL. Visando aplicação futura, o trabalho contribuiu na investigação da influência do pH na ação antimicrobiana dos RL sobre células planctônicas e biofilmes de *S. aureus*; assim como na comparação de sua eficácia antimicrobiana com o surfatante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foi primeiramente relatado por Robert Koch no ano de 1878 a partir de um isolado de ferimento purulento. Posteriormente, em 1884, Rosenbach denominou uma das espécies que estudava de *aureus* devido à presença de pigmentos de coloração dourada característicos desta espécie (GUERREIRO, 1984).

Staphylococcus aureus são células esféricas com 0,8 µm de diâmetro em média, apresentam-se em arranjos individuais, aos pares, em tétrades, em cadeias curtas (3-4 células) e em agrupamentos irregulares característicos, em formato semelhante a cachos de uva (Figura 1). *S. aureus* são Gram-positivos, imóveis, não esporulados, constantemente não capsulados ou com uma formação limitada de cápsula. Apresentam parede celular constituída de peptidoglicano e ácido teicóico. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo. Normalmente são catalase-positivos e oxidase-negativos. As colônias são geralmente opacas, podendo variar sua coloração do branco ao laranja. Geralmente são halotolerantes, crescendo em meios com até 10% de sal (NaCl), e a temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37°C, podendo resistir ao congelamento até -20°C (WHITMAN et al., 2012). Podem crescer na faixa de pH entre 4 e 9,8 com o ótimo entre 6 e 7 (FRANCO, 2008).

Figura 1 - Imagem de células de *S. aureus* capturada por microscopia eletrônica.

Fonte:

<<http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html>> acessado: 22/05/2018.

Por sobreviverem na água, em partículas de poeira e por serem colonizadores da microbiota da pele e mucosas da maioria dos mamíferos, *S. aureus* são microrganismos de fácil disseminação, sendo encontrados com grande prevalência também nos alimentos (CUNHA; CUNHA, 2007)

Os mecanismos de patogenicidade atribuídos à *S. aureus* estão relacionados aos fatores de virulência como toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à membrana celular, mediadas por genes plasmidiais ou cromossômicos que combinados conduzem à doença (PEREIRA; SIQUEIRA JUNIOR, 1995).

S. aureus pode ser prejudicial à saúde tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação ampla nos tecidos (infecção), como pela produção de substâncias extracelulares como as enterotoxinas (intoxicação alimentar). Estas toxinas são produzidas principalmente quando certas cepas de *S. aureus* crescem em alimentos, contendo carboidratos e proteínas (FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

A toxina estafilocócica pertence ao segundo grupo de toxinas mais bem estudadas nas intoxicações alimentares; as principais produzidas por *S. aureus* são as do tipo A, B, C1, C3, D e E (FRANKER, 1990), sendo as toxinas do tipo A e D as mais relacionadas às intoxicações. Estas toxinas são polipeptídeos de cadeia curta (28 a 35 KDa) e única, compostas por uma quantidade elevada de lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico; e contém uma ponte dissulfeto ligada próximo ao centro da molécula, isso lhes conferem a característica de apresentarem estabilidade à temperatura, pH e radiação; logo, uma vez contaminado, o alimento dificilmente será seguro para o consumo (ACHENSON, 2000); além disso, quando ingeridas não são degradadas pelas proteases digestivas (ADAMS; MOSS, 2002)

Diferentemente das células bacterianas que são termolábeis, facilmente eliminadas por processos de cozimento, as enterotoxinas são resistentes a temperaturas elevadas, resistem ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (JAY, 1994), por isso, quando se trata de *S. aureus* as intoxicações são mais recorrentes que as infecções.

São agentes comuns da intoxicação estafilocócica carnes cozidas, saladas de batata,atum, frango, leite e seus derivados, assim como alimentos que utilizam leite em sua composição, como cremes e tortas. Por ser uma bactéria halotolerante tanto para NaCl quanto para nitratos; carnes curadas, como presuntos, também são veículos potenciais para estas bactérias. A contaminação de queijos já causou vários surtos tanto antes como depois do advento do emprego do leite pasteurizado na sua fabricação. Neste último caso, pode ocorrer contaminação pós-processamento ou na utilização de fermentos (starters) contaminados por *S. aureus* (FRANCO, 2008).

A doença gerada pela intoxicação causada por *S. aureus* denomina-se gastroenterite estafilocócica. Seus principais sintomas são náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia, que podem durar de um a dois dias, podendo evoluir para quadros mais severos, dependendo da susceptibilidade do indivíduo (BALABAM, 2000).

No caso das enterotoxinas, acredita-se serem necessárias entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* por grama do alimento para que a toxina atinja níveis capazes de provocar intoxicação. Como, normalmente, a bactéria encontra-se presente em números baixos, é preciso que ocorra a sua multiplicação nos alimentos para que este ofereça risco ao ser consumido (FRANCO, 2008). Ao

controlar-se, portanto, fatores que afetam o crescimento do patógeno, controla-se também a produção de enterotoxinas, assim como os surtos de intoxicação.

2.2 Biofilmes

Inicialmente as bactérias eram tratadas como sendo seres isolados, livres em suspensão; entretanto atualmente sabe-se que em sua grande maioria as bactérias são encontradas em comunidades de diferentes graus de complexidade, sendo o tipo de vida planctônico eventual e ocorrendo principalmente nas fases inicial e final dos biofilmes; na adesão e na proliferação respectivamente (SHAPIRO, 1998).

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define biofilmes como sendo agregados de microrganismos no qual as células encontram-se aderidas umas às outras e/ou a superfícies e são frequentemente envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, também denominadas de exopolissacarídeos (EPS) (VERT, 2012).

Na forma sésil as células bacterianas apresentam maior capacidade de se adaptarem a condições adversas por meio de um sistema de comunicação denominado *quorum sensing*, através do qual é possível o compartilhamento de informações para controlar adequadamente a densidade populacional e expressões gênicas (RUTHERFORD; BASSLER, 2012), o que faz dos biofilmes estruturas de resistência, causando grande preocupação e prejuízos em vários setores.

Na área clínica, a formação destas comunidades em hospedeiros pode favorecer o surgimento de inflamações e resistência a fármacos, que culminam em infecções persistentes. Estima-se que 80% de todas as infecções microbianas são ocasionadas por microrganismos presentes em biofilmes, abrangendo desde as mais comuns como infecções do trato urinário, até as mais graves como endocardites (CHEN; WEN, 2011).

Na indústria de alimentos, biofilmes podem ser formados em resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios mal higienizados. Além de serem mais resistentes ao processo de desinfecção, as células sésseis presentes no biofilme reduzem a eficiência e vida útil de equipamentos devido à corrosão microbiológica. Por isso, são a causa de prejuízos econômicos neste setor e também uma fonte de preocupação de saúde pública, pois podem gerar risco de ocorrência de toxinfecções alimentares (OLIVEIRA et al., 2010).

De acordo com Lister e Horswill (2014) os estágios de desenvolvimento de biofilmes podem ser divididos em pelo menos três eventos principais: adesão inicial, maturação e dispersão (Figura 2). Durante a fase de adesão inicial, as células planctônicas primeiramente ligam-se reversivelmente a superfície, por meio de interações de van der Waals e eletrostáticas, posteriormente, se a célula não se desprender, são estabelecidas ligações químicas irreversíveis (ARAUJO et al., 2013). A adesão é mediada por proteínas de superfície, denominadas de componentes da superfície microbiana reconhecedores de moléculas adesivas da matriz (MSCRAMM) (FOSTER et al., 2014). A maturação do biofilme ocorre com o aumento da população microbiana e por meio da produção de EPS. A fase de dispersão é iniciada por meio de um mecanismo de sinalização interna (*quorum sensing*) que faz com que as células retomem seu estado de crescimento planctônico, sejam desprendidas da matriz e possam reiniciar o processo de colonização em outros locais.

Figura 2 - Ilustração esquemática da formação de biofilmes.

Fonte: adaptação a partir de LISTER; HORSWILL, 2014.

A matriz de biofilmes de *S. aureus* é uma estrutura de composição complexa que depende das condições ambientais e da individualidade de cada linhagem, entretanto, sabe-se que pode ser composta por fatores do hospedeiro, proteínas secretadas e derivadas de lise, polissacarídeos e DNA extracelular (eDNA) (FITZPATRICK et al., 2005; ABRAHAM; JEFFERSON, 2012). O constituinte majoritário na matriz de biofilmes de *S. aureus* é a adesina polimérica intercelular (PIA), também conhecida por N-acetilglucosamina polimérica (PNAG) (O'GARA, 2007). PIA é composta por 80-85% de resíduos de N-acetil- β -1,6-glicosamina e por uma fração aniônica de 15-20% de resíduos de N-fosfatidil- β -1,6-glicosamina ou N-succinil- β -1,6-glicosamina (MACK et al., 1996).

Outro tipo de comunidade microbiana formada por *S. aureus* proposta por Haaber e cols. (2012) são os denominados aglomerados planctônicos, que se assemelham aos biofilmes, principalmente em sua estrutura e em suas propriedades benéficas de proteção, porém, não apresentam a limitação de mobilidade dos biofilmes e ainda uma atividade metabólica superior à da forma sésil. Estes fatores

combinados fazem deste tipo de comunidade um empecilho a mais no combate ao patógeno.

2.3 Ramnolipídeos (RL) e dodecilsulfato de sódio (SDS)

Surfatantes são compostos químicos que apresentam atividade superficial, isto é, possuem predileção por interfaces de polaridades dissimilares e são solúveis em solventes de ambas as polaridades. Esta propriedade advém de suas estruturas anfifílicas que apresentam ao menos uma região hidrofóbica e outra hidrofílica (DESAI; BANAT, 1997).

Um exemplo de surfatante amplamente utilizado, principalmente em produtos de higiene e limpeza, é o SDS. Este é um surfatante aniônico sintético (Figura 3) obtido a partir da sulfatação do dodecanol com ácido sulfúrico com posterior neutralização com carbonato ou hidróxido de sódio. O SDS apresenta também aplicações laboratoriais, especificamente na área de biologia molecular, e é utilizado na lise celular para extração de DNA e também no desenovelamento de proteínas na técnica de eletroforese SDS-page. O composto age rompendo as ligações não-covalentes das proteínas, causando sua desnaturação.

Figura 3 - Representação da estrutura química do dodecilsulfato de sódio.

Fonte: autoria própria.

O SDS apresenta valores de concentração micelar crítica (CMC) entre 2023 e 2890 mgL⁻¹ e causa a redução da tensão superficial da água de 72 mNm⁻¹ para 37 mNm⁻¹ (REIS, 2008). E apesar de ser muito utilizado, o SDS é tóxico, podendo ser fatal ao ser humano se ingerido em doses superiores a 150 g. O surfatante também pode causar irritações e inflamações cutâneas em exposições prolongadas (BASKETTER et al., 2004).

Uma alternativa ao uso dos surfatantes sintéticos convencionais são os biossurfatantes, que podem ser definidos como surfatantes de origem biológica. A porção hidrofílica dos biossurfatantes é normalmente composta por sacarídeos, aminoácidos ou grupos funcionais polares como ácidos carboxílicos. A parte hidrofóbica é tipicamente uma cadeia hidrocarbônica alifática (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os RL enquadram-se na classificação de biossurfatantes glicolipídicos e são principalmente produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Os RL apresentam-se como uma mistura de homólogos que diferem entre si pelo número de moléculas de ramnose de sua porção hidrofílica; e pelo tamanho das cadeias de ácidos graxos que formam a porção hidrofóbica do composto (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os homólogos de maior predominância nas misturas de RL são os mono-ramnolipídeos (monoRL) e di-ramnolipídeos (diRL), o primeiro formado por uma ramnose ligada a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico; e o segundo constituídos por duas ramnoses ligadas a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Figura 4) (NITSCHKE et al., 2011).

Figura 4 - Representação da estrutura química dos RL. A) mono-ramnolipídeo (α -L-ramnopiranosil- β -hydroxidecanoil- β -hydroxidecanoato e B) di-ramnolipídeo (α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hydroxidecanoil- β -hydroxidecanoato).

Fonte: adaptação a partir de ABDEL-MAWGOUD et al., 2010.

Os RL apresentam as duas principais propriedades de um surfatante, ou seja, forte atividade superficial e a auto-agregação em água, podendo formar micelas, vesículas e bicamadas dependendo do pH, concentração e presença de eletrólitos da solução (ISHIGAMI et al., 1987). Com isso, podem encapsular tanto compostos polares em seu centro aquoso quanto compostos apolares em sua região inter-bicamada. Apesar do efeito que os RL podem apresentar sobre as membranas celulares, muito pouco é conhecido sobre seu mecanismo de ação, principalmente no que diz respeito a interações moleculares ramnolipídeos-fosfolipídios (HABA et al., 2014).

RL são ácidos fracos devido à presença de um grupo carboxílico e apresentam CMC dependente do ambiente químico em que se encontra, sendo reportado entre 50 a 200 mg L⁻¹ (SÁNCHEZ et al., 2007). Em seu estudo Aranda e cols. (2007) demonstraram por meio da determinação da tensão superficial que a CMC de diRL purificado é de 71,5 mg L⁻¹.

A forte atividade superficial, a presença de vários congêneres de RL e a dependência da morfologia de agregação de RL com o pH faz com que a

determinação precisa do pKa para estes sistemas seja dificultada (HABA et al., 2014). Ishigami e cols. (1987) em seu estudo determinaram o pKa de RL como sendo de 5,6. Porém estudos mais recentes, demonstraram por meio de várias técnicas e em condições variadas de análise, que o pKa de RL é compreendido dentro de um intervalo de 4,28 a 5,50 (HABA et al., 2014).

Alguns estudos mostraram a atividade antimicrobiana dos RL sobre diversos microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras (HABA et al., 2003; ABALOS et al., 2001). Sabe-se que a membrana citoplasmática é o primeiro alvo de dano celular causado por surfatantes (NIELSEN et al., 2005). Sotirova e cols. (2008) atribuíram ao biossurfatante a característica de permeabilizador de membrana, ou seja, os RL promovem a formação de poros transmembrana que servem como canais para o periplasma. Além disso, a interação dos RL com proteínas de superfície pode causar uma remoção direta destas proteínas por solubilização (SOTIROVA et al., 2008). Os autores também constataram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que a ação dos RL altera a morfologia celular devido aos danos à membrana.

2.4 Mecanismos de ação de agentes antimicrobianos de aplicação industrial

Agentes antibacterianos são usados extensivamente na contenção da proliferação bacteriana em uma grande variedade de produtos, incluindo alimentos, cosméticos, fármacos, tintas e produtos têxteis, além de serem usados como antissépticos e desinfetantes (DENYER, 1995). Os alvos desses agentes podem ser divididos em: parede celular; citoplasma e membrana citoplasmática. O dano causado nesta última pode ser dividido em dois efeitos: mudanças na estrutura e função da membrana; e perturbação na homeostase e bioquímica da célula, como por exemplo, sistemas de transporte, reservatórios de substrato intracelular, gradientes de íons, concentração de cofatores e concentração de nutrientes (MOORE, 1997).

Agentes antibacterianos podem apresentar efeitos bacteriostáticos e bactericidas. Injúrias causadas por agentes bacteriostáticos são geralmente classificadas como sendo reversíveis, pois, neste caso, o agente antibacteriano pode ser removido ou neutralizado (FITZGERALD et al., 1989), enquanto que efeitos

bactericidas são irreversíveis e causam danos irreparáveis a estruturas ou funções vitais das células (DENYER, 1995).

Vários estágios são necessários para que haja a interação entre o agente antibacteriano e o alvo: deve haver a absorção do agente pela célula bacteriana; a migração do agente até o alvo; a concentração adequada do agente no alvo e o dano ao alvo. Estes estágios não ocorrem imediatamente e o tempo necessário para se completar cada um, varia dependendo da natureza do agente antibacteriano. Como resultado seu efeito pode ser revertido se neutralizado. Danos às células podem ser potencializados pelo aumento na concentração do agente antibacteriano (MOORE, 1997).

Bactérias apresentam uma variedade de respostas contra agentes antimicrobianos, as quais são dependentes de fatores como a natureza do agente, o tipo de organismo, o pH do ambiente, a temperatura na qual o contato é efetivo; sendo o pH o mais importante, pois pode modificar propriedades do agente, alterando sua ação (RUSSELL, 1991).

O alvo primário da maioria dos agentes biocidas é a membrana citoplasmática, onde o modo de ação geralmente é influenciado pela concentração. A membrana citoplasmática é um importante componente estrutural e funcional das células bacterianas; apresenta grande área superficial e também se encontra na vizinhança próxima ao ambiente aquoso externo o que aumenta as chances de interação do agente (MOORE, 1997).

Bactérias Gram-positivas não possuem moléculas receptoras específicas ou permeases, o que facilita a entrada de antimicrobianos na célula. Em contrapartida, nas Gram-negativas, a entrada destes agentes é dificultada pela membrana externa, na qual os lipopolissacarídeos desempenham grande contribuição principalmente em barrar a penetração de ácidos graxos de cadeia longa (KABARA, 1984).

Agentes que atuam na membrana podem causar mudança na fluidez e/ou permeabilidade da membrana citoplasmática, tais mudanças podem ser determinadas por extravasamento de constituintes intracelulares como íons de potássio, nucleotídeos e aminoácidos (MOORE, 1997).

Surfactantes possuem a capacidade de solubilizar fosfolipídeos, entretanto os não-iônicos (como os RL em pH abaixo de seu pKa) são mais promissores nesta ação quando comparados com os iônicos. Os não-iônicos geralmente apresentam a porção hidrofílica maior que a porção hidrofóbica, e isto faz com que suas propriedades em

solução, como o comportamento micelar, sejam diferentes dos iônicos, fornecendo vantagens na solubilização da membrana (MOORE, 1997).

2.5 Hidrofobicidade da superfície celular (HSC)

A interação entre a célula microbiana e uma interface ou substrato é regida pelos componentes presentes na sua superfície, que podem ser polissacarídeos, lipolissacarídeos, lipoproteínas, lipídeos, ácidos lipoteicóicos, proteínas, assim como apêndices superficiais como fimbrias, pili e flagelos. A proporção, presença ou ausência destes componentes determinam as propriedades físico-químicas específicas da superfície celular como a carga e a hidrofobicidade (SAINI, 2010). Estes componentes, apesar de intrínsecos de cada microrganismo, podem ser alterados tanto por mutações e transferências de genes, como também pelas condições ambientais. Como menciona Murínová e Dercová (2014) algumas substâncias apresentam a ação de modificar a hidrofobicidade da superfície celular.

A HSC desempenha um papel importante na adesão e no desprendimento de superfícies. A influência da HSC na adesão de microrganismos em superfícies bióticas e abióticas tanto na área médica, quanto na de biorremediação e na indústria alimentícia tem seus aspectos negativos e positivos. Por exemplo, microrganismos hidrofóbicos podem causar danos em superfícies pela formação de biofilmes, mas por outra perspectiva podem acumular-se rapidamente em poluentes orgânicos e decompô-los (KRASOWSKA; SIGLER, 2014).

Em uma cultura pura microbiana é possível encontrar ambos os tipos de células, hidrofóbicas e hidrofílicas, das quais somente parte delas participa da adesão. A adesão de células microbianas a superfícies dependem de inúmeros fatores, entre eles: movimento Browniano, atração de van der Waals, forças gravitacionais, cargas eletrostáticas da superfície e, sobretudo, a hidrofobicidade da célula (VAN LOOSDRECHT et al., 1990).

Dependendo do tipo da superfície, a HSC pode aumentar a propensão da adesão bacteriana. Células hidrofóbicas aderem-se mais facilmente a superfícies hidrofóbicas, enquanto que células hidrofílicas aderem fortemente em superfícies hidrofílicas (KOCHKODAN et al., 2008; GIAOURIS et al., 2009).

As propriedades hidrofóbicas da superfície microbiana são conducentes não apenas à adesão de superfícies abióticas, mas como também a materiais bióticos e à

penetração de tecidos do hospedeiro (GOULTER et al., 2009; RODRIGUES; ELIMELECH, 2009; HEILMANN, 2011). A elevada hidrofobicidade celular permite interações hidrofóbicas diretas entre a superfície celular e os substratos facilitando assim sua adesão (HEIPIEPER et al., 2010).

A formação de biofilme em tecidos é um problema médico devido à forte resistência destas estruturas microbianas a medicamentos (PALMER et al., 2007; MURZYN et al., 2010; ARCHER et al., 2011). E como relata Doyle (2000) os microrganismos hidrofóbicos são mais invasivos e causam doenças difíceis de serem tratadas, ou seja, a alteração da HSC pode ser uma boa estratégia para a prevenção de infecções persistentes (HAZEN, 2004).

Na indústria alimentícia, os principais materiais usados em instalações são aço inoxidável, borracha e politetrafluoroetileno (PTFE). Sinde e Carballo (2000) demonstraram que patógenos hidrofóbicos facilmente aderem a estes materiais, o que pode levar a contaminações neste setor, que gera um prejuízo anual de milhões de dólares a indústria alimentícia (BROOKS; FLINT, 2008).

2.6 Técnicas que auxiliam na elucidação do mecanismo de ação dos surfatantes

2.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A região do espectro infravermelho estende-se desde a região do visível até a região das microondas. A característica básica desta região é que sua radiação é originada de emissões térmicas de uma fonte aquecida. Convencionalmente é medida em números de onda (cm^{-1}) que variam de 10 até 10000 cm^{-1} , porém, a região de maior interesse fica entre 400 a 4000 cm^{-1} (NAUMANN, 2000).

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de bactérias são padrões semelhantes a impressões digitais que são altamente reprodutíveis e característicos de cada bactéria. Eles mostram contornos gerais e complexos ao invés de picos distintos (NAUMANN et al., 1988a), isto significa que a maioria da informação está oculta por trás das bandas do espectro. Quando células intactas são analisadas, o espectro de FTIR de bactérias fornecem informações sobre a composição química total da célula (proteínas, membranas, parede celular, ácidos nucleicos, etc) (HELM et al., 1991).

O espectro FTIR de células microbianas gera informações altamente específicas, as quais são usadas para diferenciar, classificar e identificar diversas espécies e linhagens microbianas. A análise no infravermelho de microrganismos também é útil na detecção *in situ* de componentes intracelular ou estruturas como corpos de inclusão, compostos de armazenamento, e endósporos; no monitoramento e quantificação do gás carbônico metabólico liberado em resposta a vários substratos diferentes; e na caracterização da interação célula-droga (NAUMANN, 2000). Alguns trabalhos demonstram o emprego do FTIR no estudo de danos causados em bactérias por vários fatores como aquecimento ou resfriamento, aplicação de ultrassom e tratamento químico (AL-QADIRI et al., 2008 a/b; LIN et al., 2004).

Cada material celular apresenta um padrão de bandas peculiar que permite seu estudo. Com base no proposto por Naumann (2000), as principais bandas dos espectros de *S. aureus* são classificadas como descrito a seguir.

Na primeira porção dos espectros, em torno de 3300 cm^{-1} , a banda alargada refere-se a um conjunto de sobreposições de bandas provenientes de deformações axiais de grupamentos N-H de proteínas e O-H de polissacarídeos e da água.

As bandas em números de onda entre 3000 e 2800 cm^{-1} representam a região dos lipídeos, nela há três bandas, as duas primeiras, uma em $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$ e a outra em $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$ são originadas de deformações axiais assimétricas de ligações C-H de grupos $-\text{CH}_3$ e $>\text{CH}_2$, respectivamente. Em ~ 2872 e $\sim 2852\text{ cm}^{-1}$ há duas bandas pequenas referentes a deformações axiais simétricas destes mesmos grupos.

As quatro bandas seguintes entre 1650 e 1390 cm^{-1} correspondem a funções presentes em proteínas. A banda em $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a amidas primárias de proteínas α -hélice e folha- β , proteínas de estrutura secundária, sendo esta frequentemente a banda mais proeminente em espectros de infravermelho de bactérias. Em $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ há a banda característica de amidas secundárias, atribuídas as vibrações das ligações N-H de proteínas. As duas próximas bandas são referentes a deformações angulares de ligações C-H de carbonos secundários em proteínas e deformações axiais de C=O de grupos carboxilas de proteínas, respectivamente em ~ 1454 e $\sim 1395\text{ cm}^{-1}$.

A banda em $\sim 1232\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a deformações axiais assimétricas de P=O que podem ser provenientes de grupos fosfodiésteres, fosfato livre e também de grupos funcionais monoéster de fosfato. Tais grupos estão presentes nos fosfolipídeos

de membrana e carboidratos contendo fósforo como os ácidos teicóicos e lipoteicóicos das paredes celulares de bactérias Gram-positivas.

A região espectral entre 1200 e 900 cm^{-1} é geralmente dominada por deformações axiais simétricas de grupos fosfato de ácidos nucleicos e uma sequência complexa de picos principalmente devida a deformações axiais de C-O-C e C-O-P de vários oligo e polissacarídeos.

A região entre 900 e 600 cm^{-1} , a região “*fingerprint*”, exibe uma variedade de bandas fracas sobrepostas devido a vibrações de anéis aromáticos de aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano e de vários nucleotídeos.

2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica é uma tecnologia que permite examinar em finos detalhes estruturas como as de espécimes de materiais biológicos, por exemplo. É amplamente utilizada por diversas áreas passando pela microbiologia, anatomia, zoologia entre outras. A técnica consiste em um mapeamento da amostra por meio da varredura de um feixe fino de elétrons que percorre a superfície da mesma gerando uma imagem com aparência tridimensional (BOZZOLA, 2001).

Análises com esta técnica requerem uma comparação entre as diferenças das amostras controle em relação às amostras que foram expostas ao agente. Tais diferenças são constantemente associadas a mudanças morfológicas das células bacterianas, as quais são abordadas por Díaz-Visurraga e cols. (2010). Dentre elas destacam-se:

- A desagregação de colônias: pode haver alterações na matriz polissacarídica extracelular, levando a separação das células que normalmente se encontram em arranjos específicos e rearranjo em grupos menores.

- O aumento da rugosidade celular: pode estar associado à danos na parede celular com a liberação de material intracelular e subsequente deformação desta.

- As transformação morfológica: as células bacterianas após *stress* podem adquirir formas distintas de sua morfologia natural.

- A filamentação: ocorre quando o crescimento celular continua na ausência de divisão celular (mutação e/ou alteração da estequiometria de componentes da divisão) e resulta na formação de organismos alongados que possuem múltiplas cópias cromossomais e que apresentam mudanças metabólicas e danos em seu DNA.

2.6.3 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

A microscopia confocal é uma técnica que permite a obtenção de imagens nítidas de amostras espessas sob várias profundidades, denominadas de seções óticas. O termo seção ótica refere-se à habilidade do instrumento em produzir imagens finas de amostras fluorescentes marcadas sem haver a necessidade de seccioná-las fisicamente. As seções óticas são produzidas pela varredura ponto a ponto da amostra com um laser focado na amostra e usando um filtro espacial para remover fluorescência indesejada aos arredores do plano focal de interesse (PADDOCK, 1999)

A maior vantagem da CLSM é sua habilidade em capturar imagens digitais detalhadas de amostras fluorescentes marcadas, que antes só eram possíveis serem vistas a olho em um microscópio epifluorescente convencional. Ademais, é possível a obtenção de uma visão tridimensional da amostra, por meio do tratamento das seções óticas em softwares computacionais (MURPHY; DAVIDSON, 2013).

Como menciona Schlafer e Meyer (2017) CLSM é uma importante ferramenta no estudo de biofilmes, tanto na investigação das células nele presente como também de sua matriz polimérica, pois permite a visualização em tempo real de espécimes vivos e hidratados.

Para serem visualizadas por CLSM as amostras devem ser coradas com fluoróforos, que se ligam em receptores específicos, sejam estes polissacarídeos, proteínas, lipídeos ou material genético. Um dos corantes aplicados para obter-se uma análise qualitativa da população viva e morta de biofilmes é o *kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability*, o kit consta de dois corante de ácidos nucleicos, o verde fluorescente SYTO 9 e o vermelho fluorescente iodeto de propídio. Estes corantes diferem em suas características espectrais e em sua capacidade de penetração em células bacterianas íntegras. Quando utilizado isoladamente, o SYTO 9 marca toda a população bacteriana, ambas, as com membranas intactas e as injuriadas. Em contrapartida, o iodeto de propídio penetra somente em células bacterianas com a membrana danificada, causando a redução da fluorescência do corante SYTO 9. Portanto, com a combinação destes dois corantes, as células bacterianas com membranas intactas são marcadas de verde fluorescente, enquanto que as com membrana danificada emitem fluorescência vermelha.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito do pH na atividade antimicrobiana do biossurfatante Ramnolípídeo frente a células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*.

3.1 Objetivos específicos

- Comparar a ação antimicrobiana dos RL com o surfactante sintético SDS;
- Determinar as concentrações inibitória e bactericida mínimas dos RL e SDS sobre *S. aureus* em sua forma planctônica e em biofilmes;
- Investigar a influência do pH na atividade antimicrobiana;
- Contribuir para a elucidação do mecanismo de ação dos RL.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos e meios de cultura

A linhagem de *S. aureus* utilizada foi a ATCC 8095 isolada de torta de creme. Todos os testes foram realizados a partir de culturas estoque armazenadas a -20°C em caldo de triptona de soja e extrato de levedura (TSYEB) (Acumedia) preparado com 20% de glicerol. Os meios de cultura utilizados foram o meio líquido TSYEB e o meio sólido ágar triptona de soja e extrato de levedura (TSYEA) (Acumedia), os quais foram ajustados em pH 5, 6, 7, 8 através de tamponamento com sais mono e dibásico de fosfato de sódio (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4) (Synth), com exceção do pH 5 que fica fora do intervalo de abrangência tamponante destes sais, nesta condição o meio somente foi acidificado com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹.

Todas as análises foram realizadas com materiais esterilizados provenientes dos fabricantes ou esterilizados em autoclave (Quimis) por 20 minutos a 120 °C. A manipulação dos microrganismos e materiais esterilizados foram conduzidas em cabine de segurança biológica (BioProtector plus-12 Veco).

4.2 Padronização do inóculo

O inóculo bacteriano utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana partiram de dois cultivos subsequentes (24 horas) incubados em estufa a 37°C. Para promover a inoculação, alíquotas das colônias foram diluídas em solução salina (NaCl 0,86%) até que se obtivesse uma densidade ótica (DO) de $0,10 \pm 0,01$ medida em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Genesys 10UV da Thermo Scientific), o que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹. Para ser utilizada nos experimentos, esta suspensão inicial passou por uma diluição no fator de 10, ou seja, o inóculo inicial partiu de uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹.

4.3 Rhamnolipídeos (RL)

Utilizou-se o biossurfatante RL comercial (Rhamnolipid Inc.) em solução a 25%. O RL foi preparado inicialmente na concentração de 5000 mg L⁻¹ em meio TSYEB

ajustado com seus respectivos valores de pH de análise. Esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm .

4.4 Dodecil sulfato de sódio (SDS)

A fim de comparar a ação do biossurfatante RL com outro surfatante de caráter aniônico foi utilizado o SDS (Sinth), nas mesmas condições aplicadas ao RL.

4.5 Avaliação da atividade dos surfatantes em células planctônicas

4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo segundo metodologia estabelecida pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 100 μL de TSYEB para cada poço e então adicionou-se mais 100 μL de caldo tratado na concentração de 5000 mg L^{-1} na primeira coluna da placa. Metade do conteúdo da primeira coluna da placa foi então coletado e transferido para a segunda coluna e assim sucessivamente até a décima coluna, realizando assim uma diluição seriada que abrangeu as concentrações de 2500 a 4,9 mg L^{-1} de surfatante. Posteriormente foram adicionados 20 μL do inóculo padronizado (conforme descrito em 4.2) às colunas 1 a 11. Desta forma, as colunas de 1 a 10 foram as colunas testes com meio tratado; a 11 serviu de controle positivo e a 12 de controle negativo. A menor concentração em que não houve crescimento bacteriano foi designada como sendo a CIM. Para facilitar a visualização da presença de viabilidade celular foram adicionados 20 μL de solução de brometo de tetrazólio (MTT 1 g L^{-1}) (Sigma), que altera sua coloração de amarelo para roxo na presença de células viáveis.

Os resultados foram expressos como a moda de cinco repetições independentes com oito replicatas.

4.5.1.1 Efeito da força iônica na ação antimicrobiana dos RL

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 4.5.1, com algumas modificações. Em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 50 µL de TSYEB para cada poço e então adicionou-se mais 50 µL de caldo contendo 10000 mg L⁻¹ de RL na primeira coluna da placa. Realizou-se as diluições seriadas nas próximas colunas da placa. O mesmo volume (50 µL) de TSYEB tratado com NaCl (Synth) em concentrações determinadas (10%; 5%; 2,5% e 1,25%, uma para cada placa) foi depositado nos poços da placa. Adicionou-se 20 µL do inóculo padronizado às colunas 1 a 11 e prosseguiu-se as análises como descrito no item 4.5.1. As análises foram realizadas em pH 6 e 7.

Os resultados foram expressos como a moda de cinco repetições independentes com oito replicatas.

4.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para as concentrações de RL / SDS que não apresentaram crescimento no teste de CIM foram realizadas análises de CBM. Uma alíquota do material destes poços foi transferida para placas TSYEA, com o auxílio de uma alça inoculadora e então incubada a 37°C por 24 h. A CBM foi designada como a menor concentração em que não houve crescimento microbiano.

Os resultados foram expressos como a moda de cinco repetições independentes.

4.5.3 Curva de sobrevivência (ensaio *time kill*)

As curvas de sobrevivência foram realizadas de forma a reproduzir em macro escala as condições estabelecidas nos ensaios de CIM. Tubos contendo 5 mL de TSYEB (tratado com os surfatantes, exceto controle) foram inoculados com 1 mL de suspensão bacteriana padronizada. Em intervalos determinados de tempo, alíquotas de 100 µL destas amostras iniciais eram transferidas em tubos de ensaio contendo 900 µL de solução salina, realizando-se assim uma diluição de 1:10. A partir deste tubo foram realizadas outras diluições seriadas no fator 1:10, tendo-se assim concentrações de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ etc das amostras iniciais. Alíquotas de 20 µL destas

diluições foram depositadas em forma de gotas em placas de TSYEA e levadas para incubar por 24 h a 37°C. Nas diluições em que houve um número de UFC entre 5 a 50 por gota, foram contadas para o monitoramento da quantidade de células viáveis naquele determinado tempo de incubação, conforme metodologia descrita por Miles e Misra (1938).

Os ensaios time kill foram realizados nas concentrações de CIM e CBM e em condições que não houve CIM e/ou CBM, procedeu-se o ensaio com concentração de tratamento de 5000 mg L⁻¹.

Os ensaios foram realizados em duas repetições independentes com seis replicatas.

4.5.4 Determinação da hidrofobicidade da superfície celular

Esta análise consistiu na determinação da porcentagem de células que aderiram à fase apolar de uma mistura bifásica. A fase polar desta mistura constitui-se de um tampão que contém fosfato, uréia e magnésio (PUM) conforme metodologia estabelecida por Rosenberg (1984a). Esta foi modificada a fim de atender o intuito do trabalho que é avaliar a influência da variação do pH, para isso, na preparação do tampão foi utilizado 1 L de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ nas proporções de tamponamento em pH 6, 7 e 8, neste tampão foi adicionado 1,8 g de uréia e 0,2 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado. Para o pH 5, foi utilizada solução salina a 0,86 %.

O tampão foi utilizado para suspender o material celular cultivado em placas de TSYEA. A D.O. destas suspensões foi ajustada para $1,0 \pm 0,1$ em 610 nm e então estas foram tratadas com os surfatantes (exceto as amostras controle) durante um período de 24 h a 37°C. A fim de assegurar a remoção dos surfatantes, duas lavagens foram realizadas com o tampão fosfato, separando-se os pellets do sobrenadante por meio de centrifugações (miniSpin - Eppendorf).

Mediu-se a DO desta suspensão (esta foi denominada de DO da suspensão inicial). Um volume de 0,4 mL de hexadecano foi adicionado em 2,4 mL da suspensão e esta mistura foi agitada vigorosamente em agitador magnético por 30 seg. e então deixada em repouso por 1 h à temperatura ambiente para separação das fases. A DO da fase inferior do tubo (denominada de DO da fase aquosa) foi medida no mesmo comprimento de onda inicial.

Amostras contendo somente tampão PUM no lugar da suspensão bacteriana passaram pelo mesmo procedimento e serviram como branco nas leituras de DO, tanto da suspensão inicial, quanto da fase aquosa.

A seguinte equação foi utilizada para expressar a porcentagem de células que aderiram ao hidrocarboneto:

$$\text{Porcentagem de adesão ao hexadecano} = \left(1 - \frac{\text{DO da fase aquosa}}{\text{DO da suspensão inicial}} \right) \times 100$$

Os ensaios foram realizados em três repetições independentes com duplicatas e os resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão.

4.6 Avaliação da atividade dos surfatantes em biofilmes de *S. aureus*

4.6.1 Inibição da formação de biofilmes

Para esta análise seguiu-se o método proposto por Schillaci e cols. (2008). O mesmo protocolo experimental do ensaio de CIM foi reproduzido, porém utilizou-se placas de microdiluição de 96 poços de fundo plano e um tempo superior de incubação (48 horas) visando a formação dos biofilmes. As duas primeiras fileiras das placas não foram inoculadas, serviram de branco para cada concentração do tratamento. Após o tempo de incubação, removeu-se o caldo de cultivo e realizou-se duas lavagens com 120 μL de tampão, para remoção de células planctônicas. Às placas lavadas adicionou-se 100 μL de tampão fosfato de sódio e 20 μL de MTT 1 gL^{-1} , incubando-as a 37°C por 1 hora. Adicionou-se 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) agitou-se e mediu-se a absorbância de cada poço em 570 nm utilizando leitora de microplacas (Enspire - Perkin Elmer).

Para determinar a porcentagem de inibição da formação de biofilmes promovida pelo tratamento com os surfatantes os valores de DO foram convertidos pela equação:

$$\text{Porcentagem inibição/redução} = 100 - \left(\frac{\text{DO experimental}}{\text{DO do controle sem tratamento}} \times 100 \right)$$

Os ensaios foram realizados em três repetições independentes com seis replicatas e os resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão.

4.6.2 Redução de viabilidade celular em biofilmes pré-formados

Para determinação do percentual de redução de células viáveis nos biofilmes seguiu-se o método proposto por Schillaci e cols. (2008) modificado. Primeiramente realizou-se a formação do biofilme conforme descrito no item 4.6.1, porém em meio de cultura não tratado com os surfatantes. Depois de formado o biofilme (48 horas de incubação a 37°C) o meio foi removido e os poços lavados duas vezes com 120 µL de tampão fosfato. Em uma placa separada realizou-se a diluição seriada dos surfatantes, em semelhança as diluições realizadas no ensaio de CIM. Transferiu-se o meio com surfatantes para as placas com os biofilmes e incubou-as a 37°C por 24 horas. Após o tempo de incubação adicionou-se 20 µL de MTT, as placas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C, para completa reação do MTT. Adicionou-se 100 µL de DMSO em todos os poços, agitou-se e mediu-se a absorbância de cada poço em comprimento de onda de 570 nm em leitora de placas. O percentual de redução da viabilidade foi calculado como descrito acima (item 4.6.1)

Os ensaios foram realizados em três repetições independentes com seis replicatas e os resultados expressos como a média $\pm$ erro padrão.

4.6.3 Microscopia confocal de varredura a laser

A formação dos biofilmes foi realizada como descrita nos itens 4.6.1 e 4.6.2 para inibição da formação de biofilmes e redução de células viáveis em biofilmes pré-formados, respectivamente, porém, os biofilmes foram formados em cupons (lâminas de poliestireno) depositados no fundo das placas e receberam tratamento com RL na concentração de 312,5 mg L⁻¹. Depois de tratados, os cupons com os biofilmes aderidos passaram por duas lavagens com solução salina 0,86 %.

Após esta etapa procedeu-se a coloração das células presentes no biofilme com o kit de corantes L-7012 LIVE/DEAD® *BacLight*[™] *Bacterial Viability* (Molecular Probes). Este kit é composto pelo corante verde fluorescente SYTO 9 e pelo corante vermelho fluorescente iodeto de propídio. A mistura destes dois corantes, em proporções equivalentes, foi diluída em solução salina (para cada 1 mL de solução foram adicionados 3 µL da mistura). Os cupons depois de lavados foram transferidos para outra placa e submersos na solução de corantes. As placas foram recobertas por papel alumínio e mantidas por 30 min em temperatura ambiente para posterior análise de CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*) em microscópio invertido modelo LSM 780 (Zeiss), disponível no Instituto de Física de São Carlos da

Universidade de São Paulo. Utilizou-se a região espectral de 499 a 602 nm para o canal 1 (verde) e de 605 a 735 nm para o canal 2 (vermelho). A metodologia utilizada foi a descrita por Drago (2016).

4.7 Investigação do mecanismo antimicrobiano

4.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Suspensões bacterianas preparadas em solução salina com DO ajustada para $2,0 \pm 0,1$ foram adicionadas a meios de cultura TSYEB tamponados nos valores de pH de interesse e tratados com os respectivos surfatantes, com exceção do controle que não recebeu tratamento. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 h.

As culturas resultantes foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm (em centrífuga miniSpin - Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e os *pellets*, lavados duas vezes com solução salina 0,86 %. Os *pellets* lavados foram suspensos em 400 µL de solução salina e depositados em suportes de teflon para secagem em dessecador por 48 h.

Os *pellets* depois de secos foram macerados com brometo de potássio (KBr) anidro (Sigma) e prensados para formação de uma pastilha segundo a metodologia descrita por Helm (1991) com modificações.

As análises foram feitas em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu), no intervalo de abrangência espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , em modo de transmitância, com resolução de 4,0 e 32 *scans* por amostra. O aparelho foi disponibilizado pelo Prof. Victor Deflon, e as análises realizadas no laboratório de Química Inorgânica Estrutural e Biológica.

Os valores de pH e os respectivos valores de concentração de tratamento em que foram realizados os ensaios foram os mesmos utilizados no ensaio *time kill*.

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise microscópica utilizou-se a metodologia modificada estabelecida por Murtey e Ramasamy (2016). Colônias de *S. aureus* foram cultivadas em TSYEB em

pH 5, 6 e 7. As amostras passaram por centrifugações de 10000 rpm por 10 min (em centrífuga miniSpin - Eppendorf) para obtenção dos *pellet*se receberam duas lavagens com solução salina 0,86 %. As suspensões bacterianas obtidas foram padronizadas com uma DO de $1,0 \pm 0,1$ em 610 nm.

Depositou-se 20 μL de cada suspensão em lâminas de vidro previamente recobertas com poli-lisina (poly-L-lysinehydrobromidetype III, Sigma). O recobrimento de poli-lisina foi feito com o depósito de 10 μL de solução 50 mg L^{-1} da substância sobre o vidro. Aguardou-se sua secagem em temperatura ambiente sob fluxo laminar de ar.

As lâminas com as células aderidas foram submersas em solução de 3,0 % de glutaraldeído (Sigma) preparado em tampão fosfato de sódio pH 7,2. Aguardou-se o tempo de fixação de 1h e 30 min. Lavou-se as amostras em tampão fosfato de sódio pH 7,2. Posteriormente procedeu-se a etapa de desidratação. Nesta etapa as lâminas com as células fixadas foram imersas em soluções de etanol com gradiente crescente de concentração (35, 50, 75, 95 e 2x 100 %) por 10 min. cada. Posteriormente, as amostras foram imediatamente submersas em hexametildisilazano (HMDS) (Sigma) e armazenadas em placas de 12 poços vedadas até receberem recobrimento com ouro. As análises foram realizadas em microscópio Inspect F50 presente no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade antibacteriana em células planctônicas

5.1.1 Determinação da CIM e CBM

S. aureus, assim como outros microrganismos, em seu ciclo de vida, podem ser encontrados de duas formas distintas: na forma planctônica ou na forma séssil. Como menciona Shapiro (1998), preferencialmente as bactérias adotam a forma séssil por fornecer-lhes melhor chance de sobrevivência. Entretanto, a forma planctônica se faz também presente principalmente nas fases inicial e final dos biofilmes. Primeiramente realizou-se o estudo da ação dos RL sobre células livres.

Os valores de CIM e CBM dos surfatantes sobre *S. aureus* ATCC 8095 em diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8) estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de CIM e CBM de RL e SDS sobre *S. aureus* em diferentes valores de pH.

pH	CIM (mg L ⁻¹)		CBM (mg L ⁻¹)	
	RL	SDS	RL	SDS
5	9,8	9,8	19,5	39,1
6	39,1	19,5	>2500	>2500
7	>2500	39,1	>2500	>2500
8	>2500	39,1	>2500	>2500

As determinações de CIM e CBM evidenciaram que o pH exerce grande influência sobre o efeito antibacteriano dos surfatantes. Os RL são capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* em pH 5 e 6 em concentrações de 9,8 e 39,1 mg L⁻¹ respectivamente. Em pH neutro e básico demonstraram ser menos eficientes, inclusive em relação ao SDS. Entretanto, os RL apresentaram maior poder bactericida que o SDS em pH 5, promovendo a morte bacteriana em uma concentração de 19,5 mg L⁻¹, metade do valor necessário de SDS.

Tabela 2 - Valores de CIM e CBM dos RL na presença de NaCl em diferentes concentrações.

[NaCl]	1,25%		2,5%		5%		10%	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
pH 6	19,5	>2500	9,8	>2500	4,9	9,8	4,9	4,9
pH 7	>2500	>2500	39,1	>2500	9,8	>2500	4,9	19,5

Na presença de NaCl notou-se efeito mais pronunciado da ação dos RL. Nas condições em que não se havia obtido CBM (pH 6) ou sequer CIM (pH 7), os RL, na presença de sal, mostraram efeito bacteriostático ou até mesmo bactericida. Em pH 6 com a adição do sal na concentração de 1,25% reduziu-se pela metade o valor da concentração de RL necessária para inibir o crescimento de *S. aureus* (19,5 mg L⁻¹). Em pH 7, na presença de 2,5% de NaCl os RL apresentaram ação inibitória na concentração de 39,1 mg L⁻¹. Em concentrações mais elevadas de sal (10%), o efeito dos RL foi ainda mais promissor, sendo capaz de eliminar a população bacteriana com ínfimas concentrações do agente.

Como relata Ray (2008), a adição de sal faz reduzir repulsões eletrostáticas entre os grupos ionizados dos surfatantes, com isso, suas moléculas podem se agregar de forma mais organizada na interface e se adsorverem mais facilmente na superfície celular. Ou seja, o aumento da força iônica promove uma redução na tensão superficial do meio tratado com o surfatante e favorece sua ação na célula bacteriana.

5.1.2 Ensaio *time kill*

O efeito do pH e da concentração de surfactante foi melhor evidenciado através do monitoramento do crescimento bacteriano na presença dos agentes (Figuras 5 - 8).

Nas Figuras 5 a 8, a curva controle refere-se ao crescimento bacteriano na ausência de tratamento. Em pH 5 (Figura 5), *S. aureus* apresentaram um crescimento de três unidades logarítmicas no período de 24 h. Na concentração de 9,8 mg L⁻¹ ambos os surfatantes restringiram a variação de crescimento bacteriano a apenas uma unidade logarítmica, ou seja, nestas condições tanto os RL quanto o SDS podem ser considerados bacteriostáticos.

Na presença de $19,5 \text{ mg L}^{-1}$ de surfatante, os dois compostos demonstraram pronunciado efeito na redução da viabilidade celular, porém, os RL destacaram-se por promoverem a erradicação da população bacteriana após 24 h.

Figura 5 - Ensaio time kill de *S. aureus* sob ação de RL e SDS em pH 5.

Em pH 6 (Figura 6), notou-se que nos valores de CIM dos surfatantes, $39,1 \text{ mg L}^{-1}$ para RL e $19,5 \text{ mg L}^{-1}$ para SDS, houve, em concordância com os resultados do ensaio anterior, completa inibição do crescimento bacteriano em 24 horas. Uma concentração mais elevada, 5000 mg L^{-1} , reduziu a população bacteriana inicial a até duas unidades logarítmicas no tratamento com RL e atuou como bactericida tratando-se do SDS.

Figura 6 - Ensaio time kill de *S. aureus* sob ação de RL e SDS em pH 6.

Em pH 7, na concentração de 39,1 mg L⁻¹ os RL inibiram o crescimento bacteriano por 8 horas, depois deste observou-se aumento da população (Figura 7). Em estudo recente, Rogiers e cols. (2017) observaram que quando *Listeria monocytogenes* foi tratada com doses subletais de cinamaldeído ocorreu prolongamento da fase lag de crescimento como consequência de adaptações realizadas pelo microrganismo a fim de corrigir sua sensibilidade ao agente por meio de modificação das cadeias apolares de seus fosfolípídeos de membrana. Tais adaptações podem também ter ocorrido em *S. aureus* promovendo diminuição da sensibilidade aos RL após 8 horas. Outros dados que podem corroborar esta hipótese serão fornecidos pela técnica espectroscópica FTIR, que será abordada posteriormente.

Em concentração de 5000 mg L⁻¹, os RL mostraram ação bacteriostática neste pH. Para o SDS houve a confirmação de sua ação bacteriostática em 39,1 mg L⁻¹ enquanto para 5000 mg L⁻¹ houve efeito bactericida após 16 horas de tratamento.

Figura 7 - Ensaio time kill de *S. aureus* sob ação de RL e SDS em pH 7.

Em pH 8 (Figura 8) observou-se comportamentos semelhantes ao pH 7 porém com um pequeno detrimento por parte dos RL que demonstram ação um pouco inferior.

Figura 8 - Ensaio time kill de *S. aureus* sob ação de RL e SDS em pH 8.

O melhor efeito dos RL em pH 5 deve-se provavelmente ao fato destes encontrarem-se em sua forma não-iônica, ou seja, com seu grupo carboxílico protonado devido ao pH do meio ser menor que o pKa dos RL, que segundo

Ishigami e cols. (1987) é em torno de 5,6. Sendo assim em pH 5 a maior parte das moléculas de RL encontram-se com sua porção hidrofílica na forma neutra. Sen (2010) relatou que os di-RL quando em pH 4,0 apresentam 97,5% de suas moléculas na forma neutra enquanto que em pH 7,4 aproximadamente 98,4% estão na forma aniônica (desprotonada). O SDS, independente do pH do meio, encontra-se na forma aniônica devido a fácil dissociação do cátion de sódio, como indica seu baixo valor de pKa que é estimado em -1,5 pelo preditor de pKa CHEMAXON (2018)¹.

Conforme descrito por Moore (1997) surfatantes não-iônicos possuem efeitos mais promissores em solubilizar fosfolipídeos que os iônicos. Isso se deve ao fato destes apresentarem maior facilidade na permeação da membrana plasmática, por serem isentos de carga e não promoverem repulsão elétrica com os grupos aniônicos dos fosfolipídeos, sendo esta uma possível explicação de os RL, em pH 5, apresentarem melhor ação que o SDS.

Uma vez associados aos fosfolipídeos, os surfatantes em baixa concentração pouco alteram a estrutura da bicamada (SEEMAN, 1972). Em concentrações um pouco maiores, o surfatante pode aumentar a permeabilidade da membrana antes de promover qualquer efeito mais severo a ela. Porém quando a concentração do surfatante na bicamada ultrapassa a concentração de transição lamelar/micelar crítica, resulta-se a formação de micelas de uma mistura de moléculas dos fosfolipídeos e do surfatante, o que leva a desestabilização da estrutura da membrana celular (MOORE, 1997).

Para os RL utilizados neste trabalho o valor da CMC é de 40 mg L⁻¹ em solução aquosa pH 7 à 25°C (SILVA, 2016) e todos os resultados de CIM e CBM mostraram-se abaixo deste valor, o que sugere que não há a necessidade de formação de micelas para que o biossurfatante apresente ação. Ou seja, os resultados sugerem que a ação antibacteriana dos RL é mais pronunciada quando suas moléculas encontram-se predominantemente como monômeros em solução. Com estas análises, fica notório o efeito do pH na ação dos surfatantes, principalmente na dos RL. Estes, apesar de apresentarem potencial inferior ao do SDS em pH próximo ao neutro e básico, ainda demonstraram ação bacteriostática na maioria das condições estudadas. E em pH 5 mostraram maior ação bactericida quando comparado ao SDS. Observou-se também que o aumento da força iônica,

¹<https://chemaxon.com/products/calculators-and-predictors#pka>

com a adição de NaCl ao meio, promove uma melhora no potencial antibacteriano dos RL frente a *S. aureus*.

Isso torna a aplicação dos RL em alimentos muito promissora, pois como mencionado por Ray (2000), a maioria dos alimentos é levemente ácida e/ou apresentam sal em sua composição, e justamente esta classe de alimentos são foco de contaminação por *S. aureus*, como carnes e derivados, peixe, laticínios, ovos e a maioria dos vegetais.

5.1.3 Determinação da hidrofobicidade da superfície celular

O método de adesão microbiana a hidrocarbonetos (*microbial adhesion to hydrocarbons* – MATH) é um método que determina indiretamente a hidrofobicidade da superfície celular (GEERTSEMA-DOORNBUSCH et al., 1993), ele fornece informações a respeito de interações da célula microbiana com a interface fluídica (interface entre a fase aquosa e o hidrocarboneto) revelando a afinidade polar ou apolar da superfície celular.

As propriedades da superfície celular são características importantes dos microrganismos e afetam diretamente a interação entre os microrganismos e o ambiente externo, e, além disso, afeta o transporte de materiais, a taxa de crescimento e o metabolismo celular. Estas propriedades, incluindo a HSC, a carga da superfície celular, os componentes da superfície e a estrutura morfológica superficial influenciam umas às outras e também sofrem influência das condições ambientais (HAMADI et al., 2009).

Surfatantes podem apresentar diferentes efeitos na superfície celular, um deles é afetar suas propriedades devido à alteração de componentes da superfície celular quando os surfatantes são adsorvidos nesta. Por exemplo, Liu e cols. (2012b) observaram que RL podem modificar a HSC e a carga da superfície de *Penicillium simplicissimum* devido à mudança em grupos funcionais e na concentração de elementos (diminuição na concentração de C, P, S, K e aumentando a concentração de O e Cl).

Outro efeito que surfatantes podem causar na superfície celular é a mudança da estrutura e característica da membrana, o que culmina na alteração das funções desta, como o transporte nutrientes, geração de energia e a permeabilidade da membrana (SOTIVORA et al., 2008; BANAT et al., 2010). SOTIROVA et al., (2009)

relataram que os RL aumentam a permeabilidade da membrana de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, resultando no extravasamento de metabólitos. Também foi reportado que surfatantes podem induzir a modificação dos lipídeos e promover a redução da fluidez da membrana de *Arthrobacter* sp. (KALLIMANIS et AL., 2007).

Os efeitos dos RL nas propriedades da superfície celular dependem da concentração, do tipo de RL, da espécie de microrganismo, e das condições ambientais (YUAN et AL, 2007), bem como da razão entre regiões hidrofóbicas e hidrofílicas do envelope celular (ZHONG et AL., 2007).

As análises de determinação da HSC revelaram que a superfície celular de *S. aureus* nas amostras controle apresenta um percentual hidrofóbico de cerca de 50% em todas as condições estudadas, e que quando tratadas com os surfatantes em concentrações baixas (abaixo de suas CMC) não sofreram alterações significativas em sua hidrofobicidade ($p > 0,05$ no teste de Tukey) em todos os valores de pH (Tabela 3). Entretanto, na concentração de 5000 mg L^{-1} , os surfatantes reduziram significativamente a hidrofobicidade da superfície celular.

Os resultados revelaram também que, se tratando da HSC em elevadas concentrações dos surfatantes, o pH também apresenta influência, porém ao contrário do que as outras técnicas revelaram, em pH 5 há menor redução da HSC (de 50% para 13% para os RL) enquanto que em pH maiores reduziu-se para próximo de 0% após tratamento com concentrações de 5000 mg L^{-1} . Estes resultados podem ser explicados pela forma da adsorção dos surfatantes na superfície celular, que pode variar para cada condição.

Tabela 3 - Alteração no percentual hidrofóbico da superfície celular após tratamento com os surfatantes.

	[surfatante] (mg L^{-1})	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
	controle	49 ± 5	53 ± 4	55 ± 7	54 ± 2
	[RL] = 9,8	51 ± 4	-	-	-
	[SDS] = 9,8	52 ± 2	-	-	-
	[RL] = 19,5	41 ± 9	-	-	-
Hidrofobicidade (%)	[SDS] = 19,5	53 ± 1	53 ± 6	-	-
	[RL] = 39,1	-	36 ± 5	37 ± 9	45 ± 11
	[SDS] = 39,1	-	-	43 ± 7	49 ± 8
	[RL] = 5000	13 ± 6	2 ± 0,5	0 ± 6	0 ± 8
	[SDS] = 5000	31 ± 9	17 ± 13	2 ± 2	6 ± 2

Shao e cols., 2017 relataram que há duas formas de adsorção dos RL na superfície celular, uma é a adsorção de monômeros de RL, o que ocorre em baixas concentrações do surfatante, e a outra é a adsorção de micelas de RL (quando a concentração encontra-se acima de sua CMC). Na primeira forma de adsorção, dependendo das características da superfície celular, pode haver um aumento na sua HSC devido a interações entre os grupos polares da superfície celular e do surfatante. Nesta forma de interação a porção hidrofílica do surfatante une-se a superfície celular deixando exposta a porção hidrofóbica do surfatante, e isso pode gerar um aumento da HSC (Figura 9a), principalmente se a célula for pouco hidrofóbica. Tratando-se de *S. aureus*, não se notou aumento significativo de sua HSC, pois a superfície celular desta espécie já apresenta um elevado percentual hidrofóbico.

A outra forma de adsorção é a de micelas, essa em contrapartida faz com que o percentual hidrofóbico celular seja reduzido. Em micelas as porções hidrofóbicas dos surfatantes ficam inclusas, e a porção hidrofílica na superfície. Esta superfície hidrofílica das micelas pode interagir tanto com a superfície celular, quanto com o meio aquoso, fazendo com que a HSC seja reduzida (Figura 9b).

Figura 9 - Representação esquemática das formas de adsorção de surfatantes na superfície celular (a. abaixo da CMC, b. acima da CMC).

Fonte: autoria própria.

Em pH 5, como relata Ishigami e cols. (1987), os RL, em concentrações acima da CMC, ao invés de formarem agregados na forma de micela formam vesículas (Figura 10). As vesículas de RL são estruturas maiores que as micelas e não apresentam carga em sua superfície, pelo fato dos grupos carboxílicos da molécula de RL estarem protonados. Isso faz com que, primeiro, o recobrimento celular seja dificultado por tratar-se de estruturas grandes e, segundo, as interações entre os grupos hidrofílicos da superfície celular com os das vesículas de RL serem mais fracas, por estas últimas não apresentarem carga, ou seja, não há interações eletrostáticas unindo os agregados à superfície celular. Sendo assim, essa seria uma possível explicação para a menor redução do percentual hidrofóbico da superfície celular de *S. aureus* tratados com RL na concentração de 5000 mg L⁻¹ em pH 5, quando comparado com os resultados obtidos utilizando-se esta mesma concentração do surfatante em valores de pH maiores.

Figura 10 - Ilustração representativa da conversão sensível ao pH de agregados de RL.

Fonte: ISHIGAMI et al., 1987.

A HSC é um fator chave e afeta a eficiência de vários bioprocessos, como a interação célula-célula e a absorção de nutrientes, e é fator primordial na etapa inicial da formação de biofilmes (LIU et al, 2014b).

5.2 Atividade antibacteriana em células sésseis

5.2.1 Inibição da formação de biofilmes e redução de células viáveis em biofilmes pré-formados

Em ambientes favoráveis *S. aureus* possui a habilidade de formar biofilmes, apresentando, assim, menor sensibilidade a agentes externos, o que torna mais difícil sua eliminação, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização. Os biofilmes representam fonte importante de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxinfecções alimentares (CHAVANT et al., 2007). Por isso foi estudado o efeito dos surfatantes sobre as células sésseis, investigando tanto seu poder de inibição na formação de biofilmes, quanto sua ação em biofilmes pré-formados.

Assim como mostraramos análises de atividade antimicrobiana, os RL apresentaram melhor ação em pH ácido. Em pH 5, em concentrações maiores ou iguais a 39,1 mg L⁻¹, os RL mostraram-se eficazes na inibição total da formação de biofilmes (Figura 11a). E em concentrações maiores ou iguais a 156,2 mg L⁻¹ promoveram redução de mais de 80% do número de células viáveis presentes em biofilmes pré-formados (Figura 11 b).

Figura 11 - Atividade dos surfatantes sobre biofilmes de *S. aureus* em pH 5 (a. inibição da formação, b. redução de células viáveis).

Em pH 6, os RL em concentrações maiores ou iguais a 78,1 mg L⁻¹ causaram inibição de 86 a 99% na formação de biofilmes (Figura 12 a) e redução de 63 a 93% de células viáveis nos biofilmes (Figura 12 b). Pela comparação entre os RL e o SDS, nestes valores de pH, pode-se inferir que suas atividades antibacterianas em biofilme são equivalentes, principalmente em concentrações mais elevadas.

Figura 12 - Atividade dos surfatantes sobre biofilmes de *S. aureus* em pH 6 (a. inibição da formação, b. redução de células viáveis).

Para valores de pH maiores, os RL não apresentaram inibição significativa nas concentrações estudadas, porém, apesar de não terem demonstrado CIM e CBM nestas condições, mostraram capacidade de redução de viáveis nos biofilmes de cerca de 40 a 60% quando estes foram tratados em concentrações superiores a 76,1 mg L⁻¹ (Figura 13).

Figura 13 - Redução de células viáveis de biofilmes de *S. aureus* após tratamento com surfatantes em a. pH 7 e b. pH 8.

Dependendo da natureza da superfície de aderência (abiótica ou biótica), múltiplos parâmetros como a hidrofobicidade e a presença de moléculas como lectinas

ou adesinas podem estar associadas ao mecanismo de adesão. Sendo assim, moléculas anfipáticas com atividade interfacial, como os RL, são capazes de modificar interações célula-superfície e célula-célula, e com isso, diminuir a adesão bacteriana (NICKZAD; DÉZIEL, 2013), sendo esta uma possível explicação da ação dos RL sobre a formação de biofilmes.

Em todas as condições de análise da ação dos RL sobre biofilmes de *S. aureus* ficou evidente que os efeitos mais pronunciados ocorreram nas concentrações acima da CMC. Como já foi revelado pelas análises da HSC e discutido no item 5.1.3, os RL apresentam maior potencial de redução da hidrofobicidade quando encontram-se na forma de micelas. As células bacterianas com o percentual da HSC reduzido, ou seja, mais hidrofílicas, apresentam menor afinidade com a superfície hidrofóbica da superfície de adesão (poliestireno), assim como, também, menor afinidade entre elas e maior afinidade com o meio aquoso. A soma destes fatores faz com que seja facilitada a dispersão de células do biofilme no meio, assim como a ação antimicrobiana dos RL seja favorecida.

Contudo, notou-se a maior resistência destes organismos quando na sua forma séssil. Enquanto que uma concentração de 19,5 mg L⁻¹ de RL age como bactericida contra *S. aureus* na sua forma planctônica em pH 5, somente concentrações maiores ou iguais a 156,2 mg L⁻¹ de RL são capazes de reduzir quantidades superiores a 80 % das células viáveis. O mesmo foi observado na redução de biofilmes em pH 6. Essa maior resistência pode ser devido a três hipóteses como menciona Stewart e Costerton (2001), a primeira refere-se à penetração dificultada ou incompleta do agente pela presença de material polimérico; a segunda, ao microambiente químico modificado dentro do biofilme; e a terceira, ao estado fenotípico alterado de uma subpopulação dos microrganismos do biofilme.

5.2.2 Microscopia confocal

Os resultados da microscopia confocal revelaram que os RL na concentração de 312,5 mg L⁻¹ nos três valores de pH estudados (5, 6 e 7) apresentaram potencial de inibição da formação de biofilmes. Este fato foi evidenciado pela diferença na espessura dos biofilmes formados na presença dos surfatantes (amostras tratadas) em comparação às amostras controle. As amostras controle apresentaram espessura em torno de 35 µm, enquanto que as amostras tratadas não ultrapassaram 18 µm

(Figura 14). Essa diferença dos biofilmes cultivados na presença dos RL pode estar associada à influência que o surfatante exerce na HSC, que provavelmente nestas condições encontra-se reduzida pela ação já discutida dos RL em concentrações acima da CMC.

Como as propriedades da superfície celular estão intimamente relacionadas à adesão celular, etapa primordial da formação de biofilmes, a diminuição desta propriedade pode ter prejudicado o desenvolvimento normal destas estruturas como sugere (KRASOWSKA; SIGLER, 2014). Ou também os RL podem ter atuado matando células bacterianas, diminuindo assim o número de viáveis e comprometendo o desenvolvimento dos biofilmes.

Na outra condição de análise, em que os biofilmes foram tratados com os RL após sua formação, notou-se também considerável diminuição da espessura dos biofilmes quando comparado com os controles. Nestes notou-se ainda que na superfície exposta ao meio, havia uma concentração maior de células não viáveis (acúmulo da coloração vermelha nesta região), evidenciando que os RL apresentaram considerável poder de remoção e eliminação de microrganismos nas áreas mais externas (Figura 15).

Figura 14 - Imagens de microscopia confocal mostrando a ação dos RL na inibição da formação de biofilmes de *S. aureus* em pH 5, 6 e 7.

Figura 15 - Imagens de microscopia confocal mostrando a ação dos RL na remoção de biofilmes de *S. aureus* em pH 5, 6 e 7.

Como menciona McLandsborough e cols. (2006), surfatantes podem apresentar poder de penetração em camadas mais internas da matriz do biofilme, desta forma, podem se adsorver na interface, devido sua alta atividade superficial, e, assim, reduzir a tensão interfacial. Com isso, as forças atrativas entre as superfícies celulares e a superfície do substrato, que são responsáveis pela adesão bacteriana, são reduzidas, o que pode facilitar a remoção do biofilme. Schooling e cols. (2004) sugerem, como mecanismo de ação, que os RL podem, primeiramente, estar envolvidos na remoção das EPS da matriz dos biofilmes e posteriormente na destruição das microcolônias. Após a alteração do ambiente do biofilme pela ação do agente surfatante, as células ficariam mais sensíveis e seriam permeadas pelos RL com maior facilidade, o que levaria as células superficiais à morte. Isso explica o efeito pronunciado na superfície do biofilme e fornece indícios de que o tratamento sob regime de agitação possa reverter em resultados ainda mais promissores na remoção de biofilmes do que sob o tratamento estático.

Sabendo-se que a formação de biofilmes é indesejada tanto na área médica quanto na área de alimentos e considerando-se a atividade antimicrobiana, baixa toxicidade e ação na dispersão dos biofilmes, os RL podem ser uma boa estratégia tanto no tratamento, quanto na prevenção de doenças causadas por bactérias (RIENZO; MARTIN, 2016). Como sugestão de aplicação dos RL pode-se elencar o uso do biossurfatante para aumentar a efetividade dos antibióticos contra bactérias através da inibição de biofilmes (no tratamento de feridas com infecção crônica e em doenças periodontal profiláticas); a utilização na inibição da adesão e formação de biofilmes na superfície de materiais médicos, minimizando, assim, a proliferação bacteriana a pacientes (BRYERS, 2008); e na área alimentícia, o mesmo propósito pode ser alcançado em equipamentos da linha de produção, reduzindo o risco de contaminação dos alimentos.

5.3 Investigação do mecanismo de ação

Uma das técnicas aplicadas neste estudo para investigar o mecanismo de ação dos RL foi a espectroscopia na região do infravermelho.

De uma forma geral, poucas alterações foram observadas nos espectros das amostras tratadas com os surfatantes quando comparadas com as amostras controles, com exceção da região referente aos lipídeos de membrana (Figura 16).

Em todos os valores de pH os espectros revelaram uma redução na intensidade das bandas entre 3000 e 2800 nm, sugerindo que os tratamentos tanto com RL quanto com SDS reduzem a quantidade de lipídeos presentes na célula provavelmente pela solubilização destes componentes celulares. Nesta região observou-se também um aumento na intensidade da banda em $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$, principalmente na presença de concentrações elevadas dos surfatantes. Estas bandas são referentes aos grupos $>\text{CH}_2$ da membrana plasmática (MANTSCH; MCELHANEY, 1991). Um aumento na intensidade desta banda reflete o aumento do número de grupos $>\text{CH}_2$ nos fosfolipídeos de membrana.

Como menciona Dubois-Brissonnet (2016), a fim de sobreviver a perturbações como temperaturas adversas ou a presença de compostos tóxicos em doses sub-letais e também para manter uma fluidez ótima de membrana, células bacterianas podem alterar a estrutura dos ácidos graxos de seus fosfolipídeos mudando a razão de: 1) saturação e insaturação; 2) insaturações *cis* e *trans*; 3) estruturas ramificadas e não ramificadas; 4) o comprimento da cadeia de ácido graxo e 5) ciclopropanação de ácidos graxos.

Sendo assim, há duas possíveis explicações para o fato de ter-se notado um aumento no número de grupos $>\text{CH}_2$ dos fosfolipídeos de membrana, quando esta encontrou-se na presença dos surfatantes. A primeira é o aumento de ligações saturadas e a segunda, o aumento do comprimento da cadeia lipídica dos fosfolipídeos. Estes dois tipos de alterações conferem maior rigidez à estrutura da membrana devido a interações mais efetivas entre os grupos hidrofóbicos ou devido ao aumento do número de interações hidrofóbicas, respectivamente (Figura 17) (MURÍNOVÁ; DERCOVÁ, 2014).

Figura 16 - Espectros de FTIR de *S. aureus* em pH 5, 6, 7 e 8 (imagem inferior com enfoque nas bandas de lipídeos de membrana).

Figura 16 (cont.) - Espectros de FTIR de *S. aureus* em pH 5, 6, 7 e 8 (imagem inferior com enfoque nas bandas de lipídeos de membrana).

Figura 16 (cont.) - Espectros de FTIR de *S. aureus* em pH 5, 6, 7 e 8 (imagem inferior com enfoque nas bandas de lipídeos de membrana).

Figura 16 (cont.) - Espectros de FTIR de *S. aureus* em pH 5, 6, 7 e 8 (imagem inferior com enfoque nas bandas de lipídeos de membrana).

Figura 17 - Ilustração das alterações que podem ocorrer na membrana plasmática bacteriana a fim de aumentar sua rigidez. Em a) aumento do número de saturações, e em b) aumento do comprimento das cadeias dos ácidos graxos dos fosfolípidos de membrana.

Fonte: adaptação de MURÍNOVÁ; DERCOVÁ, 2014.

A fluidez da membrana é o parâmetro mais importante que determina a viabilidade de uma célula (MURÍNOVÁ; DERCOVÁ, 2014). Como menciona Segura e cols. (1999) a alteração na razão entre cadeias curtas e cadeias longas dos ácidos graxos está envolvida na regulação da fluidez da membrana em condições adversas. Ácidos graxos com cadeias de maior extensão podem impedir a penetração de agentes tóxicos à célula, diminuindo a sensibilidade a estes compostos. Porém, o aumento de saturações nos ácidos graxos da membrana pode ser considerado um mecanismo mais eficiente e foi descrito como estratégia de células bacterianas em diminuir a sensibilidade a compostos orgânicos tóxicos em diversas publicações (HEIPIEPER et al., 2003; MROZIK et al., 2005; DERCOVÁ et al., 2004 e OH et al., 2012).

O mecanismo pelo qual o aumento da rigidez da membrana promove a diminuição da sensibilidade a agentes tóxicos, mais especificamente, por surfatantes, é abordado por Moore (1997). Em altas concentrações de surfatantes passa a haver uma maior solubilização dos fosfolípidos de membrana e essa mistura quando atinge o limiar da concentração crítica de transição lamela/micela favorece-se a formação de micelas o que pode gerar o rompimento da membrana celular. Com o aumento do

número de interações hidrofóbicas entre os fosfolipídeos, diminui-se a fluidez da membrana, o que acaba por estabilizar esta estrutura e dificultar sua solubilização pelos surfatantes.

O aumento da rigidez da membrana celular pode conferir diminuição na sensibilidade a antimicrobianos como os RL, sendo, neste aspecto, vantajoso para a célula, porém, isso compromete o crescimento normal da população bacteriana, como mencionam Rogiers e cols. (2017) e como sugere os ensaios de *time kill* deste trabalho, onde há evidências de uma fase lag prolongada provavelmente devido a este fator.

Os dados dos espectros de FTIR associados aos resultados das outras análises sugerem que altas concentrações de SDS apresentam a capacidade de promover injúria na membrana plasmática bacteriana, mesmo com a tentativa, por parte da bactéria, de estabilizar sua membrana por meio de mudanças estruturais. Entretanto, com os RL o constatado diferiu. O possível efeito promovido por altas concentrações do biossurfatante é provavelmente contornado por estas modificações estruturais, como mostraram os resultados das curvas *time kill* e dos espectros de FTIR nos valores de pH 6, 7 e 8. Em pH 5, contudo, baixas concentrações de RL foram suficientes para agirem como bactericida, e nestas condições não foram observados indícios de mudanças estruturais na membrana plasmática. Duas possíveis explicações para isto são: a célula nesta condição não ser capaz de modificar com eficiência seus lipídeos de membrana e assim adquirir resistência; ou o mecanismo de ação pode ser outro que não o rompimento da membrana.

Como ressalta Mlynarcik (1981), a teoria quimiosmótica define a membrana citoplasmática como um transdutor de energia, onde esta é gerada por meio de uma força motriz de prótons. A perturbação da membrana por inserção de uma droga em sua estrutura fluida pode afetar seriamente a transdução de energia da célula. A maquinaria necessária para este processo são proteínas ou um sistema proteico presente na membrana. E também como menciona Sotirova e cols. (2008), os RL apresentam poder de interagir com proteínas de membrana. Tais proteínas ficariam prejudicadas em sua função de manter o gradiente de prótons ideal, o que causaria o dano a célula, principalmente em casos em que a concentração de prótons é maior no meio como no caso de pH baixo. Como relata Lolkema e cols. (1994) os principais acopladores de íons na membrana associados a processos bioenergéticos em bactérias são os íons H^+ e Na^+ , ou seja, além do aumento da concentração de prótons,

o aumento na concentração de íons sódio também pode ser um potencial fator do aumento de dano associado ao efeito dos RL, como mostrou os ensaios da atividade antimicrobiana dos RL associados ao aumento da força iônica promovido pela adição de NaCl ao meio.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

S. aureus, como a maioria das bactérias, se propagam por meio de fissão binária, Zhou e cols. (2015) descrevem o mecanismo pelo qual isto ocorre nesta espécie. Os autores relatam a formação de um septo que divide a célula esférica em duas células filhas hemisféricas e que após algum estresse na parede celular, há a ruptura instantânea do anel periférico circundante, havendo a separação das células filhas que ficam unidas por um ponto principal (semelhante a uma dobradiça).

Células em processo de fissão binária foram visualizadas por MEV em todas as amostras controle (Figura 18). Nestas imagens nota-se células íntegras com tamanhos e morfologias uniformes e algumas em processo de divisão ou recém fissionadas.

Figura 18 - Imagens de MEV de *S. aureus* cultivados em pH 5, 6 e 7 sem a presença de surfatantes (setas em branco indicam células no processo de divisão e em amarelo indicam células recém fissionadas).

Com o intuito de ter-se um parâmetro comparativo entre imagens de células viáveis e de células com injúria, realizou-se a microscopia de *S. aureus* submetidos a uma condição extrema de tratamento (SDS na concentração de 5000 mg L⁻¹ em pH 5) (Figura 19). Nesta imagem nota-se grande quantidade de um material particulado (pequenas esferas na escala nanométrica) envolto por uma estrutura semelhante a uma rede. Observa-se também que a ação do SDS, mesmo em elevadas concentrações, não foi capaz de promover danos aparentes na estrutura externa de *S. aureus*, como pode ser visto na figura 19 pela presença de células íntegras.

Figura 19 - Imagem de MEV de *S. aureus* em pH 5 tratadas com SDS em 5000 mg L⁻¹.

Material semelhante ao encontrado nas amostras que receberam tratamento de elevadas concentrações de SDS, porém em menor quantidade, foram visualizadas nas amostras tratadas com RL na CIM (9,8 mg L⁻¹) em pH 5. Notou-se também nesta imagem a presença de células de tamanhos e morfologias alteradas (Figura 20), distintas das de uma célula normal.

Figura 20 - Imagem de MEV de *S. aureus* em pH 5 tratadas com RL em 9,8 mg L⁻¹. (setas em branco indicando a presença de material particulado e setas em amarelo indicando células com morfologia anormal).

Apesar dos danos promovidos pelos RL na concentração de 9,8 mg L⁻¹ em pH 5 sobre as células de *S. aureus*, nestas condições, o biossurfatante atua apenas como bacteriostático. Ou seja, algumas células podem ter sofrido dano, porém outras continuaram viáveis, e isso é notado pelo elevado número de células na fase de divisão celular. Porém a maioria destas apresentou-se deformadas, com tamanhos anormais, ou com o anel periférico de divisão alargado, quando comparado ao controle (Figura 21b); e as que sofreram fissão, não a realizaram por completo, ficando as células filhas aderidas por uma grande área de contato, diferente das amostras controle em que as células recém fissionadas permaneceram unidas por uma fina região do anel periférico (Figura 21a).

Figura 21- Imagens de MEV indicando as principais alterações morfológicas de células de *S. aureus* submetidas ao tratamento com RL 9,8 mg L⁻¹ em pH 5 (a, alteração na fissão das células filhas e b, alteração no anel periférico de divisão) (setas em branco indicando comportamento anômalo).

Possível explicação para o constatado é abordado por Sugai e cols. (1995). Em seu estudo é relatado que duas enzimas são responsáveis pela formação de poros no anel periférico de divisão e também pela separação por completo de algumas células filhas, evitando a formação de grandes aglomerados. Estas enzimas, a endo-beta-N-acetilglucosaminidase e a N-acetilmuramil-L-alanina amidase, promovem perfurações na parede celular, facilitam o rompimento do anel periférico quando as células filhas atingem a maturação ideal. Os autores relatam também que células mutantes com deficiência de tais enzimas formam grandes aglomerados, assim como os que foram encontrados no presente estudo em concentrações subletais do agente (Figura 22). Isto sugere que, talvez os RL possam interferir na ação apropriada destas enzimas ou, em resposta a ação antimicrobiana dos RL, a população bacteriana induza mudanças genéticas a fim de propiciar a formação de grandes aglomerados e diminuir sua sensibilidade ao agente, como sugere Haaber e cols. (2012). Em seu estudo os

autores mostram que esta forma de arranjo de *S. aureus* promove proteção contra a ação letal de antimicrobianos, e que esta proteção é mediada por meio de uma barreira exercida pela matriz polimérica agregada constituída majoritariamente por PIA. Pouco ainda se sabe sobre os fatores que promovem a agregação de *S. aureus*, porém foi observado que diferentes condições ambientais afetam sua habilidade de agregação, como a presença de NaCl, de glicose ou a disponibilidade de oxigênio. Porém sabe-se que concentrações sub-inibitórias de antibióticos induzem a agregação de *S. aureus* pela modulação da produção de PIA, que ocorre com o estímulo da expressão do *operon ica* (gene codificador de enzimas responsáveis pela produção de PIA) (HAABER et al.; 2012).

Como pode ser verificado na figura 22, em todas as amostras que receberam tratamento em concentrações subletais (CIM em pH 5 e 6, e 5000 mg L⁻¹ em pH 7) de RL, houve a formação de grandes aglomerados.

Figura 22 - Imagens de MEV de *S. aureus* comparando amostras controle e amostras tratadas com concentrações subletais de RL em pH 5, 6 e 7.

A hipótese da interferência dos RL na etapa de divisão celular sugere possível explicação ao efeito inibitório do biossurfatante, assim como corrobora com os resultados dos ensaios da determinação da hidrofobicidade celular. Era de se esperar que com a diminuição da hidrofobicidade da superfície celular (efeito promovido principalmente em altas concentrações de RL) houvesse maior dispersão das células bacterianas em meio aquoso, porém contrariando esse pressuposto, nas condições já referidas, houve maior agregação. Isso porque, apesar de estarem menos hidrofóbicas, as células não são facilmente dispersas em meio aquoso, pois, estão unidas umas às outras pela separação incompleta das células filhas no processo de divisão.

Na única condição em que houve CBM (em pH 5 na concentração de $19,5 \text{ mg L}^{-1}$) observou-se ausência de células na fase de citocinese e grande dispersão entre as células (Figura 23), diferentemente dos grandes aglomerados que se formaram em concentrações subletais do agente. Isto indica que realmente, nesta condição ($19,5 \text{ mg L}^{-1}$ em pH 5) a indução da resposta à presença do RL não ocorre de forma eficiente, tornando-as susceptíveis a ação do biossurfatante.

Figura 23 - Imagem de MEV de *S. aureus* em pH 5 tratadas com RL em 19,5 mg L⁻¹.

Fato interessante foi notado nas amostras tratadas em pH 7 com concentração de RL em 5000 mg L⁻¹. Nestas houve alterações notáveis na morfologia das células bacterianas. Como pode ser visto na figura 24, os arranjos celulares se formaram como grandes aglomerados envoltos por uma estrutura semelhante a uma cápsula.

Esta estrutura anômala pode ser composta por adesina polissacarídica que *S. aureus* é capaz de expressar em condições adversas como relata Cramtom e cols. (2001). Nos espectros de FTIR também foi observado que nestas condições há um aumento da banda referente a polissacarídeos, indicando que na amostra tratada há mais destes componentes em relação ao controle.

Figura 24 - Imagem de MEV de *S. aureus* em pH 7 tratadas com RL em 5000 mg L⁻¹.

Na concentração de CIM em pH 6 (39,1 mg L⁻¹) evidências semelhantes as do CIM em pH 5 foram observadas. Nota-se a presença de material particulado em pequenas quantidades, células com deformações e algumas rompidas (Figura 25).

Figura 25 - Imagem de MEV de *S. aureus* em pH 6 tratadas com RL em $39,1 \text{ mg L}^{-1}$ (setas em branco indicando material particulado e setas em amarelo indicando rompimento celular).

As imagens microscópicas de *S. aureus* tratadas com RL em concentrações de 5000 mg L^{-1} também mostraram presença de material particulado, porém em maior quantidade (Figura 26), indicando que esta é proporcional a concentração do biossurfatante. Este material particulado na forma de esferas nanométricas pode-se tratar de agregados do surfatante (micelas, vesículas, etc), ou do surfatante associado com lipídeos de membrana, envoltos por uma estrutura semelhante a uma rede, que pode ser composta por adesinas (PIA) que são expressas em maior quantidade quando as células se encontram em condições desfavoráveis.

Figura 26 - Imagens de MEV de *S. aureus* em pH 5 e 6 tratadas com RL em 5000 mg L⁻¹

Em suma, os resultados de MEV evidenciaram que os RL promovem alteração na membrana celular de *S. aureus* principalmente em concentrações mais elevadas e em valores de pH menores, o que fica notório pela presença de alterações

morfológicas nestas amostras. Sugeriram também que talvez os RL possam induzir a adaptações genéticas em *S. aureus*, que se agregam de forma anormal na presença de doses sub-letais do biossurfatante. Além disso, na condição em que os RL atuaram como bactericida (19,5 mg L⁻¹ em pH 5), *S. aureus* não foram capazes de se agregarem ficando mais expostos a ação do biossurfatante.

6 CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que o pH exerce grande influência na ação antibacteriana dos surfatantes frente a *S. aureus*. Os ensaios de CIM e CBM mostraram que os RL apresentam ação bacteriostática em pH 6 e ação bactericida superior à do SDS em pH 5. Neste valor de pH, a CBM do SDS foi duas vezes maior que a dos RL. Os resultados mostraram também a interferência positiva do NaCl na ação antimicrobiana dos RL. Com a adição de sal no meio de cultivo, os RL passaram a apresentar ação bactericida em pH 6 e 7.

As análises da hidrofobicidade da superfície celular evidenciaram que os RL, assim como o SDS, apresentam grande capacidade de redução do percentual hidrofóbico da superfície de *S. aureus* quando em altas concentrações, o que pode ser um dos motivos pelo qual o bio surfatante apresenta potencial de remoção de biofilmes.

A ação do bio surfatante sobre células sésseis também mostrou ser influenciada pelo pH do meio. Em pH ácido os RL apresentaram grande poder tanto de inibição da formação, quanto de redução das células viáveis nos biofilmes, principalmente em concentrações mais elevadas do bio surfatante, nas quais se equiparou à ação do SDS. Em pH neutro e básico, os RL, apesar de não mostrarem resultados significativos na inibição de formação de biofilmes, reduziram consideravelmente o número de células viáveis em biofilmes pré-formados.

Os resultados da análise de FTIR em consonância com os da curva *time kill* sugeriram que a menor sensibilidade de *S. aureus* aos RL quando em valores de pH maiores deve-se a mudanças estruturais promovidas na membrana plasmática a fim de compensar as desestabilizações promovidas pelo agente.

S. aureus produziram material polimérico na presença de altas concentrações de RL em pH 7 além de alto nível de aglomeração de suas células em doses sub-letais do agente sugerindo ser este um mecanismo de proteção da célula à presença dos RL.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O efeito promissor do sal na ação antimicrobiana dos RL pode ser abordado com maior nível de detalhamento. As mesmas técnicas realizadas neste trabalho poderiam ser aplicadas para investigação da ação conjunta do NaCl e dos RL.

A determinação da CMC dos RL em diferentes valores de pH, na ausência ou presença de sal, se faz importante para ter-se uma melhor interpretação do mecanismo de ação dos RL.

As possíveis alterações nos fosfolípidos de membrana reveladas pela espectroscopia FTIR, podem ser mais bem justificadas por análises que fornecem informações sobre a composição destes componentes na membrana como a cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos, por exemplo.

8 REFERÊNCIAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT 10 from soybean oil refinery waste. **Langmuir**. v. 17, n. 5, p. 1367-1371, 2001.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 86, p. 1323–1336, 2010.

ABRAHAM, N. M.; JEFFERSON, K. K. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. **Microbiology**. v. 158, p. 1504–1512, 2012.

ACHESON, D. W. K. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. 3 ed., p. 485- 501, 2000.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2 ed., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.

AL-QADIRI, H. M.; LIN, M.; AL-HOLY, M. A.; CAVINATO, A. G.; RASCO, B. A. Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm⁻¹). **Journal of Food Science**. v. 73, p. 54-61, 2008b.

ARANDA FJ, ESPUNY MJ, MARQUES A, TERUEL JA, MANRESA A, ORITZ A. Domain Formation by a *Rhodococcus* sp. Biosurfactant Trehalose Lipid Incorporated Into Phosphatidylcholine Membranes. **Langmuir**. v. 23, P. 2700–2705, 2007.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**. v. 36, n. 6, 848-858, 2013.

ARCHER NK, MAZAITIS MJ, COSTERTON JW, LEID JG, POWERS ME, SHIRTLIFF ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**. v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.

BALABAN, N; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 6, p. 1-10, 2000.

BANAT, I.M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M.G., FRACCHIA, L., SMYTH,

T.J., MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and

future potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 87,n. 2, p. 427–444, 2010.

BASKETTER, D. A.; YORK, M.; McFADDEN, J. P.; ROBINSON M. K. Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. **Contact Dermatis.** v. 51, n. 1, p. 1-4, 2004.

BEHRMAN, R. E.; KLIEGMAN R.; NELSON, W. I. **Textbook of Pediatrics.** 15 ed., 1995.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. V. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology.** v. 50, p. 33-44, 2014.

BOZZOLA, J. J. Electron Microscopy. **Wiley.** 2001

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions. **International Journal of Food Science & Technology.** v. 43, n. 12, p. 2163 – 2176, 2008.

BRYERS J. D. Medical biofilms. **Biotechnol. Bioeng.** v. 100, p. 1–18, 2008.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE B.; TALON R.; HEBRAUD M.; BERNARDI T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potentialby bacteria. **Journal of Microbiology Methods.** v. 68, n. 3, p. 605-612, 2007.

CHEMAXON, disponível em <https://chemaxon.com/products/calculators-and-predictors#pka>, acessado em abril de 2018.

CHEN, L.; WEN, Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Science.** v. 3, p. 66–73, 2011

CLSI M07-A9. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition Vol. 32 No. 2, 2012.

COSTERTON J. W., STEWART P. S., GREENBERG E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science.** v. 284, p. 1318–1322, 1999.

CRAMTOM, S. E.; ULRICH, M.; GOTZ, F.; DORING, G. Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infect Immun.** v. 69, n. 6, p. 4079–4085, 2001.

CUNHA, A. S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em Revista.** v. 2, n. 1, p. 105-114, 2007.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration and Biodegradation.** v.3, p. 227-245, 1995.

K. DERCOVÁ, M. CERTIK, A. MAL'OVÁ, AND Z. SEJAKOVÁ. Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 54, p. 251–254, 2004.

DESAI, J. D., BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 61, p. 47–64, 1997.

DÍAZ-VISURRAGA, J.; GARCIA, A.; CÁRDENAS, G. Lethal effect of chitosan-Ag (I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy. **J Appl Microbiol**. v. 108, n. 2, p. 633-46, 2010.

DOYLE R. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. **Microb. Infect**. v. 2, p. 391–400, 2000.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

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

Drago (2016).

DUBOIS-BRISSENET, F.; TROTIER, E.; BRIANDET, R. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. **Frontiers in microbiology**. v. 7, n.1673, 2016.

FITZGERALD, K. A., DAVIES, A.; RUSSELL, A. O. Uptake of ¹⁴C chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. **Microbiology Letters**. v. 60, p. 327-332, 1989.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Evidence for ica ADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 1973–1976, 2005.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A.; GANESH, V. K.; HOOK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 12, p. 49–62, 2014.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, editora Atheneu, 2008.

FRANKER H. S., Foodborne staphylococcal illness. **Lancet**. v. 336, p. 1044-1046, 1990.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food microbiology**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 494 p, 1988.

GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.; VANDERMEI, H.; BUSSCHER, H. J. Microbial cell surface hydrophobicity The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). **Journal of Microbiological Methods**. v. 18, n. 1, p. 61-68, 1993.

GIAOURIS E., CHAPOT-CHARTIER M., BRIANDET R. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. **Int. J. Food. Microbiol.** v. 131, p. 2–9, 2009.

GOULTER R., GENTLE I., DYKES G. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. **Lett. App. Microbiol.** v. 49, p. 1–7, 2009

GUERREIRO, M.G. **Bacteriologia Especial com interesse em saúde animal e saúde pública**, Editora sulina, Porto Alegre, 1 ed., 1984.

HAABER, J.; COHN, M. T.; FREES, D.; ANDERSEN, T. J.; INGMER, H. Planktonic Aggregates of *Staphylococcus aureus* Protect against Common Antibiotics. **Plos One**. v. 7, n. 10, 2012.

HABA E, PINAZO A, JAUREGUI O, ESPUNY MJ, INFANTE MR, MANRESA A. Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* 47t2 Ncbim 40044. **Biotechnol Bioeng**. v. 81, p. 316–322. 2003.

HABA, E.; PINAZO, A.; PONS, R.; PÉREZ, R.; MANRESA, A. Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1838, n 3, p. 776–783, 2014.

HAMADI, F., LATRACHE, H., ZEKRAOUI, M., ELLOUALI, M., BENGOURRAM, J. Effect of pH on surface energy of glass and Teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. **Mater. Sci. Eng.: C** v. 29, n. 4, p. 1302–1305, 2009.

HAZEN K. Relationship between expression of cell surface hydrophobicity protein 1 (CSH1p) and surface hydrophobicity properties of *Candida dubliniensis*. **Curr. Microbiol.** v. 48, p. 447–451

HEILMANN, C. Adhesion mechanisms of *Staphylococci*. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 715, p. 105–123, 2011.

H. J. HEIPIEPER, F. MEINHARDT, AND A. SEGURA. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology

and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. **FEMS Microbiology Letters**. v. 229, n. 1, p. 1–7, 2003.

HEIPIEPER J., CORNELISSEN S., PEPI M. Surface properties and cellular energetics of bacteria in response to the presence of hydrocarbons. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, ed Timmis K. N., editor. (Heidelberg, Berlin: Springer;), p. 1615–1624, 2010.

HELM, D.; LABISCHINSKI, H.; SCHALLEHN, G.; NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **J Gen Microbiol**. v. 137, n. 1, p. 69-79, 1991.

IBRAHIM, S. A., YANG, H. SEO, C. W. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* 157: H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Chemistry**. v. 109, n.1, p. 137-143, 2008.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAROKA, H. The pH sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. **Chemistry Letters**. v. 5, p. 763-766, 1987.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.

KABARA, J . J . Antimicrobial agents derived from fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 6, n. 1, p. 397-403, 1984.

KALLIMANIS, A., FRILLINGOS, S., DRAINAS, C., KOUKKOU, A.I. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. Appl. **Microbiol. Biotechnol**. v. 76, n. 3, p. 709–717, 2007.

KOCHKODAN V., TSARENKO S., POTAPCHENKO N., KOSINOVA V., GONCHARUK V. Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO₂. **Desalination**. v. 220, p. 380–385, 2008.

KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cell Infection and Microbiology*. v. 4, p. 112, 2014.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, n. 1, p. 22 – 32, 1999.

MENGSHI LIN, MURAD AL-HOLY, HAMZAH AL-QADIRI, DONG-HYUN KANG, ANNA G. CAVINATO, YIQUN HUANG, AND BARBARA A. RASCO. Discrimination of Intact and Injured *Listeria Monocytogenes* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 19, p. 5769 – 5772, 2004.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 4, n. 128, 2014.

LIU, Z., ZENG, Z., ZENG, G., LI, J., ZHONG, H., YUAN, X., LIU, Y., ZHANG, J., CHEN, M., LIU, Y., XIE, G.,. Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on adsorption of phenol by *Penicillium simplicissimum*. **Bioresour. Technol.** v. 110, p. 468–473, 2012b.

LIU, Y., MA, X., ZENG, G., ZHONG, H., LIU, Z., JIANG, Y., YUAN, X., HE, X., LAI, M., HE, Y. Role of low-concentration monorhamnolipid in cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas aeruginosa*: adsorption or lipopolysaccharide content variation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 98, n. 24, p. 10231–10241, 2014b.

LOLKEMA, J. S.; SPEELMANS, G.; KONINGS, W. N. Na⁺ -coupled versus H⁺ -coupled energy transduction in bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1187, p. 211-215, 1994.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**. v. 178, p. 175-183, 1996.

MANTSCH, H. H.; MCELHANEY, R. N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 57, p. 213-226, 1991.

McLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: At the Interface Between Biophysics and Microbiology. **Foods Biophysics**. v. 1, n. 2, p. 94 – 114, 2006.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. **The Journal of Hygiene**. v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MLYNARC, I. K. D.; DENYER, S. P.; H U G O, W. B. A study of the action of a bisquaternary ammonium salt, an amine oxide and an alkoxy phenylcarbamic acid ester on some metabolic functions in *Staphylococcus aureus*. **Microbios**. v. 30, p. 27-35, 1981.

MOORE, S. L. **The mechanisms of antibacterial action of some nonionic surfactants**. 1997. Tese de Doutorado. The University of Brighton in collaboration with Unilever Research, Port Sunlight, 1997.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Biosurfactants: Research, Trends and Applications**. CRC Press, London, New York, 2014.

A. MROZIK, S. ŁABUZEK, AND Z. PIOTROWSKA-SEGET. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. **Microbiological Research**. v. 160, n. 2, p. 149–157, 2005.

MURÍNOVÁ, S.; DERCOVÁ, K. Response Mechanisms of Bacterial Degraders to Environmental Contaminants on the Level of Cell Walls and Cytoplasmic Membrane. **International Journal of Microbiology**. v. 2014, p. 1 – 16 , 2014.

MURPHY; DAVIDSON, **Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging**. Wiley-Blackwell, ed. 2, 2013.

MURTEY, M.; RAMASAMY, P. Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences, **Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences**, 2016.

MURZYN A., KRASOWSKA A., AUGUSTYNIAK D., MAJKOWSKA-SKROBEK G., ŁUKASZEWICZ M., DZIADKOWIEC D. The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* –infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 310, p. 17–23, 2010

NAUMANN, D., FIJALA, V., LABISCHINSKI, H. & GIESBRECHT, P. The Differentiation and Identification of Pathogenic Bacteria Using FTIR and Multivariate Statistical Analysis. **Mikrochimica Acta**. v. 1, p. 373-377, 1988a.

NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. R.A. Meyers (Ed.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 102–131, 2000.

NICKZAD, A.; DÉZIEL, E. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? **Letters in Applied Microbiology**. v. 58, n. 5, p. 447-453, 2013.

NIELSEN, L.; KADAVY, D.; RAJAGOPAL, S.; DRIJBER, R.; KENNETH, W. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: Membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. **Applied Environmental Microbiology**. v. 71, p. 5171–5176, 2005.

NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**. v. 18, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S.; CARVALHO, J. W. P.; AIRES, C. P. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 10, p. 7864-7873, 2017.

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

O'GARA, J.P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Letters**. v. 270, p. 179–188, 2007.

H. Y. OH, J. O. LEE, AND O. B. KIM. Increase of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by the deletion of two regulator genes, *fadR* and *marR*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 96, n. 6, p. 1619–1627, 2012.

OLIVEIRA, M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na industria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 69, n. 3, p. 277-84, 2010.

PADDOCK, S. W. Confocal Laser Scanning Microscopy. **BioTechniques**. v. 27, n. 5, p. 992-1004, 1999.

PALMER J., FLINT S., BROOKS J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 34, p. 577–588, 2007

PEREIRA M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR J. P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, p. 391-395, 1995.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3 ed. CRC Press LLC. Florida 2000.

Ray, S. J. An Investigation into the Effects of Salt Concentration on Surfactant Adsorption Using a Quartz Crystal Microbalance. Master's Thesis, University of Tennessee, 2008.

REIS, R. S. **Proteômica de pseudomolas aeruginosa visando o aumento da produção de ramnolipídio**. 2008. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

RIENZO, M. A. D.; MARTIN, P. J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. **Process Biochemistry**. v. 51, n. 7, p. 820 – 827, 2016.

RODRIGUES D., ELIMELECH M. Role of type 1 fimbriae and mannose in the development of *Escherichia coli* K12 biofilm: from initial cell adhesion to biofilm formation. **Biofouling J. Bioadhes. Biofilm Res.** v. 25, p. 401–411, 2009.

ROGIERS, G.; KEBED, B. T.; LOEY, A. V.; MICHIELS, C. W. Membrane fatty acid composition as a determinant of *Listeria monocytogenes* sensitivity to *trans*-cinnamaldehyde. **Research in Microbiology.** p. 1-11, 2017.

ROSENBERG, M. Bacterial adherence to hydrocarbon: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters.** v. 22, p. 289–295, 1984a.

RUSSELL, A. O. Mechanisms of bacterial resistance to nonantibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology.** v. 71, n. 3, p. 191 -201, 1991.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Perspectives in Medicine.** v. 2, n. 11, p. 1-25, 2012.

SAINI, G. Bacterial hydrophobicity: assessment, techniques, applications and extension to colloids. Dissertação, Oregon State University, 2010.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 3007, p. 246-253, 2007.

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

SCHILLACI, D.; ARIZZA, V.; DAYTON, T.; CAMARDA, L.; STEFANO, V. D. In vitro antibiofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology.** v. 47, p. 433-438, 2008.

SCHLAFFER, S.; MEYER, R. L. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods.* v. 138, p. 50-59, 2017.

SCHOOLING, S. R.; CHARAF, U. K.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. **Biofilms.** v. 1, n. 2, p. 91 – 99, 2004.

SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. **Pharmacological Reviews.** v. 24, p. 583-655, 1972.

SEGURA A, DUQUE E, MOSQUEDA G, RAMOS JL, JUNKER F. Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. **Environmental Microbiology**. v. , n. 3, p. 191–198, 1999.

SEN, R. **Biosurfactants** . Nova York : Springer Verlag, 331 p. 2012, pag. 45.

SHAO, B.; LIU, Z.; ZHONG, H.; ZENG, G.; LIU, G.; YU, M.; LIU, Y.; YANG, X.; LI, Z.; FANG, Z.; ZHANG, J.; ZHAO, C. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. **Microbiological reaserach**. v. 200, p. 33 – 44, 2017.

SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology**. v. 52, p. 81–104, 1998.

SILVA, S. S. Aplicação de ramnolipídeos no controle de biofilmes de patógenos alimentares. 2016.

SINDE E., CARBALLO J. Attachment of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylenethe influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiol**. v. 17, p. 439–447, 2000.

A. SOTIROVA, D. SPASOVA, E. VASILEVA-TONKOVA, D. GALABOVA. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol Res**. v. 164, pp. 297-303, 2009.

SOTIROVA, A. V.; SPASOVA, D. I.; GALABOVA; D. N. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positve and Gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**. v. 56, p. 639–644, 2008.

SOTIROVA, A., SPASOVA, D., VASILEVA-TONKOVA, E., GALABOVA, D. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Res**. v. 164, n. 3, p. 297–303, 2009

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**. v. 358 p. 135-138, 2001.

M SUGAI, H KOMATSUZAWA, T AKIYAMA, Y M HONG, T OSHIDA, Y MIYAKE, T YAMAGUCHI, AND H SUGINAKA. Identification of endo-beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, n. 6, p. 1491 – 1496, 1995.

VAN LOOSDRECHT M., NORDE W., ZEHNDER A. Physical chemical description of bacterial adhesion. **J. Biomater. Appl**. v. 5, p. 91–106, 1990.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**. v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K.I. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., v. 5, part B, Springer-Verlag, New York, NY, 2012.

WHO, World Health Organization. **Food Safety Fact Sheet**. 2017. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>> Acessado: em 15 out. 2017.

YUAN, X., REN, F., ZENG, G., ZHONG, H., FU, H., LIU, J., XU, X. Adsorption of surfactants on a *Pseudomonas aeruginosa* strain and the effect on cell surface lyphohydrophilic property. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 76, n. 5, p. 1189–1198, 2007.

ZHONG, H., ZENG, G.M., YUAN, X.Z., FU, H.Y., HUANG, G.H., REN, F.Y., 2007. Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 77, n. 2, p. 447–455, 2007.

ZHOU X, HALLADIN DK, ROJAS ER, KOSLOVER EF, LEE TK, HUANG KC, THERIOT JA. Bacterial division. Mechanical crack propagation drives millisecond daughter cell separation in *Staphylococcus aureus*. **Science**. v. 348, n. 6234, p. 574 – 578, 2015.