UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JAKELINE DE FREITAS FERREIRA

**Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos contra bactérias
patogênicas de importância alimentar**

**Study of the antimicrobial activity of rhamnolipids against pathogenic
bacteria of food importance**

SÃO CARLOS-SP
2017

JAKELINE DE FREITAS FERREIRA

**Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos contra bactérias
patogênicas de importância alimentar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

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

SÃO CARLOS-SP
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

F383e Ferreira, Jakeline de Freitas
 Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos
 contra bactérias patogênicas de importância alimentar /
 Jakeline de Freitas Ferreira; orientadora Marcia
 Nitschke. São Carlos, .

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
 Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração
 em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
 Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, .

 1. Atividade antimicrobiana. 2. Ramnolipídeo. 3.
 Bacillus cereus. 4. Listeria monocytogenes. 5.
 Staphylococcus aureus. 6. Escherichia coli. 7.
 Salmonella enterica. I. Título.

À minha amada mãe Ivone pelo total apoio, carinho e orientações na vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e todas as graças até aqui alcançadas.

Agradeço a minha família, minha mãe Ivone, meu pai Ferreira, minha irmã Rackel, meu cunhado Éder e o meu sobrinho/filho Théo. Vocês são o motivo de toda essa caminhada, esperança e minha motivação.

Agradeço em especial ao meu irmão Jefferson, que não se encontra mais presente entre nós. Irmão você foi e é a minha inspiração de toda força e determinação para os estudos. Jamais esqueço do aluno e pessoa brilhante que era.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Marcia Nitschke por toda paciência, ensinamentos, dedicação e comprometimento com o trabalho.

Aos meus amigos Estevão Vieira e Debora Mayer vocês foram personagens essenciais para eu conseguir terminar esse ciclo. Obrigada por todo carinho, risadas, apoio, estudos e momentos de descontrações que vocês me proporcionaram.

Aos meus amigos do IQSC e do laboratório, Ariel Viscardi, Ma Hui Lee, João Henrique Fabri, Súmeria Silva e Crisiane Marangon, pela ajuda, amizade, alegrias e risadas.

Aos meus amigos de pós-graduação, Deliane, Luciano, Márcio, Kramer, Francisco, José, Ana, Marcela, Gabriela, pela ajuda, apoio e risadas.

Agradeço aos técnicos Marília Milanetto e João Pedro do Laboratório Biotecnologia Microbiana por toda ajuda e ensinamentos.

Ao técnico Wagner Correr do Laboratório de Microscopia Eletrônica por toda ajuda e disponibilidade nas análises do MEV.

À técnica Luana Cheven do Laboratório de Ensino de Biologia no Instituto de Física de São Carlos pela ajuda, apoio, ensinamentos e amizade.

À professora Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan pelos ensinamentos e auxílios.

Ao professor Dr. Valtencir Zucolotto e meu amigo Olavo Santos por toda ajuda na análise da espectroscopia do infravermelho.

À professora Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) do IFSC -USP, e ao professor Dr. Stanislaw Bogusz Junior do Departamento de Química e Física Molecular do IQSC- USP, pelas contribuições e sugestões no exame de qualificação do mestrado.

À secretária da Bioengenharia, Marcia, por toda disposição em ajudar, paciência e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC – USP.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

“Porque há esperança para a árvore, que, se for cortada, ainda se renovará, e não
cessarão os seus renovos.
Se envelhecer na terra a sua raiz, e o seu tronco morrer no pó,
Ao cheiro das águas brotará, e dará ramos como uma planta.”

(Jó 14: 7-9)

RESUMO

FERREIRA, J. F. **Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos contra bactérias patogênicas de importância alimentar**. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos – EESC/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/ Instituto de Química de São Carlos - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

As bactérias patogênicas são os principais agentes que contaminam alimentos e podem prejudicar a saúde humana. Para tentar combater e controlar a contaminação de alimentos investigam-se novos compostos que apresentam atividade antimicrobiana. O ramnolipídeo (RL) é um biossurfatante (BS) produzido por *Pseudomonas* spp. que apresenta elevada biodegradabilidade e, baixa toxicidade além de potencial antimicrobiano. O objetivo desse trabalho foi estudar a atividade antimicrobiana do RL frente às bactérias patogênicas Gram positivas, *Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112), *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095) e Gram negativas, *Escherichia coli* (EHEC) (ATCC 43895) e *Salmonella enterica* (ATCC 13076) além de contribuir na elucidação do mecanismo de ação destes compostos. Os testes de susceptibilidade ao RL foram realizados a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) utilizando a técnica de micro-diluição. O efeito do pH sobre a atividade antimicrobiana foi avaliado na faixa de pH 5 a 9. Para avaliação do mecanismo de ação foram realizados ensaios de permeabilidade celular, espectroscopia de infravermelho e hidrofobicidade celular. O RL apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias *B. cereus* em CIM $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM $39,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, e para *L. monocytogenes* CIM $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM $312,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para *B. cereus* apresentou efeito bactericida a partir de 30 minutos na CBM, e para *L. monocytogenes* em 8 horas de incubação com o RL na CBM. As bactérias Gram negativas *E. coli* e *S. enterica* mostraram-se resistentes ao RL. O pH influenciou a ação antimicrobiana do RL sendo mais efetivo em pH mais ácidos. O tratamento com RL promoveu redução da hidrofobicidade da superfície celular das bactérias sensíveis. Os espectros infravermelhos evidenciaram alterações na composição química da membrana/parede celular principalmente para bactérias Gram positivas. A permeabilidade da membrana celular aumentou de acordo com o aumento da concentração de RL. A atividade antimicrobiana do RL foi evidenciada para as bactérias Gram positivas sendo mais sensíveis *B. cereus* e *L. monocytogenes*. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o RL promove alterações na permeabilidade e composição química da membrana celular bacteriana sendo um agente potencial para controle de bactérias Gram positivas de importância alimentar.

Palavras-chaves: Atividade antimicrobiana, Ramnolipídeo, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*.

ABSTRACT

FERREIRA, J. F. **Study of the antimicrobial activity of rhamnolipids against pathogenic bacteria of food importance.** 2017. 96f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos – EESC/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/ Instituto de Química de São Carlos - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Pathogenic bacteria are main agents that contaminate food and are harmful to human health. The search for new compounds to combat and control food pathogens is of increasing interest. Rhamnolipid (RL) is a biosurfactant (BS) typically produced by *Pseudomonas* spp., showing high biodegradability, low toxicity and antimicrobial activity. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of RL against the food pathogenic Gram positive bacteria *Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112), *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095) and Gram negative, *Escherichia coli* (EHEC) (ATCC 43895) and *Salmonella enterica* (ATCC 13076) and also contribute to the elucidation of RL mechanism of action. Susceptibility tests were performed by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) using the broth micro-dilution method. The effect of pH on antimicrobial action was also investigated ranging from 5 to 9. Mechanism of action was studied using membrane permeability, infrared spectroscopy and cell hydrophobicity assays. The MIC value for *B. cereus* was $19.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and MBC was $39.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. *L. monocytogenes* was inhibited at concentration $156.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ showing MBC of $312.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. *B. cereus* presented bactericidal effect after 30 minutes and for *L. monocytogenes* after 8 hours. The Gram-negative *E. coli* and *S. enterica* were resistant to RL. The pH influence antimicrobial activity of the RL showing decreasing MIC values at acidic conditions. Cell hydrophobicity was reduced by RL for the sensitive bacteria. Infrared spectroscopy showed that RL induced changes in chemical composition of cell membrane/wall especially for the Gram positive bacteria. Cell permeability also increases as RL concentration increases. Antimicrobial activity of RL was evidenced for Gram positive bacteria and the most sensitive were *B. cereus* and *L. monocytogenes*. The results of this study suggest that rhamnolipid biosurfactant promotes changes in the permeability and membrane chemical composition showing potential to control foodborne Gram positive bacteria.

Keywords: Antimicrobial activity, Rhamnolipid, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Morfologia de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
Figura 2- Morfologia de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Figura 3- Morfologia de <i>Bacillus cereus</i>	29
Figura 4- Morfologia de <i>Salmonella</i> spp.....	31
Figura 5- Morfologia de <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 6- Representação esquemática de uma molécula de tensoativo com suas partes apolar e polar.....	33
Figura 7- Estrutura química do mono-ramnolípido (a) e di-ramnolípido (b) com m, n: 6-18	35
Figura 8- Ilustração dos agregados moleculares de ramnolípido de conversão sensível a pH.....	37
Figura 9- Estruturas típicas de uma célula bacteriana	38
Figura 10- Estrutura de uma unidade repetitiva de peptidoglicano, o tetrapeptídeo glicano, constituinte da parede celular.....	39
Figura 11- Estrutura da parede celular de bactéria Gram positiva.....	40
Figura 12- Estrutura da parede celular de bactéria Gram negativa.....	40
Figura 13- Ilustração dos mecanismos de ação dos antimicrobianos em bactérias.....	42
Figura 14- Determinação da CIM pelo método de diluição em tubos.....	45
Figura 15- Ilustração da microplaca de 96 cavidades utilizada para determinação da CIM para cada linhagem de bactéria do estudo, com a distribuição das concentrações de ramnolípido em cada coluna.....	51
Figura 16- Exemplo de determinação da concentração inibitória mínima. A seta em vermelho indica a coluna da CIM.....	52
Figura 17- Exemplo de determinação de concentração bactericida mínima. A seta em vermelho indica a menor concentração em que houve inibição de crescimento.....	52
Figura 18- Representação esquemática do procedimento de realização da curva de sobrevivência.....	54
Figura 19- Imagens das microplacas de <i>Staphylococcus aureus</i> no teste de antimicrobiano no pH 7,3. Em (A) imagem de frente e em (B) o fundo da microplaca.....	62

Figura 20- Curva de sobrevivência de <i>Bacillus cereus</i> na presença de RL na CIM e CBM.....	66
Figura 21- Curva de sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> na presença de RL na CIM e CBM.....	66
Figura 22- Ilustração dos ensaios para a curva de sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> . (A) início da incubação (B) após 24 horas de incubação.....	67
Figura 23- Espectroscopia IR de <i>Listeria monocytogenes</i> após tratamento com RL na CIM e 100 x CIM durante 24 horas.....	71
Figura 24- Espectroscopia IR de <i>Bacillus cereus</i> após tratamento com RL na CIM e de 100 x CIM durante 24 horas.....	72
Figura 25- Espectroscopia IR de <i>Staphylococcus aureus</i> após tratamento com RL em 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 horas.....	72
Figura 26- Espectroscopia IR de <i>Escherichia coli</i> após tratamento RL nas concentrações de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 horas.....	73
Figura 27 Espectroscopia IR de <i>Salmonella enterica</i> após tratamento RL na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 horas.....	73
Figura 28- Concentração de proteínas extracelulares após tratamento das bactérias com diferentes concentrações de RL.....	75
Figura 29- MEV de <i>Listeria monocytogenes</i> . (A) Imagens do grupo controle, sem tratamento com RL. (B) Imagens após o tratamento com RL na CIM. As setas amarelas indicam alterações morfológicas na parede celular. (C) imagens das bactérias após tratamento na concentração de 100 x CIM. As setas em vermelho indicam presença agregados/material intracelular.....	79
Figura 30 - MEV de <i>Bacillus cereus</i> (A) Imagens do grupo controle, sem tratamento com RL. (B) Imagens após o tratamento com RL na CIM. As setas amarelas indicam alterações morfológicas na parede celular e rompimento de células. (C) imagens das bactérias após tratamento na concentração de 100 x CIM. As setas em vermelho indicam presença agregados/material intracelular extravasado.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais categorias de biossurfatantes e microrganismos produtores.....	34
Tabela 2- Valores de CIM e de CBM das bactérias expostas ao ramnolípídeo no pH 7,3.....	61
Tabela 3- Atividade antimicrobiana do ramnolípídeo em diferentes valores pH.....	64
Tabela 4- Hidrofobicidade celular das bactérias antes e após tratamento com RL.....	68
Tabela 5- Liberação de material intracelular após tratamento com RL em diferentes concentrações.	76
Tabela 6- Captação do cristal violeta após tratamento com RL em diferentes concentrações.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BS	Biossurfatante
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DO	Densidade Óptica
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
LPS	Lipopolissacarrídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
RL	Ramnolipídeo
Rpm	Rotação por minutos
TSYEB	Caldo Triptona de Soja Extrato de Levedura
TSYEA	Ágar Triptona de Soja Extrato de Levedura
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Contaminações alimentares	25
2.2. Patógenos alimentares.....	26
2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.2.3 <i>Bacillus cereus</i>	29
2.2.4 <i>Salmonella enterica</i>	30
2.2.5 <i>Escherichia coli</i>	31
2.3 Biossurfatantes.....	33
2.4 Ramnolipídeos	35
2.5 Efeito do pH sobre agregação molecular de ramnolipídeos	36
2.6 Morfologia bacteriana.....	38
2.7 Mecanismos de ação antimicrobiana	41
2.8 Avaliação da sensibilidade de um agente antimicrobiano	44
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Microrganismos	49
4.2 Biossurfatante	49
4.3 Preparo dos meios de cultura	49
4.4 Susceptibilidade das bactérias ao ramnolipídeo	49
4.4.1 Padronização do inóculo	50
4.4.2 <i>Testes da atividade antimicrobiana</i>	50
4.4.3 <i>Influência do pH na atividade antimicrobiana</i>	53
4.4.4 <i>Curva de sobrevivência (ensaio time-kill)</i>	53
4.5 Avaliação das alterações químicas da membrana.....	55
4.5.1 <i>Análise da hidrofobicidade celular</i>	55
4.5.2 <i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i>	56
4.6 Mecanismos para avaliação da permeabilidade da membrana	56
4.6.1 <i>Determinação de proteínas totais</i>	57
4.6.2 <i>Análise do extravasamento celular</i>	58

4.6.3 <i>Análise da captação do cristal violeta</i>	59
4.7 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. <i>Testes da atividade antimicrobiana</i>	61
5.2 <i>Influência do pH na atividade antimicrobiana</i>	63
5.3 <i>Curva de sobrevivência (ensaio time-kill)</i>	65
5.4 <i>Análise da hidrofobicidade celular</i>	68
5.5 <i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i>	69
5.6 <i>Determinação de proteínas totais</i>	74
5.7 <i>Análise do extravasamento celular</i>	76
5.8 <i>Análise da captação do cristal violeta</i>	77
5.9 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	78
5.10 <i>Considerações finais</i>	81
5.11. <i>Principais resultados</i>	83
6. CONCLUSÕES	85
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	87
REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), tem-se destacado pelo aumento do número de casos e surtos de contaminações que ocorrem em diferentes países. As incidências das DTA são influenciadas por diferentes fatores, como as alterações ambientais, industrialização, mudanças de hábitos como a ingestão de alimentos preparados em locais públicos, deficiência do controle microbiológico dos alimentos pelos órgãos públicos e privados, comércio internacional, manipulação inadequada dos alimentos, entre outros. Em decorrência disso, verifica-se um aumento dos riscos microbiológicos de contaminações e aumento do número de surtos ocasionados nos alimentos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002).

Os problemas ocasionados pelas contaminações dos alimentos provocam além da problemática na saúde da população, prejuízos de grande impacto econômico. Segundo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2011) a cada ano cerca de 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas) fica doente, 128 mil são hospitalizadas e 3.000 morrem de DTA. No Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária relatou que no período de 2000 a 2016 a região Sudeste e Sul, apresentaram os maiores percentuais de casos de DTA, respectivamente 43,6% e 24,6%. E ainda segundo os levantamentos sobre o perfil epidemiológico, os principais agentes envolvidos foram as bactérias, e dentre estas destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2016).

As bactérias são microrganismos muito simples e de fácil multiplicação caso encontrem um ambiente favorável com nutrientes, pH, temperatura, umidade relativa e presença de gases adequados como o oxigênio (ALVES, 2012; HOFFMANN, 2001). As bactérias patogênicas tais como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são comuns em doenças alimentares, responsáveis por surtos de infecções e intoxicações alimentares causados pela ingestão de carnes, aves, leite, ovos e queijos (MADIGAN et al., 2010).

As doenças de origem alimentar trazem o questionamento a respeito da segurança dos alimentos pela inadequada manipulação e preparação destes, bem como o surgimento da resistência antimicrobiana ocasionadas pelos tratamentos e assepsias convencionais nos processos de produção. Diante desta situação, surge a necessidade de novos compostos que possam contribuir no controle e erradicação dos microrganismos presentes nos alimentos, garantindo qualidade e segurança para os consumidores.

Os biossurfatantes são compostos sintetizados por microrganismos que apresentam a capacidade de se acumular entre fases de fluidos como óleo/água ou água/ar, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais, além de formarem emulsões (DESAI; BANAT, 1997). Essas propriedades são importantes e apresentam diferentes aplicações nas indústrias petrolíferas para biorremediação, na agricultura em formulações de herbicidas e nas indústrias de alimentos para emulsificação de gorduras e solubilização de aromas (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; COSTA, 2007). Além disso, a natureza química biodegradável e baixa toxicidade dos biossurfatantes, os credencia como fortes candidatos para substituírem os surfatantes sintéticos, uma vez que os consumidores se preocupam cada vez mais com a presença de aditivos sintéticos incorporados aos alimentos (IBRAHIM; YANG; SEO, 2008).

Os ramnolipídeos (RL) são biossurfatantes da classe dos glicolipídios, produzidos principalmente por *Pseudomonas* spp. que exibem excelentes propriedades emulsionantes, tensoativas, biodegradabilidade e baixa toxicidade (HABA et al., 2003; NITSCHKE; COSTA, 2007; BENINCASA et al., 2010). Além disso, os RL podem ser produzidos a partir de uma variedade de substratos renováveis; tais como resíduos agroindustriais (MARCHANT; BANAT, 2012). Os RL possuem atividade antimicrobiana frente a vários microrganismos desde bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras (HABA et al., 2003; ABALOS et al., 2001, BENINCASA et al., 2004). O mecanismo de ação antimicrobiana dos RL ainda não foi elucidado completamente, porém, por se tratarem de moléculas com potencial tensoativo, acredita-se que sua atuação ocorra sobre as membranas celulares (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013).

Sabe-se que fatores como o pH exercem grande influência no crescimento e viabilidade das bactérias. Os RL apresentam diferentes estados de agregação molecular de acordo com fatores como pH, concentração, temperatura, contra-íons, forças iônicas, compostos orgânicos e metais (RAZA et al., 2010). Diante desse contexto, o estudo dos mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana do RL assim como as interações químicas que potencializam sua eficiência no combate de bactérias patogênicas alimentares é de grande importância.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminações alimentares

Todos os alimentos frescos, após a preparação e até os conservados não estão isentos de contaminações por microrganismos deteriorantes e patogênicos (MADIGAN et al., 2010). As doenças de origem alimentar são provenientes de diferentes grupos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. Pela sua diversidade e patogenia, as bactérias são os grupos mais importantes associados às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) causando sérios distúrbios que levam até a morte. Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que crianças com menos de cinco anos de idade representam quase um terço das mortes por DTA (REDE INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO DE TÉCNICOS EM SAÚDE, 2015). Além disso, a OMS relata sobre a necessidade de diminuir a contaminação dos alimentos por agentes microbiológicos patogênicos à saúde humana (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Segundo Brasil (2016), os surtos alimentares, podem ser definidos como episódio em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após ingerir alimentos e/ou água da mesma origem, ou um caso de doença rara. A probabilidade de surtos alimentares serem reconhecidos e notificados pelas autoridades de saúde depende, entre outros fatores, da comunicação dos consumidores, do relato dos médicos, das atividades de vigilância sanitária das secretarias municipais e estaduais de saúde. No Brasil há muitos problemas relativos à falta de notificação e reconhecimento dos casos de surtos alimentares. Segundo os últimos dados levantados em janeiro de 2016, a dificuldade de se identificar o agente causador dos surtos alimentares é um fato que se repete historicamente.

As DTA podem ser classificadas em categorias, segundo a sua forma de transmissão podendo ser intoxicação, infecção e toxinfecção alimentar. A intoxicação alimentar é resultante da ingestão de toxinas microbianas presentes nos alimentos. Não é necessário que os microrganismos produtores dessas toxinas cresçam no hospedeiro e, normalmente, esses microrganismos não estão vivos quando o alimento contaminado é consumido. A doença é consequência da ingestão e ação das toxinas bioativas (MADIGAN et al., 2010). Exemplos de bactérias produtoras de toxinas são: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (cepa emética) e *Clostridium botulinum*.

A infecção alimentar é resultante da ingestão do alimento contaminado contendo quantidade de patógenos viáveis para provocar a doença, seguido do crescimento do patógeno no hospedeiro (MADIGAN et al., 2010). Bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. são exemplos de microrganismos que causam infecções alimentares graves.

Toxinfecção alimentar acontece quando o indivíduo ingere o alimento contaminado por microrganismos patogênicos e estes liberam a toxina no organismo humano (FOOD SAFETY BRASIL, 2015). Alguns microrganismos causadores de toxinfecção alimentar são *Bacillus cereus* (cepa diarreica), *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae*.

2.2. Patógenos alimentares

Segundo a Organização Mundial da Saúde há uma estimativa de que, a cada ano, mais de dois milhões de mortes podem estar associadas a doenças ocasionadas de diarreias, muitas das quais adquiridas ao ingerir alimentos e/ou água contaminados (BRASIL, 2015). Segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2011), estima-se que 31 patógenos conhecidos promovam 9,4 milhões de casos de doenças alimentares anualmente. Dentre os patógenos conhecidos das DTA encontram-se os vírus (59%), as bactérias (39%) e os parasitas (2%). Ainda que os vírus estejam envolvidos na maior parte das doenças, as bactérias proporcionaram 64% casos de internações, com destaque para as espécies *Salmonella* (35%) e *Campylobacter* spp. (15%). Grande parte dessas ocorrências se deve a elevada capacidade de sobrevivência e resistências das bactérias em diferentes condições de temperaturas, pH e salinidades dos alimentos.

2.2.1. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende bactérias Gram positivas (Figura 1) que, possuem o formato de cocobacilo curto (0,4 - 0,5 µm de diâmetro e 1,0 - 2 µm de comprimento), normalmente ocorrem isoladas ou em cadeias, são aeróbias e anaeróbias facultativas (VOS et al., 2009). Essas bactérias são móveis com flagelos peritríquios, possuem crescimento em faixa de temperaturas 0 °C (mínima), 25° a 30 °C (ótima) e 45 °C (máxima). Os valores de pH para sua multiplicação ótima encontra-se em pH de 7.0 - 7,5 e valores de temperaturas extremos mínimo 4,3 °C e máximo 9,6 °C. Não formam endósporos e toleram concentrações

salinas $\geq 10\%$ (HOFFMANN, 2001; RYSER; MARTH, 2006; CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

Figura 1- Morfologia de *Listeria monocytogenes*.

Fonte: CDC, 2011. <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>

Listeria monocytogenes é amplamente distribuída em solo e água, porém em fontes alimentares é o agente infeccioso responsável pela doença listeriose. Essa doença afeta a saúde humana causando infecção alimentar gastrointestinal, bacteremia, abortos (nos casos de contaminação de fetos), e em pacientes imunocomprometidos meningites e meningoencefalites (LIU, 2008). A listeriose é adquirida a partir de fontes de alimentos contaminados que tenham o microrganismo, tanto nos surtos como nos casos esporádicos o trato gastrointestinal (TGI) é o principal ponto de colonização. A partir do TGI, *L. monocytogenes* pode atuar sob duas formas clínicas da doença: a infecção não invasiva limitada ao intestino e infecção invasiva localizada ou sistêmica. Os sintomas dessa enfermidade caracterizam-se por uma gastroenterite febril com presença de vômitos e diarreia (ROBERTS; WIEDMANN, 2003; CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008). Alimentos como carnes, queijos frescos, laticínios não pasteurizados e leite pasteurizado inadequadamente são as principais fontes de contaminação da *L. monocytogenes* (MADIGAN et al., 2010).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* dos EUA, estima-se que 1.600 pessoas adquiram listeriose a cada ano (CDC, 2011). No Brasil, as informações a respeito sobre casos e surtos da listeriose são bastante escassos, pois muitas vezes são subdiagnosticados e/ou subnotificados. *L. monocytogenes* são consideradas patógenos oportunistas, pois a ocorrência da infestação grave depende principalmente das condições imunológicas do indivíduo; pessoas com o sistema imunológico enfraquecido e gestantes são

grupos de riscos mais susceptíveis quando afetados, podendo levar a óbito e o aborto espontâneo (CDC, 2011; CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* caracteriza-se por bactérias Gram-positivas (Figura 2), em formato de cocos (0,5 – 1,5 µm de diâmetro), imóveis, apresentam-se isolados, em pares, em tétrades, em pequenas cadeias (3 - 4 células), caracteristicamente dividem-se em mais de um plano, agrupando-se em cachos (VOS et al., 2009). São aeróbios ou anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo, não formam endósporos. As colônias são geralmente opacas, podendo variar sua coloração (branca, creme, amarela ou laranja). São bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa mínima de 5,6 °C, ótima 37 °C e máxima de 50 °C, e as suas enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C, com o ótimo em temperatura entre 40 ° a 45 °C. Esse microrganismo cresce com valores de pH entre 4,0 e 9,8 sendo ótimo entre 6,0 e 7,0; geralmente são halotolerantes (HOFFMANN, 2001).

Figura 2 - Morfologia de *Staphylococcus aureus*.

Fonte: (CDC, 2011.) <<http://www.cdc.gov/HAI/organisms/staph.html>>

Staphylococcus aureus são membros da microbiota local da pele e do trato respiratório superior de quase todos os seres humanos. No entanto, podem crescer em diferentes alimentos produzindo várias enterotoxinas termoestáveis responsáveis por intoxicações alimentares (PIMENTEL-FILHO et al., 2014). As intoxicações alimentares ocasionadas pelas enterotoxinas apresentam sintomas que podem ocorrer entre duas e quatro horas após a ingestão da toxina pré-formada no alimento, e os sintomas mais comuns são vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989). Em casos mais graves

podem ocorrer dor de cabeça, dores musculares e alterações transitórias da pressão arterial e da frequência cardíaca. Casos de óbitos não são comuns, porém existem registros de mortes por intoxicação estafilocócica entre idosos, crianças e pessoas imunocomprometidas (SANTOS, 2009; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1996).

S. aureus são importantes nas indústrias alimentares, pois sua existência indica que as condições do processamento estão inadequadas, e as enterotoxinas uma vez produzidas, podem causar intoxicações (GANDRA, 2006). Os alimentos mais habitualmente envolvidos na intoxicação alimentar incluem produtos contendo cremes, carnes e produtos derivados, aves e ovos, saladas com ovo, macarrão, leite e produtos lácteos (MADIGAN et al., 2010).

2.2.3 *Bacillus cereus*

O gênero *Bacillus* tem o formato de bastonetes (0,4 – 1,8 µm de diâmetro e 0,9 – 10,0 µm de comprimento), Gram positivos, geralmente móveis pelo conjunto de flagelos peritríquios (VOS et al., 2009). Possuem crescimento ótimo em faixa 25 - 37 °C, algumas culturas conseguem sobreviver nas condições mínimas médias de 5 – 8 °C, o crescimento médio em valores de pH entre 5,0 - 8,0 (VALERO; FERNANDEZ; SALMERÓN, 2003). As bactérias são aeróbias facultativas, formadora de endósporos facilmente propagados no ambiente, principalmente no solo, que acabam contaminando muitos tipos de alimentos, especialmente aqueles de origem vegetal, bem como carnes, ovos, leite, e produtos lácteos (ABRIOUEL et al, 2002; BECKER et al., 1994; NOTERMANS et al.,1997; KRAMER; GILBERT, 1989).

Figura 3 - Morfologia de *Bacillus cereus*.

Fonte: <https://phys.org/news/2013-01-toxin-bacillus-cereus-diarrhea.html>

Bacillus cereus são agentes oportunistas, responsáveis por número crescente de doenças transmitidas por alimentos nos países industrializados (ABRIOUEL et al., 2002; KRAMER; GILBERT, 1989; GRANUM; LUND, 1997). O endósporo é um problema sério nas indústrias agro-alimentares (especialmente nas indústrias de laticínios), não só porque eles são resistentes ao calor, mas também pela capacidade de se aderir fortemente às superfícies (KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASSALO, 2000).

B. cereus produz 2 tipos de enterotoxinas; diarreica e emética, que são os agentes responsáveis, respectivamente, pela toxinfecção e intoxicação alimentar. A toxina diarreica é uma proteína produzida durante o crescimento das células. Já a toxina emética (provoca o vômito) é um pequeno peptídeo sem propriedades antigênicas, produzido durante a fase estacionária do crescimento, muito resistentes ao calor (ABRIOUEL et al., 2002; DROBNIEWSKI, 1993). As cepas enterotoxigênicas estão associadas a doença alimentar quando presentes em populações na ordem de 10^6 UFC/g, ou valores superiores (VALERO; FERNANDEZ; SALMERÓN, 2003).

2.2.4 *Salmonella enterica*

O gênero *Salmonella* são bactérias em formato de bastonetes (0,7 - 1,5 µm de diâmetro e 2,0 – 5,0 µm de comprimento), Gram negativos, geralmente móveis (flagelos peritríquios), aneróbios facultativos, não esporulados (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Apresentam adaptabilidade em valores de pH ótimo entre 7,0 e 7,5 (extremos 3,8 e 9,5), temperatura de 35 °C a 43 °C (extremos 5 °C a 46 °C). As salmonelas pertencem a família *Enterobacteriaceae* são divididas em duas espécies: *Salmonella enterica* (subdividida em seis subespécies; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *Salmonella bongori*. Cada uma dessas subespécies é dividida em sorotipos. Os sorotipos *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são as principais causas de salmonelose transmitida por alimentos em humanos (MADIGAN et al., 2010). As salmonelas podem também ser categorizadas em três tipos: a febre tifóide, as febres entéricas e as enterocolites ou salmoneloses as quais são responsáveis por quadros de gastroenterite por doenças de transmissão alimentar (BRASIL, 2011).

Figura 4 - Morfologia de *Salmonella* sp.

Fonte: (CDC, 2011) <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>

A salmonelose é uma doença gastrointestinal decorrente de infecção por bactérias do sorotipo das enterocolites. Os alimentos envolvidos na contaminação de salmonelose são ovos, carnes de aves e seus derivados. Além disso, a manipulação inadequada dos alimentos, desempenha papel importante na disseminação da bactéria, por proporcionar contaminação cruzada durante o preparo de alimentos (CARDOSO; TESSARI, 2008). Os sintomas da salmonelose aparecem, em média, de 8 a 48 horas após o contato com alimento ou a água contaminada, e esses sintomas caracterizam-se em diarreias, febres, dores abdominais e vômitos (MADIGAN et al., 2010).

Salmonella enterica é oriunda dos tratos intestinais de humanos e animais de sangue quente, que por diferentes vias como a contaminação fecal, a manipulação, e higienização inadequadas acabam contaminando os alimentos. A patogênese causada pela salmonelose é considerada a zoonose mais disseminada do mundo e têm se mantido estável ao longo da última década (BRASIL, 2011). A alta incidência de surtos de contaminação caracteriza a salmonelose como umas das mais importantes doenças transmitidas por alimentos.

2.2.5 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende bactérias em forma de bastonete (1,1 – 1,5 µm de diâmetro e 2,0 – 6,0 µm comprimento), Gram negativos, ocorrem individualmente ou em pares e podem ser móveis por flagelos peritríquios ou sem motilidade. Não formam endósporos, e são anaeróbios facultativos (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Possuem fímbrias, apêndices de filamentos responsáveis por aderirem fortemente ao epitélio dos intestinos. Diversas linhagens não são patogênicas, sendo membro comuns da microbiota

entérica do intestino humano. Entretanto, existem linhagens potencialmente patogênicas intestinais que são transmitidas por alimentos contaminados (CALDORIN et al., 2013).

Figura 5 - Morfologia de *Escherichia coli*.

Fonte: (CDC, 2011) <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) produzem potentes citotoxinas chamadas toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2), anteriormente denominadas verotoxinas. As infecções por *E. coli* (EHEC) podem exibir colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica, doença grave e muitas vezes fatal (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006). Essas bactérias apresentam como principal reservatório natural o trato gastrointestinal de bovinos, também podendo ser encontradas nas fezes. Os surtos causados pela *E. coli* são oriundos principalmente do consumo de carne contaminada crua ou malcozida, mas pode ocorrer pela ingestão de água, leite e vegetais contaminados (TRABULSI; CAMPOS, 1999; MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006).

E. coli possuem temperatura de crescimento ótimo em 37 °C, valores mínimos em 10°C e valores máximos em 45 °C. Os valores de pH para multiplicação se insere na faixa mínima dos 4,4 e máxima dos 9,5 (HOFFMANN, 2001). A ampla faixa adaptativa dessas bactérias, aliada as características dos apêndices filamentosos de aderência, fazem com que *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) seja um dos principais patógenos causadores de infecções intestinais. O sorotipo da *E. coli* O157 continua sendo o mais conhecido patógeno alimentar responsável por cerca de 50% das doenças causadas na União Europeia. Além de estarem associado com os casos mais graves de colites hemorrágicas e fatais (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013; PAULA; CASARIN; TONDO, 2014).

2.3 Biossurfatantes

Biossurfatantes são moléculas tensoativas produzidas por microrganismos. Os biossurfatantes são anfifílicos, ou seja, apresentam região hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar); e devido à esta propriedade são capazes de se distribuir em interfaces como óleo/água ou ar/água diminuindo as tensões superficiais e interfaciais além de formar emulsões (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; COSTA, 2007).

A porção apolar frequentemente tem cadeias de hidrocarbonetos (linear, ramificada ou com partes cíclicas) não formando polos de concentração de carga eletrostática. Enquanto a porção polar pode ser aniônica, catiônicas, não-iônica ou anfotérica, que apresentam concentração de carga, com formação de um polo negativo ou positivo. A parte polar é responsável pela solubilidade da molécula em água, pois as cargas (negativas ou positivas) apresentam atração eletrostática pelas moléculas de água vizinhas (DALTIM, 2011).

Para representar moléculas tensoativas, tradicionalmente usa-se a figura de uma barra – simbolizando a parte apolar da molécula (solúvel em hidrocarbonetos, óleos e gorduras) e um círculo – representando a parte polar (solúvel em água), como exemplo na Figura 6.

Figura 6 - Representação de uma molécula de tensoativo com suas partes apolar e polar.

Fonte: Própria autoria.

Os biossurfatante tem como princípio de categorização a composição química e também a origem microbiana (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; COSTA, 2007). Eles podem ser divididos segundo Ron e Rosenberg (2001) em dois grupos: os de baixo peso molecular que incluem glicolipídeos (ramnolipídios, soforolipídios, trehalolipídeos), lipopeptídeos e lipoproteínas (peptídio-lipídio, viscosina, surfactina), ácidos graxos, lípidos neutros e fosfolipídios, enquanto os de alto peso molecular incluem os surfatantes poliméricos

e surfatantes particulados (NITSCHKE; COSTA, 2007). A Tabela 1 resume os principais tipos e microrganismos produtores de biossurfatante.

Tabela 1 - Principais categorias de biossurfatantes e microrganismos produtores.

Tipos de biossurfatantes	Microrganismos
Glicolipídeos	
Ramnoflipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfatantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfatantes particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: NITSCHKE; PASTORE, 2002.

As propriedades químicas das moléculas dos tensoativos garantem uma ampla versatilidade de aplicações industriais, envolvendo emulsificação, detergência, lubrificação, solubilização, formação de espuma e dispersão de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002; DELEU; PAQUAT, 2004). Os biossurfatantes podem ter diversas aplicações, tais como: nas indústrias petrolíferas usados para biorremediação, limpeza de reservatórios de óleos, recuperação melhorada do petróleo e dispersão em derramamento de óleos; na agricultura em formulações de herbicidas e pesticidas; nas indústrias de alimentos como emulsificadores de gorduras, dispersores de fases e solubilização de aromas; nas indústrias farmacêuticas com formulações de fármacos, cosméticos, higiene pessoal; e outras aplicações incluindo indústrias de papel, têxtil, tintas e cerâmica (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

2.4 Ramnolipídeos

Os Ramnolipídeos (RL) são biossurfatantes produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Esse biossurfatante está inserido na classe dos glicolipídios sendo um composto anfifílico constituído por moléculas de ramnose em sua porção hidrofílica e por cadeias de ácidos graxos na porção hidrofóbica. Os RL apresentam homólogos sendo de maior predominância os mono-ramnolipídeos: uma ramnose ligada a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico, e os di-ramnolipídeos: duas ramnoses ligadas a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico. (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; BENINCASA et al, 2004). A Figura 7 apresenta a estrutura dos dois principais homólogos de RL.

Figura 7 - Estrutura química do mono-ramnolipídeo (a) e di-ramnolipídeo (b) com m, n: 6 -18.

Fonte: Adaptado de Abdel-Mawgoud et al. (2010).

Esse biossurfatante representa uma das classes mais promissoras para uso industrial, por apresentar excelente atividade superficial e interfacial, tolerância a temperatura, pH e força iônica, biodegradabilidade e baixa toxicidade (HABA et al., 2003; NITSCHKE; COSTA, 2007). Além disso, uma abordagem interessante é a possibilidade da sua produção a partir de subprodutos e resíduos de agroindústrias (NITSCHKE; COSTA, 2007). Foi demonstrado a potencialidade de produção do RL a partir de várias matérias-primas como resíduos de ácidos graxos (ABALOS et al., 2001), resíduos de óleo de frituras (HABA et al., 2000), resíduos do processamento de óleo de girassol (BENINCASA et al., 2002), soro de leite (DUBEY; JUWARKAR, 2001) entre outras. Assim, a produção do RL torna-se

vantajosa também pela redução e reaproveitamento de resíduos lançados do meio ambiente (HENKEL et al., 2015).

Os RL apresentam ação antimicrobiana frente a vários microrganismos desde bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras (HABA et al., 2003; ABALOS et al., 2001, BENINCASA et al., 2004). Os RL mostraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) para *Listeria monocytogenes* de $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MAGALHAES; NITSCHKE, 2013); *Escherichia coli* de $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ABALOS et al., 2001); *Salmonella thyphimurium* de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, *Staphylococcus aureus* de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *Bacillus cereus* de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BENINCASA et al., 2004).

2.5 Efeito do pH sobre agregação molecular de ramnolipídeos

Os surfatantes sintéticos como os biossurfatante são capazes de formar diversas microestruturas, tais como: vesículas esféricas e irregulares ou tubular irregulares; folhas lamelares; micelas esféricas, elipsoides, globulares e cilíndricas, dentre outros. Os diferentes formatos de agregados do RL estão diretamente associados a diferentes fatores como: concentração, pH, temperatura, contra-íons, força iônica, presença de metais e álcoois (RAZA et al., 2010; SILVA, 2016; ISHIGAMI et al., 1993).

Raza e colaboradores (2010) encontraram diferentes modelos de agregados morfológicos de RL quando submetidos a diferentes faixas de pH 5 – 8. O aumento dos valores de pH, em solução de RL (40 mg L^{-1}), evidenciaram morfologias que vão de vesículas irregulares, até pequenas micelas esféricas. Neste mesmo estudo, os pesquisadores constataram que a elevação dos valores de pH 5 – 8 também aumentava a concentração micelar crítica (CMC) de 35 para 50 mg L^{-1} e a tensão superficial de 28,2 para $30,1 \text{ mN m}^{-1}$. Desta forma, evidenciaram que moléculas de RL quando em pH mais elevados, apresentam maior força de repulsão intermolecular do que as moléculas de RL em pH menores. A medida que o pH da solução do RL diminui, o grupo das cabeças carboxilas torna-se mais protonado, reduzindo desta forma, a repulsão entre os grupos de cabeça e permitindo melhor solvatação das moléculas de RL na interface, reduzindo a tensão.

Nos $\text{pH} \leq 5,0$ os grupos carboxilas encontram-se quase totalmente protonados, não exibindo comportamento aniônico em solução aquosa, enquanto em $\text{pH} > 5,0$ os grupos carboxilas encontram-se dissociados, ionizáveis (ISHIGAMI et al., 1993). O aumento dos valores de pH em solução, induz mudanças dos grupos hidrofílicos dos RL para cargas

negativas, de modo que as forças repulsivas entre as cabeças dos grupos hidrofílicos adjacentes de RL aumentam. Dessa forma, não suportam a formação de grandes vesículas esféricas.

Champion e colaboradores (1995), demonstraram o efeito do pH, o cádmio e octano sobre a morfologia das estruturas do RL. Eles averiguaram sob condições de pH 5 – 7, alterações nos agregados moleculares, desde vesículas a lamelas, partículas lipídicas e finalmente a micelas. Como pode ser observado na figura 8.

Figura 8 - Ilustração dos agregados moleculares de ramnolipídeo de conversão sensível a pH.

Fonte: Adaptado de Ishigami et al. (1987).

Nesse sentido, as mudanças de pH para o ramnolipídeo, podem ser relacionadas a diferentes tipos de alterações químicas como: tensões superficiais e interfaciais; mudanças no poder de solvatação de moléculas e formação de diferentes agregados moleculares (microestruturas) que podem propiciar maior ou menor interação na ação antimicrobiana.

2.6 Morfologia bacteriana

As principais estruturas de uma célula bacteriana consistem um nucleóide, um citoplasma e uma membrana citoplasmática. Além dessas estruturas, com exceção dos micoplasmas, todas as bactérias apresentam parede celular e algumas apresentam cápsula externa. A figura 9 exemplifica os principais componentes de uma célula bacteriana típica com as estruturas externas e internas à membrana citoplasmática.

Figura 9 - Estrutura típicas de uma célula bacteriana.

Fonte: Adaptado KAYSER et al. (2005).

Pela estrutura da parede celular as bactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos, denominados Gram positivas e Gram negativas. Essa divisão clássica, de acordo com a coloração de Gram, revela diferenças importantes na composição química e na estrutura de parede celular (MADIGAN et al., 2010).

A parede celular é uma estrutura comum das bactérias conferindo: forma a célula, rigidez estrutural e cria uma barreira física contra o ambiente externo. Essas podem apresentar componentes de superfícies como: a cápsula, o flagelo e o *pili*. A parede celular localiza-se externamente a membrana citoplasmática e apresenta-se em camadas múltiplas. É composta por camadas internas de peptidoglicano que varia em espessura e composição química dependendo do tipo de bactéria (LEVINSON; JAWETZ, 1998; KONEMAN et al., 2001; SILVA, 2010).

Cada camada de peptideoglicano é formada por uma fina lâmina, composta por dois derivados de açúcar, a *N*-acetilglicosamina (NAG) e o *N*-acetilmurâmico (NAM), além de aminoácidos, que consiste em L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico e lisina, ou ácido diaminopimélico (DAP). Os aminoácidos se ligam covalentemente, em cadeias laterais de tetrapeptídeos (CLT) no ácido N-acetilmurâmico (Figura 10). A estrutura do peptideoglicano pode ser definida como um arcabouço, onde as cadeias de glicano, formada pelos açúcares são interligadas por meio de ligações peptídicas cruzadas, formadas pelos aminoácidos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 10 - Estrutura de uma unidade repetitiva de peptideoglicano, o tetrapeptídeo glicano, constituinte da parede celular.

Fonte: Trun e Trempy (2003) *apud* Silva (2010).

Nas bactérias Gram positivas, cerca de 90% da parede são compostos por peptideoglicano (Figura 11). Além do peptideoglicano, as bactérias apresentam um álcool (como o glicerol ou ribitol) e fosfato, os denominados ácidos teicóicos. Existem dois tipos de ácidos teicóicos: *ácido lipoteicóico*, que atravessa a camada de peptideoglicano e está ligado à membrana plasmática, e o *ácido teicóico da parede*, que está ligado à camada de peptideoglicano. Os ácidos teicóicos são formados por aproximadamente 30 resíduos de glicerol ou ribitol, unidos por ligações fosfodiéster e também se ligam ao peptideoglicano por ligações fosfodiéster (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 11 - Estrutura da parede celular de bactéria Gram positiva

Fonte: Adaptado KAYSER et al., 2005.

A parede celular das bactérias Gram negativas apresenta composição química mais complexa que as Gram positivas. É formada por uma fina camada de peptidoglicano e por uma membrana externa (Figura 12). Na parte externa da membrana citoplasmática, acima da camada de peptidoglicano localiza-se o espaço periplasmático (compartimento que contém elevada concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte). O peptidoglicano está ligado a membrana externa através de lipoproteínas (lipídeos covalentemente ligados a proteínas) localizados no espaço periplasmático. As paredes celulares gram-negativas não contêm ácidos teicoicos (KONEMAN et al., 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 12 - Estrutura da parede celular de bactéria Gram negativa.

Fonte: Adaptado KAYSER et al., 2005.

A membrana externa consiste em lipopolissacarídeos (LPS), proteínas e fosfolipídios. Esta membrana tem a estrutura em dupla camada; a camada interna é composta por fosfolipídios (20%) e proteínas (50%) assemelhando-se à membrana citoplasmática, possui canais proteicos denominados porinas que permitem a passagem de moléculas como nucleotídeos, dissacarídeos, peptídeos, aminoácidos e alguns íons. Os LPS da membrana externa são moléculas complexas de lipídeos e carboidratos que consiste em 3 componentes ligados covalentemente: (1) lipídeo A, embebido na membrana; (2) cerne polissacarídico, localizado na superfície da membrana e (3) cadeia O (antígeno O), que são polissacarídeos que se estendem como pêlos a partir da superfície da membrana. O lipídeo A é a porção lipídica do LPS, consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforiladas que estão ligadas a vários ácidos graxos de cadeia longa. O lipídeo A tem sido identificado como o princípio endotóxico das bactérias Gram negativas. O cerne polissacarídico consiste de unidades de repetição de trissacarídeos lineares, tetrassacarídeos ou pentassacarídeos ramificados. A cadeia O consiste de até 25 unidades repetidas de três a oito açúcares (KAYSER et al., 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; SILVA, 2010).

2.7 Mecanismos de ação antimicrobiana

O agente antimicrobiano é um produto químico natural ou sintético, que mata ou inibe o crescimento de microrganismos. Agentes que matam os microrganismos são denominados – *cidas*, já os agentes que apenas inibem o crescimento, são denominados agentes – *státicos*. Os agentes podem ser classificados como bacteriostáticos, bactericidas e bacteriolítico, conforme a ação observada em uma cultura bacteriana. Os agentes denominados bacteriostáticos inibem o crescimento, quando a concentração do agente é diminuída, o crescimento é restabelecido. Os denominados bactericidas ligam-se fortemente a seus alvos celulares e não são removidos pela diluição, provocando a morte do microrganismo, e o número dessas células mortas não são destruídas mantendo-se constantes. Os bacteriolíticos são agentes bactericidas, matando o microrganismo, porém promove a liberação do conteúdo citoplasmático (MADIGAN et al., 2010).

Os agentes antimicrobianos possuem diferentes alvos nas células bacterianas. O conhecimento dos mecanismos de ação dos antimicrobianos sobre as células bacterianas são informações importantes para evitar as estratégias de resistências das bactérias. Segundo a

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2007), de modo geral, para que a antimicrobiano exerça sua atividade, são necessárias uma série de propriedades; primeiramente deverá atingir a concentração ideal, ser capaz de atravessar de forma passiva ou ativa, a parede celular, apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria e permanecer tempo suficiente para exercer o seu efeito inibitório.

A ação antimicrobiana do biossurfatante RL tem sido estudada por diferentes pesquisadores (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; BENINCASA et al., 2010; SOTIROVA et al., 2008; ABALOS et al., 2001). Devido ao RL apresentar caráter anfifílico os estudos apontam sua possível interação com elementos da parede e membranas citoplasmáticas das bactérias.

Os antimicrobianos podem exibir as suas ações de cinco modos: (I) – Inibição da síntese de parede celular, (II) Danos à membrana plasmática, (III) Inibição da síntese de proteínas, (IV) Inibição da síntese de ácidos nucleicos e (V) Inibição da síntese de metabólitos essenciais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN et al., 2010). Os tipos de mecanismos de ação antimicrobiana podem ser observados na figura 13.

Figura 13 - Ilustração dos mecanismos de ação dos antimicrobianos em bactérias.

Fonte: Adaptado de Tortora, Funke e Case (2012).

(I) Inibição da síntese de parede celular

A parede celular bacteriana consiste de uma rede macromolecular de peptidoglicano. O peptidoglicano resulta da ligação cruzada de duas cadeias peptídicas ligadas ao glicano, esse processo de síntese da parede celular bacteriana é chamado de *transpeptidação*. A inibição da síntese de parede celular, ocorre quando as enzimas transpeptidases ligam-se ao antimicrobiano, evitando que sejam capazes de catalisar a reação de transpeptidação. Embora a parede celular continue a ser sintetizada, não há a formação das ligações cruzadas na parede celular bacteriana recém-sintetizada, tornando-a fragilizada. Eventualmente, as diferenças de pressão osmótica entre os meios extracelular e intracelular promovem a lise da célula.

(II) Danos à membrana plasmática

Os antimicrobianos especialmente compostos por polipeptídeos e lipopolipeptídeos induzem mudanças na permeabilidade da membrana. Essas mudanças relacionam-se: à bloqueios na biossíntese de ácidos graxos essenciais a membrana plasmática; a ligações específicas em componentes da membrana formando poros que induzem a rápida despolarização da membrana, a célula despolarizada perde a capacidade de sintetizar macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas. Além disso, as alterações na estrutura da membrana celular podem ser responsáveis por extravasamento do conteúdo celular no meio circundante e interferirem no crescimento da célula.

(III) Inibição da síntese de proteínas

A inibição da síntese de proteínas pelos antimicrobianos resulta da interação com os ribossomos e interrupção da tradução. Estes tipos de interações são bastante específicas e muitas envolvem a ligação ao RNA ribossômico, bloqueando etapas da síntese proteica como a iniciação da cadeia proteica ou a elongação da cadeia proteica.

(IV) Inibição da síntese de ácidos nucleicos

Alguns antimicrobianos inibem especificamente nos processos de replicação e de transcrição de DNA para RNA mensageiro. A inibição da replicação do DNA é realizada por

compostos antibacterianos que interferem com a DNA girase bacteriana, impedindo o superenovelamento do DNA, etapa importante ao empacotamento do DNA na célula. A inibição do processo de transcrição de DNA para RNA mensageiro está relacionada ao bloqueio da síntese de RNA.

(V) Inibição da síntese de metabólitos essenciais

A atividade enzimática específica da bactéria pode ser inibida competitivamente por uma substância (antimicrobiano) que se assemelha muito ao substrato normal da enzima. Essa inibição limita as reações enzimáticas interferindo em diferentes passos de uma sequência metabólica para as sínteses de proteínas, DNA ou RNA.

2.8 Avaliação da sensibilidade de um agente antimicrobiano

A atividade antimicrobiana é avaliada determinando-se a menor quantidade de agente necessária para inibir o crescimento de um microrganismo, sendo esse valor denominado de concentração inibitória mínima (CIM ou MIC, do inglês, *minimum inhibitory concentration*).

A determinação da CIM de um agente antimicrobiano em relação a um microrganismo pode ser realizada pela *técnica de diluição*. Esse procedimento pode ser feito em macrodiluição utilizando tubos de culturas, ou em microdiluição utilizando poços de uma placa de microtitulação (CLSI, 2012).

Nos tubos de culturas ou nos poços da microplaca, diluições seriadas das concentrações do antimicrobiano são realizadas, após esse processo inocula-se uma quantidade padrão do microrganismo em teste. Após a incubação, os tubos ou poços são inspecionados para verificar a ocorrência de crescimento do microrganismo visivelmente, através da observação da turbidez do meio. A CIM corresponde à menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo testado (MADIGAN et al., 2010). Como é exemplificado na ilustração da figura 14.

Figura 14 - Determinação da CIM pelo método de diluição em tubos.

Fonte: Adaptado Anvisa (2007).

As CIM são excelentes ferramentas para determinação da susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos (ANDREWS, 2001). A leitura dos resultados consiste em observar a menor concentração de agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poços de microdiluição, detectado a olho nu. A quantidade de crescimento nos poços ou tubos, deve ser comparada com a quantidade de crescimento nos poços ou tubos de controle de crescimento (sem o antimicrobiano) (CLSI, 2012).

A visualização do crescimento bacteriano pode ser auxiliada pela adição de um indicador de viabilidade celular, como o sal brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, denominado MTT. Este sal muda de coloração do amarelo para a cor violeta (MTT-formazana) em reação de redução da enzima succinato desidrogenase presente em células viáveis (MOSMANN, 1983).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a atividade antimicrobiana do ramnolípídeo sobre as bactérias de importância alimentar, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (EHEC) e *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis.

3.2 Objetivos específicos

Determinar as concentrações inibitórias mínimas e a concentração bactericida mínima do ramnolípídeo frente a cada bactéria;

Verificar o efeito do pH sobre atividade antibacteriana de ramnolípídeo;

Estudar o efeito dos ramnolípídeos sobre a permeabilidade celular das bactérias;

Estudar o mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizadas culturas de bactérias Gram positivas: *Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112), *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095) e culturas Gram negativas: *Escherichia coli* (EHEC) (ATCC 43895) e *Salmonella enterica* (ATCC 13076). As linhagens foram armazenadas em freezer a -20 °C em caldo de triptona de soja extrato de levedura (TSYEB) com adição de 10% de glicerol. Todos os testes de atividade antimicrobiana de ramnolipídeos foram realizados a partir das culturas armazenadas em -20 °C.

4.2 Biosurfatante

Utilizou-se o Ramnolipídeo Comercial (*Rhamnolipid Inc.*) em solução 25% com grau de 95% de pureza.

4.3 Preparo dos meios de cultura

O meio líquido utilizado foi o caldo triptona de soja extrato de levedura (TSYEB, *Himedia*), preparado a partir de 30 g de caldo triptona de soja adicionado de 6 g de extrato de levedura, dissolvidos em 1000 mL de água destilada, pH ajustado para $7,3 \pm 0,2$. O meio sólido de cultivo das bactérias foi o ágar triptona de soja extrato de levedura (TSYEA), preparado com a proporção de 40 g de meio ágar e 6 g de extrato de levedura dissolvidos em 1000 mL de água destilada, pH ajustado para $7,3 \pm 0,2$ (ARAUJO, 2009). Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

4.4 Susceptibilidade das bactérias ao ramnolipídeo

Os testes para avaliação da susceptibilidade das bactérias ao ramnolipídeo foram: *Teste da atividade antimicrobiana*, essa técnica tem como finalidade observar se as bactérias

do estudo são sensíveis ao biossurfatante; *Influência do pH na atividade antimicrobiana*, essa metodologia teve como objetivo verificar o efeito do pH na ação antimicrobiana; e a *Curva de sobrevivência*, procedimento para analisar o perfil de ação antimicrobiana no tempo.

4.4.1 Padronização do inóculo

As culturas foram inoculadas em placa de TSYEA a partir do estoque a -20 °C e incubadas por 24 horas a 37 °C. Utilizando-se uma alça esterilizada, algumas colônias da cultura de 24 horas foram selecionadas e diluídas em solução salina (NaCl 0,86%) até uma concentração de 10^8 UFC/ mL. Utilizou-se como referência para a diluição, o padrão 0,5 da escala de McFarland. A partir dessa suspensão, realizou-se uma diluição em solução salina (NaCl 0,86%), obtendo-se a suspensão de cultura padronizado de 10^7 UFC/ mL, utilizada para ensaios de atividade antimicrobiana estabelecida pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M7-A9, 2012).

4.4.2 Testes da atividade antimicrobiana

Foram realizados testes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do ramnolípido frente as três culturas de bactérias Gram positivas: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e para as duas culturas Gram negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. Posteriormente, para as bactérias que apresentaram CIM, determinou-se a concentração bactericida mínima (CBM).

O ramnolípido (RL) foi preparado inicialmente na concentração de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio TSYEB e esterilizado por filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius).

Primeiramente, foram adicionados em todas as cavidades da placa de micro-diluição 100 μL de caldo de cultivo TSYEB. Em seguida, 100 μL de amostra da solução contendo RL inicialmente na concentração de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados nas 8 cavidades da primeira coluna (1) da placa. Após homogeneização da solução de RL com o meio de cultivo da coluna (1) coletou-se 100 μL das amostras, e foram transferidas para a coluna (2), misturando-se com o meio novamente. Esses passos foram seguidos sucessivamente até a coluna (10) da placa. Desta forma, obteve-se desde a primeira coluna até a décima a redução da concentração de RL pela metade da concentração anterior, variando assim de 2500 a $4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RL.

Alíquotas de 20 μL do inóculo bacteriano padronizado foram adicionados em todas as cavidades das colunas (1 até a 11), exceto na coluna 12.

A coluna 11 foi utilizada para controle positivo de crescimento, contendo o inóculo bacteriano em estudo e o caldo de cultivo TSYEB. A coluna 12 foi utilizada para o controle negativo, contendo nos 4 primeiros poços o meio TSYEB e a concentração de RL 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e os outros 4 poços somente o meio de cultivo TSYEB (Figura 15).

Figura 15 - Ilustração da microplaca de 96 cavidades utilizada para determinação da CIM para cada linhagem de bactéria do estudo, com a distribuição das concentrações de ramnolipídeo em cada coluna.

Fonte: Própria autoria.

Após realizado todo o procedimento, a placa de microdiluição foi fechada e incubada durante 24 horas a 37 °C. Transcorrido o período de incubação, fez-se uma análise visual de cada coluna a fim de constatar se houve inibição do crescimento bacteriano. Nas colunas em que houve inibição foram realizados posteriormente ensaios para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

Para a confirmação visual da CIM adicionou-se 20 μL de corante brometo de tetrazolio (MTT - 1mg mL^{-1}) para detectar a presença de atividade metabólica. Este corante muda a cor de amarelo para o violeta quando existe viabilidade celular (Figura 16). Depois de

incubado a 37 °C por 1 hora, a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias em relação ao controle positivo.

Figura 16 - Exemplo de determinação da concentração inibitória mínima. A seta em vermelho indica a coluna da CIM.

Fonte: Própria autoria.

Após os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima, foi aplicada a técnica para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

Com o auxílio da alça de inoculação, antes de adicionar o MTT, transferiram-se amostras dos poços das colunas em que houve inibição de crescimento para uma placa de TSYEA, incubou-se na estufa a 37 °C durante 24 horas. A concentração bactericida foi designada como a menor concentração onde não houve crescimento na placa (Figura 17). Nos eventos em que as concentrações testadas resultaram em crescimento bacteriano determinou-se que o efeito do antimicrobiano foi bacteriostático.

Figura 17 - Exemplo de determinação de concentração bactericida mínima. A seta em vermelho indica a menor concentração em que houve inibição de crescimento.

Fonte: Própria autoria.

Os ensaios foram realizados em quadruplicada e com o mínimo de três repetições independentes. Todos os testes utilizaram como parâmetros de comparações os controles positivos de crescimento bacteriano (suspensão inoculada sem tratamento do RL) e os controles negativos (meio de cultivo sem o inóculo). Os resultados foram expressos como a moda de pelo menos três repetições independentes.

4.4.3 Influência do pH na atividade antimicrobiana

Os ensaios de CIM foram realizados sob diferentes valores de pH 5 – 9. As culturas bacterianas padronizadas foram inoculadas em caldo TSYEB preparado em diferentes valores de pH (5, 6, 7, 8 e 9). Os caldos tamponados foram preparados em tampão Citrato-Fosfato (pH 5), tampão Fosfato (pH 6, 7 e 8) e tampão Tris-HCl (pH 9) (FERREIRA, 2002).

Para os testes da influência do pH na atividade antimicrobiana, o RL foi preparado inicialmente na concentração de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio de cada cultivo tamponado de TSYEB nos diferentes pH 5 – 9. Posteriormente, as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius).

Os ensaios de CIM foram realizados para cada meio de pH (5, 6, 7, 8 e 9). Posterior, a determinação dos valores de CIM, realizou-se os ensaios de CBM. A descrição da metodologia empregada seguiu conforme descrito anteriormente.

4.4.4 Curva de sobrevivência (ensaio time-kill)

Para determinar o efeito do tempo na atividade antimicrobiana do ramnolípídeo nas bactérias que foram sensíveis em pH 7,0 foram construídas curvas de sobrevivência (VERMA, 2007). Para a realização das curvas de sobrevivência, as bactérias foram expostas ao tratamento com ramnolípídeo nos valores das concentrações encontradas de CIM e CBM.

Primeiramente preparou-se os inóculos bacterianos em DO de 10^7 padronizado conforme a seção 4.4.1. Em um tubo de ensaio, 2 mL da suspensão bacteriana padronizada foi inoculada em 10 mL de TSYEB para a curva controle (sem tratamento) e em outros dois tubos, o mesmo volume desta mesma suspensão foi inoculada em 10 mL de TSYEB contendo o RL na concentração de CIM e CBM (tratamentos).

Nos intervalos de tempos (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 15 e 24 horas), uma alíquota de 0,1 mL foi retirada de cada um dos três tubos (controle, tratamento CIM e tratamento CBM) e transferidas para tubos do tipo eppendorfs, contendo 0,9 mL de solução salina (NaCl 0,86%). A partir desta primeira diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ...) de forma equivalente a primeira diluição, sempre agitando a cultura vigorosamente em vórtex, antes de cada coleta para a diluição seguinte. A figura 18 demonstra o esquema do procedimento da curva de sobrevivência.

Figura 18 - Representação esquemática do procedimento de realização da curva de sobrevivência.

Fonte: Própria autoria.

Para cada diluição realizada nos tubos de eppendorfs, tanto do controle como dos tratamentos, foram retiradas gotas de 20 µL que foram transferidas e semeadas em placas de TSYEA, a 37 °C por 24 horas para observar o crescimento das colônias. Após o crescimento das colônias, conforme o método da gota de Miles e Misra (1938) foi realizado a contagem do número de células viáveis obtendo-se o valor em unidade formadora de colônia (UFC mL⁻¹).

4.5 Avaliação das alterações químicas da membrana

Visando avaliar as possíveis alterações químicas na composição da membrana/parede das bactérias provocadas pelo RL realizou-se: *Análise da hidrofobicidade celular*, esta técnica é relacionada com as alterações de cargas das superfícies das bactérias; e a *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier* que verifica as possíveis alterações na composição e características estruturais das superfícies das bactérias.

4.5.1 Análise da hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade celular das bactérias (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) foram mensuradas através da aderência do hexadecano de acordo com o método de Rosenberg et al., (1980).

As células bacterianas foram lavadas e suspensas em tampão PUM (16,95 g K_2HPO_4 , 7,26 g KH_2PO_4 , 1,8 g uréia, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e água destilada para 1000 mL) pH 7,1. Ajustou-se a DO para $1,0 \pm 0,01$ em 610 nm. Realizou-se o tratamento com ramnolípídeo nas concentrações encontradas em CIM, e a variação com aumento de 100 vezes a CIM, no pH neutro. Para *Bacillus cereus* a CIM foi de $19,5 \mu g mL^{-1}$ e para *Listeria monocytogenes* $156,2 \mu g mL^{-1}$. As bactérias que não apresentaram CIM no pH neutro (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) realizou-se o tratamento com RL na concentração de $50 \mu g mL^{-1}$ e na variação com aumento de 100 vezes.

Após o tratamento as células foram lavadas em tampão e centrifugadas em 10.000 rpm por 10 minutos para retirada do RL. Posterior a isso, suspendeu-se as células em tampão e fez-se a leitura da absorção inicial da DO em 610 nm. Depois, alíquotas de 3,6 mL da suspensão celular foram adicionadas em tubos contendo 0,6 mL de hexadecano, que foi agitado em vortex por 2 minutos. Subsequentemente, deixaram-se os tubos parados por 1 hora.

Ao término deste tempo, a densidade óptica da fase aquosa, isto é, da fase inferior do tubo, foi medida em 610 nm. A hidrofobicidade foi expressa em porcentagem de células aderidas ao hidrocarboneto e calculada como segue:

$$\text{Hidrofobicidade} = [1 - (\text{DO da fase aquosa} / \text{DO da fase da suspensão inicial})] * 100.$$

4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

As amostras das bactérias controle e tratamentos com o biossurfatante foram preparadas sob condições do pH neutro.

Inicialmente as amostras das bactérias (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) foram cultivadas em meio sólido de TSYEA, durante 24 horas a 37 °C. As bactérias foram suspensas em tampão PBS (pH 7,4), colocadas para centrifugação em *eppendorfs* por 10 minutos a 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante. A massa celular foi ajustada a DO para $2,0 \pm 0,1$ em 610 nm. E realizou-se os tratamentos com RL na seguinte forma: as bactérias (*Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) que apresentaram CIM no pH 7,0, respectivamente, 19,5 e 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ seguiu-se em tratamentos com RL na CIM e 100 vezes CIM. Já para as bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) que não apresentaram CIM inicial no pH neutro, foram realizados tratamentos com RL no valor de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a variação com aumento de 100 vezes.

As culturas tratadas com RL foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Decorrido esse período as amostras passaram pelo processo de centrifugação (10.000 rpm por 10 min). Realizou-se uma lavagem com tampão PBS, reservando as massas celulares. Após a lavagem as massas celulares foram depositadas em gotas de 10 μL em suportes de silício (aproximadamente 1,0 x 1,0 cm) para secagem em dessecador a vácuo por 3 horas.

Depois das amostras secas, prosseguiu-se para análise em espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (*Thermo Scientific*, Nicolet iS50 FT-IR), operando a temperatura do nitrogênio líquido. Os espectros foram obtidos em modo de transmitância, no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4,0 e 64 *scans* por amostra.

4.6 Mecanismos para avaliação da permeabilidade da membrana

Para a avaliação dos efeitos do RL sobre a permeabilidade da membrana das bactérias, foram realizadas as seguintes técnicas: *Determinação de proteínas*, esta análise teve como finalidade observar a quantidade de proteínas presentes no meio extracelular após o tratamento com RL; *Análise do extravasamento celular*, esta análise avalia a quantidade de material intracelular do tipo ácidos nucleicos extravasados nas células bacterianas; *Análise da*

captação do cristal violeta, que avalia a capacidade de captação do corante cristal violeta devido a permeabilidade da membrana celular.

4.6.1 Determinação de proteínas

A quantidade de proteínas presentes no meio extracelular das bactérias (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) após o tratamento com o RL foram determinadas através da metodologia de Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino para a curva padrão.

As bactérias foram cultivadas em meio de TSYEA durante 24 horas a 37 °C. Essas foram suspensas em tampão PBS pH 7,4 e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Fez-se a suspensão do inóculo e padronizou a DO para $1,0 \pm 0,1$ a 610 nm. Separaram-se os inóculos padronizados em tubos de ensaios e adicionou-se o tratamento com RL por 2 h à 37 °C.

Os tratamentos realizados foram a partir da CIM e aumento de 100 vezes CIM, no pH neutro para as bactérias *Bacillus cereus* (CIM de $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Listeria monocytogenes* (CIM de $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). As bactérias que não apresentaram CIM no pH neutro (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) fez-se o tratamento com RL na concentração a partir de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e aumento com variação de 100 vezes.

Depois do tratamento, alíquotas de 2 mL de cada tubo foram transferidos para *eppendorfs*, que foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. Amostras de 1 mL do sobrenadante foram retiradas e armazenadas em outros tubos de ensaio utilizados como amostras para se fazer a determinação de proteínas.

Para a determinação de proteínas inicialmente preparou-se as soluções:

- Solução A: Na_2CO_3 em NaOH 0,1M. Para um volume final de 100 mL, dissolveu-se 2 g de Na_2CO_3 e 0,4 g de NaOH em 100 mL de água destilada.
- Solução B: CuSO_4 1% em água. Dissolveu-se 0,156 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL de água destilada.
- Solução C: Tartarato de Sódio e Potássio 1% e água. Dissolveu-se 0,1 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL de água destilada.

As soluções foram armazenadas na geladeira. Inicialmente, na hora do uso, preparou-se a solução 1, misturando-se 50 mL da solução A, 0,5 mL da solução B e 0,5 mL da solução C, e diluiu-se o reagente de Folin-Ciocalteu para 1:1 em água destilada. Para a construção da curva padrão albumina paralelamente utilizou-se 6 tubos referentes as concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (todos com 1 mL de volume final).

Para o experimento preparou-se os tubos de ensaio: um com 1 mL de água destilada (branco), um com amostra controle e outros dois com as amostras tratamento, todos com 1 mL da amostra. Em seguida, adicionou-se 5 mL da solução 1 em cada tubo, agitou-se e deixou-se entrar em equilíbrio por 15 min à temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se a cada tubo 0,5 mL do reagente de Folin diluído, agitou-se e esperou-se mais 30 min à temperatura ambiente.

A leitura da quantidade de proteínas foi feita através da absorbância em espectrofotômetro em 660 nm. Construiu a curva padrão e obteve-se a equação da reta, a qual foi utilizada para encontrar a concentração de proteínas na amostra.

4.6.2 Análise do extravasamento celular

Para a análise, as linhagens bacterianas (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) foram cultivadas em meio de cultura TSYEB, durante 24 horas a 37 °C. Em tampão PBS (pH 7,4) as bactérias foram suspensas, lavadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min.

Os inóculos bacterianos foram padronizados em DO de $0,10 \pm 0,01$ a 610 nm. A partir dessa suspensão, realizou-se tratamento com RL referente a CIM encontrada no pH neutro, para as bactérias (*Bacillus cereus* CIM de 19,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e *Listeria monocytogenes*, CIM de 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e variações com aumentos em 5 vezes, 10 vezes e 100 vezes CIM. Já para as bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) tratou-se com RL em concentrações de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e nas demais variações de concentrações como descrito anteriormente. Em todas as amostras das bactérias, houve um grupo controle sem tratamento com RL.

As amostras controle e tratamentos foram incubadas durante 2 horas a 37 °C. Transcorrido esse período, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm por 10 minutos) e lavadas em tampão. O sobrenadante foi submetido a leitura da densidade óptica em 260 nm, como descrito por Zhou et al., (2008).

4.6.3 Análise da captação do cristal violeta

As linhagens bacterianas foram cultivadas em caldo TSYEB, durante 24 horas a 37 °C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, lavadas e suspensas em tampão PBS (pH 7,4). Ajustou-se a DO para $0,1 \pm 0,1$ em 610 nm. Após realizado esse procedimento, as bactérias (*Bacillus cereus*, CIM de $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *Listeria monocytogenes*, CIM de $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram tratadas com RL na CIM e em variações com aumentos em 5 vezes, 10 vezes e 100 vezes a CIM referente a atividade antimicrobiana encontrada no pH neutro. As bactérias que não apresentaram CIM (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) neste pH neutro, foram tratadas a partir de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ramnolipídeo e nas variações de concentrações como descrito acima.

As culturas tratadas com ramnolipídeo foram incubadas durante 2 hora a 37 °C. Decorrido esse período as amostras controle e tratamentos foram centrifugadas (10.000 rpm por 10 minutos), lavadas em tampão e suspensas em cristal violeta ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparado em solução de PBS (pH 7,4) incubando-se sob vigorosa agitação orbital (*Tecnal*, TE-420 Incubadora) à 200 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Transcorrido esse período, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante foi removido para a leitura no espectrofotômetro UV-VIS (*Thermo Scientific*, Genesy 10 UV Scanning) em 590 nm. A porcentagem de absorção do corante cristal violeta foi calculado como D.O amostra / D.O cristal violeta multiplicado por 100, conforme descrito por Vaara e Vaara (1981).

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

A visualização do efeito do biossurfatante RL na morfologia celular das bactérias sensíveis foi realizado para *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Inicialmente a cultura bacteriana foi cultivada em meio TSYEA durante 24 horas a 37 °C. Esta foi suspensa em tampão PBS (pH 7,4), transferida para tubos *ependorfs* e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, a massa celular foi utilizada para padronização do inóculo em DO de $1,0 \pm 0,1$ em 610 nm. A suspensão padronizada foi dividida em tubos de ensaios; controle (sem tratamento) e tratamento CIM e tratamento com aumento de 100 vezes CIM do biossurfatante RL, durante 2 horas a 37 °C em estufa.

Transcorrido o tratamento nos tubos de ensaios, retirou-se as amostras transferindo-as em *eppendorfs* para realização de duas lavagens com tampão PBS em centrífuga a 5000 rpm por 5 minutos. Após as lavagens, desprezou-se o sobrenadante e realizou-se a fixação da massa celular com adição de 1 mL de tampão PBS contendo 2,5% de glutaraldeído e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente.

Após a fixação, as células bacterianas foram lavadas duas vezes com tampão PBS em centrífuga. Depois as amostras foram submetidas a desidratação através da imersão em soluções crescentes de álcool etílico (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95% e 100%) permanecendo por 10 min em cada solução e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos.

Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,5 mL de HMDS (Hexametildisilazano) (*Sigma*) para secagem das amostras em solução. Prosseguiu-se a análise aplicando uma alíquota de 10 µL de cada amostra, sobre o suporte para metalização do material, recobrimdo-as com platina. As análises de visualização foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (*Inspect F-50*, FEI).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes da atividade antimicrobiana

Os resultados com os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) das bactérias expostas ao ramnolipídeo são mostradas na Tabela 2.

As bactérias Gram positivas: *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* apresentaram CIM nas concentrações do RL em 19,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e mostrou CBM, respectivamente, em 39,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 312,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir desses resultados ficou comprovado que o RL é eficiente para o controle e combate dessas bactérias patogênicas com efeito bacteriostático nas CIM e ação bactericida nas CBM.

Tabela 2 - Valores de CIM e de CBM das bactérias expostas ao ramnolipídeo no pH 7,3.

Bactérias	Ramnolipídeo	
Gram positivas	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Bacillus cereus</i>	19,5	39,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	156,2	312,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>2500	>2500
Gram negativas		
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	>2500	>2500
<i>Salmonella enterica</i>	>2500	>2500

Staphylococcus aureus não apresentou CIM e CBM nas concentrações testadas, obtendo valores acima de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, o crescimento de *Staphylococcus aureus* nas primeiras colunas das placas (onde se tem as maiores concentrações do RL), demonstrou redução no crescimento, embora confirmado pela coloração do MTT a presença de atividade metabólica (Figura 19). Para evidenciar a redução fez-se a medida da Densidade Óptica em 610 nm utilizando a leitora de microplacas (*Enspire - Perkin Elmer*) da coluna 1 em relação a coluna 11 do controle de crescimento, observou-se que houve 56,8% de redução do crescimento bacteriano.

Figura 19 - Imagens das microplacas de *Staphylococcus aureus* no teste de antimicrobiano no pH 7,3. Em (A) imagem de frente e em (B) o fundo da microplaca.

Para as bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* não foram encontrados CIM e CBM nas concentrações testadas de RL que variaram de 2500 a 4,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Assim estas mostraram-se não susceptíveis ao biosurfatante.

Os testes de CIM e CBM, evidenciaram que as bactérias patogênicas alimentares *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* foram mais sensíveis ao RL. Estudos realizados por Benincasa et al. (2004), avaliaram a atividade antimicrobiana do RL frente a diferentes linhagens de bactérias Gram positivas e Gram negativas, e apontaram que o RL foi mais eficaz para as linhagens *Bacillus*, com CIM de 4 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, outros autores (LANG; WAGNER, 1993) encontraram CIM em 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A linhagem da bactéria *Listeria monocytogenes* exibiu resultados semelhantes em estudos de Magalhães e Nitschke, (2013) com CIM de 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Embora *Staphylococcus aureus* não tenha demonstrado CIM do RL nas condições inicialmente propostas, estas apresentaram redução visível no crescimento microbiano; assim pode-se inferir que a ação do RL para esta bactéria tenha sido parcial. Atentando-se ao fato dessa bactéria seja um importante patógeno oportunista do ser humano, esses resultados de inibição do crescimento evidenciam grande relevância. Benincasa et al. (2004) também observaram comportamentos diferentes entre linhagens de *Staphylococcus* evidenciando a sensibilidade ao RL apenas para algumas cepas.

Abalos et al. (2001) e Benincasa et al. (2002) descreveram que linhagens de *Escherichia* e *Salmonella* foram sensíveis ao RL. Contrariamente as espécies de *Escherichia coli* (EHEC) e *Salmonella enterica* avaliadas neste trabalho foram resistentes. A susceptibilidade e a resistência à um antimicrobiano podem ser influenciadas por inúmeros fatores, como: a concentração, pH e tempo de exposição com o antimicrobiano além das características de cada linhagem (MADIGAN et al., 2010).

As bactérias Gram negativas apresentam diferenças estruturais que lhes conferem maiores resistências aos antimicrobianos. A presença de uma membrana externa, acima da parede celular, atribui barreira química e física. A membrana externa da célula Gram negativa compõe lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolípidos que conferem maior seletividade à entrada de moléculas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Diferentemente das bactérias Gram negativas, as bactérias Gram positivas não apresentam a membrana externa em sua composição estrutural assim estariam mais suscetíveis a ação de agentes que afetam a membrana celular como os surfatantes.

5.2 Influência do pH na atividade antimicrobiana

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) do ramnolípido em diferentes faixas de pH são exibidos na Tabela 3.

Bacillus cereus não demonstrou crescimento microbiano nos pH 5,0 e 6,0. No entanto, apresentou crescimento para os demais valores de pH. Para o pH 7,0 ficou evidenciado a ação antimicrobiana do ramnolípido com a CIM de 19,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a CBM de 39,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o pH 8,0 a CIM resultou em 78,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e também apresentou a CBM em 78,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No pH 9,0 a CIM do ramnolípido foi observada em 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a CBM em 312,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para *Listeria monocytogenes* não houve crescimento bacteriano no pH 5,0. Nos pH 6,0 e 7,0 a bactéria apresentou as CIM de 19,5 e 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, e CBM de 78,1 e 312,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não foi evidenciado CIM para os pH 8,0 e 9,0 nas concentrações testadas do ramnolípido.

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi capaz de crescer em todos os pH testados. Nos pH 5,0 e 6,0 as CIM foram observadas em 9,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 39,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e apresentou ação bactericida (CBM) em pH 5,0 com 39,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do ramnolipídeo em diferentes valores pH.

Bactérias	pH 5,0		pH 6,0		pH 7,0		pH 8,0		pH 9,0	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Bacillus cereus</i>	*	—	*	—	19,5	39,1	78,1	78,1	156,2	312,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	*	—	19,5	78,1	156,2	312,5	>2500	—	>2500	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,8	39,0	39,1	—	>2500	—	>2500	—	>2500	—
<i>Escherichia coli</i>	>2500	—	>2500	—	>2500	—	>2500	—	>2500	—
<i>Salmonella Enterica</i>	>2500	—	>2500	—	>2500	—	>2500	—	>2500	—

* Não apresentou crescimento bacteriano no pH indicado

— Não apresentou concentração bactericida mínima

Através destes ensaios confirmou-se que as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis quando expostas ao RL mesmo nas diferentes faixas de pH. Os resultados evidenciaram que a redução nos valores de pH resulta em menores valores de CIM. Ou seja, em pH menores o efeito antimicrobiano do RL é favorecido, tornando-se mais efetivo. Destacando-se *S. aureus* que apresentou nítida influência do pH na atividade antimicrobiana do RL. Desta forma, pode-se concluir que o pH influencia a atividade antimicrobiana do RL.

Atividade antimicrobiana melhorada em pH mais ácidos pode ser relacionada a protonação dos grupos carboxila do ramnolipídeo. Como aponta o estudo de Ishigami, Gama e Nagahora (1987) o pKa dos RL é em torno de 5,6. Em pH mais ácidos os grupos polares do RL, apresentam-se protonados predominando a forma não iônica. Assim, não promoveriam repulsão à carga negativa pelos grupos hidrofílicos da bicamada lipídica, podendo facilitar a interação com a membrana.

Em pH mais alcalinos os grupos polares do RL, apresentam-se desprotonados, carregados negativamente. Esse processo, promove menor interação do antimicrobiano frente aos componentes das superfícies da célula, onde predominam em geral, cargas negativas. Dessa forma, torna-se necessárias maiores quantidades do antimicrobiano, como pôde-se

observar nos resultados apresentados, visto que nem todo o conteúdo do RL estariam na forma desprotonada.

As moléculas dos RL apresentam agregados moleculares que são influenciados pelos valores de pH (RAZA et al., 2010; CHAMPION et al., 1995). O aumento dos valores de pH em solução, induz mudanças dos grupos hidrofílicos (polares) dos RL dissociando-se para cargas negativas, isso faz com que as forças repulsivas entre as cabeças dos grupos hidrofílicos adjacentes de RL aumentem. Dessa forma, tem-se a tendência de formarem agregados altamente carregados negativamente e pequenos como as micelas. Consequentemente, a interação do antimicrobiano RL com a superfície bacteriana, poderia ser dificultada. Em pHs menores a presença de estruturas vesiculares e não iônicas poderia favorecer a interação com as células.

5.3 Curva de sobrevivência (ensaio time-kill)

Foram construídas curvas de sobrevivência para as bactérias *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, susceptíveis ao RL em pH 7,0 (neutro), utilizando os valores de CIM e CBM determinados previamente (Tabela 3).

A curva de sobrevivência para ambos os grupos controle de *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, mostraram o perfil típico de crescimento bacteriano. No tempo de 0 a 2 horas, crescimento pouco acentuado (fase lag); das 2 às 8 horas, crescimento exponencial (fase log) e das 8 às 24 horas, fase estacionária, quando tem-se o número de células novas em equilíbrio com de morte celular (Figura 20 e Figura 21).

O RL na concentração de $39,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou efeito bactericida a partir de 30 minutos de incubação erradicando a população de *Bacillus cereus*. Já para a CIM de $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ pode-se observar que houve uma inibição maior até o período de 4 horas, a partir desse período houve crescimento, possivelmente indicando o desenvolvimento de resistência bacteriana (Figura 20). Desta forma, apresentou ação bacteriostática corroborando com os resultados obtidos anteriormente.

Figura 20 - Curva de sobrevivência de *Bacillus cereus* na presença de RL na CIM e CBM.

Para *Listeria monocytogenes*, a curva de sobrevivência na concentração de CBM (312,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mostrou efeito inibitório do crescimento desde os primeiros tempos do tratamento do RL com ação bactericida evidenciada a partir de 8 horas (Figura 21). Já para a concentração inibitória mínima de 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o antimicrobiano apresentou elevada redução do número de células viáveis. A ação bacteriostática observada no teste de CIM é discutível, visto que se observou redução maior de 3 unidades logarítmicas em relação ao controle, podendo inferir há ação bactericida (SCHWALBE; STEELE-MOORE; GOODWIN, 2007).

Figura 21 - Curva de sobrevivência de *Listeria monocytogenes* na presença de RL na CIM e CBM.

As construções das curvas de sobrevivências, evidenciaram o efeito do RL no tempo frente as bactérias suscetíveis. A Figura 22 ilustra o aspecto visual dos tubos de ensaio onde foi realizado os experimentos.

Figura 22 - Ilustração dos ensaios para a curva de sobrevivência de *Listeria monocytogenes*. (A) início da incubação (B) após 24 horas de incubação.

Para *Bacillus cereus* após 30 minutos de contato com o RL, observou-se a erradicação da população bacteriana, demonstrando grande potencial para utilização do RL no controle deste importante patógeno alimentar. A sensibilidade ao RL, também foi demonstrada por Abalos et al., (2001) e Haba et al., (2000) para *Bacillus cereus* encontrando valores de CIM em $64 \mu\text{g mL}^{-1}$, maiores do que os resultados encontrados no estudo.

Para *Listeria monocytogenes* a população foi erradicada após 8 horas de incubação com o RL. Resultados semelhantes foram descritos por Magalhães e Nitschke (2013).

A atuação antimicrobiana do RL provavelmente ocorre nas membranas das bactérias (BHARALI et al., 2013). A membrana plasmática é constituída principalmente de fosfolipídeos e proteínas. Os fosfolipídeos de membrana apresentam porção hidrofóbica devido as cadeias de ácidos graxos e porção hidrofílica pelos grupos glicerol e fosfato. Quando em solução, essas estruturas se agregam formando uma bicamada fosfolipídica; com os grupos hidrofóbicos voltados para o interior e os grupos hidrofílicos voltados para o exterior, onde se associam à água (MADIGAN et al., 2010). Essa organização estrutural permite que outras moléculas possam interagir com as superfícies nas membranas.

Como o RL é uma molécula anfifílica, possuindo parte hidrofóbica e parte hidrofílica possibilita-se desta forma, diferentes interações que poderiam promover a desestruturação da organização das membranas. Visto a importância da integridade da membrana para a bactéria, danos a esta levam a morte celular.

5.4 Análise da hidrofobicidade celular

A avaliação da hidrofobicidade das superfícies das bactérias em relação ao hexadecano (solvente apolar) depois de tratadas com o RL é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Hidrofobicidade celular das bactérias antes e após tratamento com RL.

	Hidrofobicidade ao hexadecano (%)		
Bactéria	Controle	Trat. CIM	Trat. 100 x CIM
<i>Bacillus cereus</i>	46,8	10,7	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	31,6	9,9	-
	Controle	Trat. 50 µg mL ⁻¹	5000 µg mL ⁻¹
<i>Staphylococcus aureus</i>	79,5	65,3	-
<i>Escherichia coli</i>	10,6	7,1	2,2
<i>Salmonella enterica</i>	2,2	3,2	15,5

(-)Valores da hidrofobicidade negativos.

Para a bactéria *Bacillus cereus* a hidrofobicidade da superfície das células após tratamento com RL mostrou redução 46,8% para 10,7%, representando redução de 77,2% da hidrofobicidade inicial do grupo controle. O tratamento 100 x CIM, as bactérias apresentaram elevada redução chegando a valores mínimos de hidrofobicidade.

Listeria monocytogenes apresentou redução da hidrofobicidade para os dois tratamentos com RL. Inicialmente as células exibiram 31,6% de hidrofobicidade ao hexadecano. Depois de tratadas na CIM do RL, a hidrofobicidade decaiu aproximadamente 69% em relação ao controle.

Para *Staphylococcus aureus* evidenciou-se inicialmente alta hidrofobicidade das superfícies celulares pelo hexadecano (79,5%). Depois do tratamento de 50 µg mL⁻¹ com RL, a bactéria apresentou redução em relação ao grupo controle, de aproximadamente 18%.

A hidrofobicidade das superfícies *Escherichia coli* apresentaram inicialmente baixas (10,6%). Depois das células tratadas com o RL, em ambas concentrações, observou-se redução no caráter hidrofóbico das superfícies com valores de 7,1% e 2,2% respectivamente, do tratamento de menor concentração para a maior concentração.

Salmonella enterica também apresentou caráter hidrofóbico muito reduzido (2,2%). Posterior ao tratamento com RL, os níveis de hidrofobicidade das superfícies das células aumentaram, diferentemente do observado nas demais bactérias.

A afinidade pelo hexadecano revela a hidrofobicidade da superfície celular. Desta forma, quanto maior a afinidade pelo solvente apolar, maior será a hidrofobicidade da superfície do microrganismo (PROKOPOVICH; PERNI, 2009).

Pelos resultados apresentados observou-se que as bactérias *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* exibiram maior redução na hidrofobicidade das superfícies das células após tratamento com o RL (Tabela 4). Essas reduções na hidrofobicidade das superfícies das células podem estar relacionadas a maior sensibilidade ao RL exibida por estas linhagens.

O biossurfatante RL apresenta caráter anfifílico, parte apolar e parte polar. A redução do caráter apolar ou hidrofóbico da superfície celular observada após o tratamento com o ramnolípido, pode se dever a remoção de componentes apolares como cadeias de hidrocarbonetos e componentes de ácidos graxos, ou seja, interação entre os grupos apolares da superfície bacteriana com a porção apolar do RL.

Salmonella enterica apresentou baixa afinidade pelo hexadecano (solvente muito apolar), desta forma, exibe baixo caráter hidrofóbico nas superfícies. Isso pode ser correlacionado com elevada presença de grupos polares nos lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas na membrana externa. O aumento da hidrofobicidade observada para essas bactérias após o tratamento com RL pode ser consequência da remoção de componentes polares, hidrofílicos. Estudo de Al-Tahhan et al. (2000) observaram aumento da hidrofobicidade após remoção dos LPS das membranas de bactérias Gram negativas.

5.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de bactérias podem ser considerados como padrões semelhantes a impressões digitais, sendo altamente reprodutíveis, apresentando bandas com contornos gerais e característicos estrutural de cada bactéria (NAUMANN; FIJALA; LABISCHINSKI, 1988). Os espectros de FTIR em bactérias embora apresentem bandas complexas fornecem informações sobre a componentes químicos total da célula como as proteínas, membranas, parede celular, ácidos nucleicos, entre outros (HELM et al., 1991).

A espectroscopia IR fornece informações espectral das vibrações moleculares realizadas por moléculas de células, tecidos ou biofluidos que permite distinguir diferentes

tipos de células, estruturas e até mesmo detectar alterações induzidas nestes materiais biológicos (NAUMANN, 2008).

Cada material celular apresenta bandas particulares que permitem os seus estudos. Naumann (2000) propõem classificação de bandas frequentes para material microbiológico e estas classificações foram utilizadas como caracterização dos espectros obtidos das bactérias após realizado tratamento com o RL.

A primeira região do espectro 4000 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} apresenta uma banda alargada referente a estiramentos do grupo O-H ($\sim 3500\text{ cm}^{-1}$) presentes em água, polissacarídeos e proteínas. Ainda dentro dessa faixa ($\sim 3200\text{ cm}^{-1}$) apresenta estiramento de grupos N-H de amida A de proteínas.

As regiões de bandas entre número de ondas 3000 e 2800 cm^{-1} representam regiões de lipídeos, apresentando vibrações de estiramento de C-H, $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$ estiramento assimétrico $-\text{CH}_3$, ~ 2925 estiramento assimétrico de $-\text{CH}_2$ e $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$ e 2850 cm^{-1} estiramento simétrico de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$. Esses tipos de ligações encontram-se em fosfolipídios em membrana citoplasmática e membrana externa em bactérias Gram-negativas, além de vibrações aminoácidos de proteínas de apêndices.

As bandas referentes em $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ e 1715 cm^{-1} refere-se a estiramento simétrico em ligações C=O de ésteres, presentes ácidos nucleicos de DNA e RNA.

As bandas intensas entre $\sim 1695\text{ cm}^{-1}$ e 1390 cm^{-1} correspondem a funções de proteínas presentes em estruturas celulares de apêndices e parede celulares. As regiões entre 1695 cm^{-1} e 1655 cm^{-1} é atribuída a amidas primárias, que resulta em estiramentos simétricos C=O e deformação simétricas de ligações N-H, componentes resultantes de folhas- β de proteínas e estruturas de α -hélice, nos espectros essas bandas apresentam-se mais proeminentes em infravermelho de bactérias. Em $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ a 1520 cm^{-1} é atribuída a amidas secundárias de proteínas, que consiste em deformações simétricas de N-H e estiramentos simétricos de C-N.

As próximas regiões localizadas em 1468 cm^{-1} e $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ referem-se a deformações de ligações de C-H em CH_2 e estiramentos simétricos de ligações C=O de grupos carboxilas. Presentes em proteínas (apêndice, parede celular e ribossomos) e carboidratos (polissacarídeos, parede celular e inclusões).

A região de banda em 1250 cm^{-1} a 1220 cm^{-1} refere-se a ligações de P=O em estiramentos assimétricos de PO_2^- e grupos fosfodiésteres, presentes em fosfolipídeos de membrana e carboidratos como os ácidos teicóicos e lipoteicóicos das paredes celulares de bactérias Gram positivas.

As bandas das regiões 1200 cm^{-1} e 900 cm^{-1} referem-se a deformações simétricas de grupos fosfatos de ácidos nucleicos e sequência complexa com deformações axiais de C-O-C e C-O-P de vários oligo e polissacarídeos. As regiões entre 900 cm^{-1} e 600 cm^{-1} é conhecida como região de impressão digital exibindo variedade de bandas fracas sobrepostas devido a vibrações de anéis aromáticos de aminoácidos.

As figuras 23, 24, 25, 26 e 27 apresentam os espectros das amostras do material celular das bactérias; *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, respectivamente, sem tratamento e após tratamento com RL durante 24 horas.

Pela análise dos espectros após os tratamentos com o RL para as bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) pode-se observar um perfil semelhante para região entre 3300 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} dos espectros. Observou-se diminuição da intensidade de bandas nessas regiões conforme empregado os tratamentos com RL, evidenciando mudanças vibracionais de estiramentos simétricos de N-H, presentes em amidas do tipo A. Esses tipos de ligações são características de proteínas presentes em estruturas de parede celular das bactérias (NAUMANN, 2000; KANSIZ et al., 1999; SILVA, 2010).

Figura 23- Espectroscopia IR de *Listeria monocytogenes* após tratamento com RL na CIM e 100xCIM durante 24 horas.

Figura 24- Espectroscopia IR de *Bacillus cereus* após tratamento com RL na CIM e 100xCIM durante 24 horas.

Figura 25- Espectroscopia IR de *Staphylococcus aureus* após tratamento com RL em 50 µg mL⁻¹ e 5000 µg mL⁻¹ durante 24 horas.

Figura 26- Espectroscopia IR de *Escherichia coli* após tratamento com RL em $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 horas.

Figura 27- Espectroscopia IR de *Salmonella enterica* após tratamento com RL em $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 horas.

As regiões das bandas de $\sim 2959\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2934\text{ cm}^{-1}$ conforme o aumento dos tratamentos com o RL, também apresentaram diminuição na intensidade das bandas das bactérias Gram positivas. Essas modificações são referentes a estiramentos de C-H de $-\text{CH}_3$ e de $-\text{CH}_2$ presentes em fosfolipídios de membranas. Lu et al. (2011) relatam que a presença de encurtamentos de bandas evidencia injúria ao material bacteriano.

O aumento das bandas encontradas nos espectros de *Bacillus cereus* das regiões dos picos $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ a $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ depois das bactérias tratadas com RL, refere-se a componentes proteicos em estiramentos de C=O e deformações N-H em amidas I, e estiramentos de C=O de grupos COO^- e deformações simétricas de C-H₃ e assimétricas de C-H₂ em proteínas e polissacarídeos presentes nas superfícies da parede celular. Esses aumentos na intensidade dessas bandas corroboram com as análises de extravasamento proteico onde se observou proeminente aumento da quantidade de proteínas (Figura 28) e também visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 30).

As bactérias Gram negativas *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* apresentaram pequenas alterações nos espectros quando submetidos ao tratamento com o RL. Na banda 700 cm^{-1} apresentaram aumento nas intensidades, essas regiões são chamadas de impressões digitais altamente complexas e difícil de interpretação referente a vibrações de anéis aromáticos pela deformação de $-\text{CH}$ de aminoácidos presentes nas estruturas da membrana externa de bactérias. De modo geral, em concordância com o obtido no ensaio de atividade antimicrobiana, os espectros dessas bactérias não apresentaram grandes alterações na superfície podendo atribuir que essas bactérias são mais resistentes ao RL pela presença da membrana externa.

As alterações evidenciadas através dos espectros infravermelhos notaram-se que o RL promoveu alterações significativas nas intensidades das bandas de proteínas e lipídios presentes em fosfolipídios de membranas evidenciados nas bactérias Gram positivas. Resultados semelhantes encontrados por Bharali et al. (2013) relataram mudanças estruturais em componentes de banda de proteínas presentes na membrana celular após tratamento com RL sugerindo ação nos componentes da membrana celular.

5.6 Determinação de proteínas totais

O efeito do biossurfatante sobre a liberação de proteínas no meio extracelular nas bactérias Gram positivas e Gram negativas podem ser observados na Figura 28.

Figura 28 - Concentração de proteínas extracelulares após tratamento das bactérias com diferentes concentrações de RL.

Para *Bacillus cereus* as concentrações de proteínas extracelulares presentes no meio evidenciaram aumento de acordo com aumento da concentração. As proteínas totais após os tratamentos na concentração de 100x CIM ($1950 \mu\text{g mL}^{-1}$) mostraram valores de 6 vezes maiores em relação ao tratamento de CIM.

Em *Listeria monocytogenes* as concentrações de proteínas extracelulares mostraram aumentos segundo os tratamentos de CIM ($156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as variações dos tratamentos (Figura 28). O valor obtido de proteína extracelular, na concentração de 100x CIM evidenciou ser o dobro da CIM.

Staphylococcus aureus apresentou pequena variação no conteúdo de proteínas extracelulares quando alterou as concentrações de RL (Figura 28), sugerindo resistência a permeabilização destas moléculas.

Para *Escherichia coli* após o tratamento de menor concentração ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), obteve-se o valor de $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas extracelulares. Após os tratamentos com RL, *Escherichia coli* apresentou progressivo aumento na liberação de proteínas. Verificou-se um aumento de proteínas extracelulares em 49 vezes na concentração de $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RL.

Salmonella enterica na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RL demonstrou $0,24 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas extracelulares. Após tratamentos com a concentração de $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$, verificou-se aumento da liberação de proteínas em 8 vezes.

A concentração de proteínas extracelulares aumentou de forma geral para todas as bactérias e foi mais pronunciada para *Bacillus cereus* (mais sensível ao RL). O efeito observado pode estar associado a permeabilização da membrana celular provocada pelo RL.

Sotirova et al. (2008) também evidenciaram o aumento das concentrações de RL levavam ao aumento dos níveis de liberação de proteínas, inferindo alterações na permeabilidade das membranas das bactérias Gram positivas.

A presença do elevado nível de proteínas extracelulares presentes nas bactérias resistentes ao RL, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* possivelmente se deve solubilização de componentes da parede que foram mais evidentes em elevadas concentrações de RL.

5.7 Análise do extravasamento celular

A investigação sobre o extravasamento celular após do tratamento com ramnolipídeo nas diferentes linhagens de bactérias Gram positivas e Gram negativas podem ser observadas na tabela 5.

Tabela 5 - Liberação de material intracelular após tratamento com RL em diferentes concentrações.

	Densidades ópticas (260 nm)			
Bactéria	CIM	Tratamentos de RL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		5x CIM	50x CIM	100x CIM
<i>Bacillus cereus</i>	0,156 $\pm$ 0,05	0,171 $\pm$ 0,05	0,199 $\pm$ 0,06	0,258 $\pm$ 0,08
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,135 $\pm$ 0,01	0,147 $\pm$ 0,02	0,562 $\pm$ 0,03	0,999 $\pm$ 0,04
		Tratamentos de RL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	500	2500	5000	50000
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,083 $\pm$ 0,03	0,130 $\pm$ 0,03	0,267 $\pm$ 0,03	0,414 $\pm$ 0,02
<i>Escherichia coli</i>	0,019 $\pm$ 0,03	0,150 $\pm$ 0,03	0,259 $\pm$ 0,01	0,403 $\pm$ 0,09
<i>Salmonella enterica</i>	0,034 $\pm$ 0,02	0,085 $\pm$ 0,03	0,278 $\pm$ 0,03	0,378 $\pm$ 0,01

Os resultados sugerem que nos valores das altas concentrações utilizadas, os ramnolipídeos são capazes de provocar liberação de componentes intracelulares do tipo ácidos nucleicos.

Observa-se que as bactérias *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* foram mais sensíveis em relação das demais bactérias. Esse perfil corrobora com os resultados de ação antimicrobiana.

É conhecido que as membranas citoplasmáticas são os principais alvos de danos celulares causados pelos surfatantes (SOTIROVA et al., 2008; NIELSEN et al., 2005). As alterações observadas através da liberação dos componentes intracelulares indicam um aumento na permeabilidade da parede/membrana promovida pelo aumento das concentrações de RL testadas em todas as bactérias.

Bharali et al. (2013) em seu trabalho com ramnolipídeo constataram um aumento da liberação de materiais intracelulares absorvidos na faixa de 260 nm, tanto para as bactérias Gram positivas como para Gram negativas, associando essas alterações promovidas pelo tratamento de RL.

5.8 Análise da captação do cristal violeta

A captação do corante cristal violeta, de modo geral, aumentou conforme se elevou as concentrações de RL para todas as bactérias do estudo. Os resultados podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 - Captação do cristal violeta após tratamento com RL em diferentes concentrações.

	Captação do cristal violeta (%)			
Bactéria	Tratamentos de RL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	CIM	5x CIM	50x CIM	100x CIM
<i>Bacillus cereus</i>	49,7	50,6	52,6	55,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	13,1	14,0	19,6	35,8
	Tratamentos de RL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	500	2500	5000	50000
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,7	8,2	10,3	26,4
<i>Escherichia coli</i>	1,6	2,7	21,6	27,4
<i>Salmonella enterica</i>	2,1	9,1	15,1	20,4

Para *Bacillus cereus* observou aumento gradual de captação do cristal violeta à medida que se elevou as concentrações dos tratamentos com RL. Evidenciou-se captação mais elevada de 55,5 % no tratamento 100 x CIM.

Em *Listeria monocytogenes* também ocorreu aumento na porcentagem de captação do cristal violeta. Demonstrando captação de 35,8% na concentração de 100x CIM representando 2,7 vezes o tratamento CIM.

Staphylococcus aureus apresentou uma porcentagem baixa de captação do cristal violeta de 0,7% no tratamento de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, obteve-se elevada captação na concentração de 50000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 26,4%.

As bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Salmonella* exibiram valores menores de absorção de cristal violeta. Sendo mais expressivos os resultados em elevadas concentrações de RL. Assim *Escherichia coli* e *Salmonella* mostraram pequena permeabilidade ao corante depois do tratamento com o RL sugerindo menores danos e assim maior resistência a ação do biossurfatante.

A captação do corante cristal violeta pelas células bacterianas indica que o corante pode penetrar nas mais facilmente nas células que sofreram injúrias na membrana devido a ação do biossurfatante (Bharali et al., 2013). A elevada porcentagem de captação do cristal violeta em *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* confirma que estas células são mais sensíveis ao RL assim como observado nos ensaios antimicrobianos. Além disso, sugere que o RL promova alterações na permeabilidade celular.

5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observar possíveis efeitos do ramnolípídeo na morfologia das células de *Listeria monocytogenes*, e *Bacillus cereus* foi realizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura.

Para comparar as injúrias provocadas pelo biossurfatante realizou-se os tratamentos na CIM (Tabela 2) e 100 vezes CIM para cada bactéria. Os resultados podem ser observados nas Figuras 29 e 30.

Figura 29 - MEV de *Listeria monocytogenes*. (A) Imagens do grupo controle, sem tratamento com RL. (B) Imagens após o tratamento com RL na CIM. As setas amarelas indicam alterações morfológicas na parede celular. (C) imagens das bactérias após tratamento na concentração de 100 x CIM. As setas em vermelho indicam presença agregados/material intracelular.

Figura 30 - MEV de *Bacillus cereus* (A) Imagens do grupo controle, sem tratamento com RL. (B) Imagens após o tratamento com RL na CIM. As setas amarelas indicam alterações morfológicas na parede celular e rompimento de células. (C) imagens das bactérias após tratamento na concentração de 100 x CIM. As setas em vermelho indicam presença agregados/material intracelular extravasado.

O perfil mostrado na curva de sobrevivência (Figura 21) corrobora com o observado dos estudos da bactéria *Listeria monocytogenes*. Inicialmente nos grupos controles as bactérias apresentaram imagens com predomínio de células íntegras e superfícies lisas (Figura 29A). Em contraste, após o tratamento de 2 horas com o RL na concentração inibitória mínima ($156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) pode-se observar injúrias nas superfícies celulares, formando dobras e cavidades com diferentes formas e tamanhos. Possivelmente esses danos superficiais levam ao atrofiamento das membranas celulares, podendo ser observadas nas setas de amarelos, Figura 29B.

O tratamento de RL em 100 vezes a CIM, também revela alterações visíveis como observado na Figura 29C. Nessa condição observa-se rompimento celular e presença de agregados que sugerem material intracelular bacteriano demonstrando a eficiência da ação do RL sobre a bactéria.

As bactérias *Bacillus cereus* apresentaram alterações morfológicas na parede celular e rompimento de células após o tratamento de 2 horas com o RL em ambos os tratamentos na CIM e 100 vezes CIM em relação ao controle, podendo ser observado na Figura 30.

As células bacterianas de *Bacillus cereus* dos grupos controles apresentaram predomínio de células íntegras com superfícies lisas e sem evidência de material intracelular no meio (Figura 30A). Após o tratamento com RL na CIM, observou-se imagens com predomínio de rugosidade nas superfícies das células, sucros nas membranas e proeminentes dobras com o rompimento de células (Figura 30B). O tratamento em 100 vezes CIM visivelmente potencializou o agravamento das injúrias das células provocadas na presença do biossurfatante nas paredes/membranas celulares e também na liberação de agregados e material intracelular extravasado (Figura 30C). Diante desses observados, pode-se evidenciar a sensibilidade dessas bactérias na ação antimicrobiana do RL.

5.10 Considerações finais

Através do estudo sobre a atividade antimicrobiana do ramnolipídeo pode-se observar que as bactérias patogênicas alimentares Gram positivas *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* apresentaram susceptibilidade frente ao RL. Trabalhos semelhantes sobre o estudo da atividade antimicrobiana do RL corroboraram o efeito observado para essas bactérias (MAGALHAES; NITSCHKE, 2013; BENINCASA et al., 2004). A bactéria

Staphylococcus aureus não apresentou sensibilidade ao RL no teste de atividade antimicrobiana. Porém, quando avaliada em pH ácido (5 e 6) apresentou sensibilidade. Desta forma, evidenciou que a atividade antimicrobiana do RL é influenciada pelo pH.

As curvas de sobrevivência realizada para *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* evidenciaram a ação do RL em função do tempo. Observou-se que o RL promoveu para *Bacillus cereus* a erradicação da população bacteriana, em apenas 30 minutos de contato na CBM, demonstrando grande potencial para o controle desse patógeno alimentar. Em *Listeria monocytogenes* pode-se notar grande inibição do crescimento desde os primeiros tempos de tratamento na CBM e após 8 horas obteve-se erradicação total da população.

Os ensaios da avaliação da permeabilidade das membranas bacterianas comprovaram que as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis, atribuindo elevados níveis de liberação de proteínas, materiais genéticos e captação do corante cristal violeta. Essas foram influenciadas pelas concentrações do biossurfatante e também pelas características das bactérias Gram positivas sendo mais sensíveis estruturalmente, pois estas apresentam-se composta basicamente por uma espessa camada de peptidoglicano, não possuindo a membrana externa de lipopolissacarídeos como as bactérias resistentes Gram negativas. Estudo de Bharali et al., (2013) mostrou aumento da permeabilidade das membranas bacterianas, causando efluxos de proteínas, íons e outros componentes intracelulares à medida que se aumenta as concentrações do RL.

As alterações da hidrofobicidade sugerem modificações na composição química da parede/membrana celular e foram mais expressivas para *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* em contraste ao observado para as linhagens mais resistentes *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*. As bactérias Gram negativas devido a sua composição estrutural, constituída da membrana externa, mostraram maior proteção e barreira contra os efeitos do RL.

Os espectros de infravermelhos evidenciaram alterações e danos em componentes de proteínas e fosfolipídios da membrana/parede celular das bactérias Gram positivas sugerindo possível atuação do RL nessas estruturas.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu observar efeitos promovidos pelo RL sobre as bactérias mais susceptíveis do estudo *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* comprovando sua atividade antimicrobiana.

5.11. Principais resultados

Os principais resultados deste estudo foram:

- As bactérias Gram positivas *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* foram mais susceptíveis ao antimicrobiano ramnolipídeo.
- Verificou-se que a ação antimicrobiana do RL é influenciada pelo pH, evidenciado principalmente em *Staphylococcus aureus*.
- O ramnolipídeo promoveu alterações na permeabilidade da parede/membrana bacteriana.
- Constatou-se que os RL promovem diminuição na hidrofobicidade das superfícies celulares e alterações na composição química da parede/membrana celular.
- As bactérias Gram negativas *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* são resistentes ao RL.

6. CONCLUSÕES

O biossurfatante RL apresenta potencial para o controle das bactérias Gram positivas *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* exibindo ação bactericida.

Foi comprovado que os ramnolipídeos promovem alterações estruturais na permeabilidade da parede/membrana bacteriana, sugerindo ser este o principal alvo de ação antimicrobiana.

A atividade demonstrada em pH ácidos sugere que os RL podem futuramente ser incorporados como agentes antimicrobianos em alimentos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para complementar o trabalho aqui apresentado sugere-se:

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos componentes majoritários do ramnolípídeo (mono e di) individualmente.
- Verificar a toxicidade do RL verificando possíveis aplicações.
- Selecionar moléculas para serem testadas em conjunto com RL e verificar presença de sinergismos; potencializando a ação antimicrobiana nas bactérias Gram positivas e talvez ação nas Gram negativas.
- Estudar a ação antimicrobiana em biofilmes de bactérias patogênicas alimentares em diferentes pH.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, A. et al. Physico chemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v.17, 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.
- ABRIOUEL, H. et al. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.3, p.1473-1477, 2002.
- AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2007. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 5 mar. 2015.
- AL-TAHHAN, R. A. et al. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3262-3268, Aug. 2000.
- ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, n.5, p.5-16, 2001.
- ARAUJO, L. V. **Ramnolipideo e surfactina**: seus potenciais de uso na inibição da formação de biofilmes por *Listeria monocytogenes* em superfícies plásticas. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495-508, 2000.
- BECKER, H. et al. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal Food Microbiology**, v.23, p.1-15, 1994.
- BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by pseudomonas aeruginosa LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v.54, n.4, p.283-288, 2002.
- _____. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.85, p.1-8, 2004.

_____. Rhamonolipid surfactants: alternative substrates, new strategies. In: SEM, R. (Ed.). **Biosurfactants**. Berlin: Springer, 2010. Cap.13, p.170-184. (Advances in Experimental Medicine and Biology, 672).

BHARALI, P. et al. Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: a novel chemotaxis and antibacterial agent. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.103, p.502-509, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz, 2011.

_____. **Doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Secretária de Vigilância em Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária da Vigilância Sanitária. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2016. Disponível em:<<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acessado em: 14 jan. 2017.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the *Proteobacteria***. 2nded. Berlin: Springer, 2005. v.2.

CALDORIN, M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v.10, n.110, p.4-20, 2013.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* na segurança dos alimentos. **Instituto Biológico**, São Paulo. v.70, n.1, p.11-13, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Estimating Foodborne Illness**. 2011a. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>>. Acesso em: 25 May. 2016.

_____. **Healthcare-associated infections** - diseases and organisms. 2011b. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/hai/surveillance/index.html>>. Acesso em: 6 Feb. 2016.

_____. **Healthcare-associated infections** - staphylococcus aureus in healthcare settings. 2011c. Disponível em:<<http://www.cdc.gov/HAI/organisms/staph.html>>. Acesso em: 5 Mar. 2017.

_____. **Listeria (Listeriosis)**. 2011d. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>. Acesso em: 2 Mar. 2017.

_____. ***E. coli* (*Escherichia coli*)**. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>>. Acesso em: 8 Mar. 2017.

_____. ***Salmonella***. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 6 Mar. 2017.

CHAMPION, J.T. et al. Electrón microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octane. **Journal Colloid and Interface Science**, v.170, p.569-574, 1995.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Approved standard, 9th ed. CLSI publication M07-A9.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.2, p.195-206, abr./jun. 2008.

DALTIN, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher, 2011.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v.7, p.641-646, 2004.

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

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.4, p.324-338, Oct. 1993.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.17, p.61-69, 2001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **Journal European Food Safety Authority**. v.11, n.4, p.3129, 2013.

FERREIRA, A. O. F. **Guia prático da farmácia magistral**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2002.

FOOD SAFETY BRASIL. **Segurança dos alimentos**. 2015. Disponível em:<<http://foodsafetybrazil.org/infeccao-x-intoxicacao-x-toxinfeccao-alimentar/>>. Acesso em: 2 abr. 2016.

GANDRA, A. E. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 66f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.157, p.223-228, 1997.

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.3, p.379-387, 2000.

HABA, E. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.3, p.316-322, 2003.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **Journal of Food Protection**, v.52, n.4, p.267-282, 1989.

HELM, D. et al. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of General Microbiology**, v.137, p. 69-79, 1991.

HENKEL, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. The Prospects for the production of rhamnolipids on renewable resources. In: KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. (Ed.). **Biosurfactants: production and utilization- processes, technologies, and economics**. New York: CRC Press Taylor & Francis, 2015. Cap.6, p.83-100. (Surfactant Science Series, 159).

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, v.9, n.1, p.23-30, 2001.

IBRAHIM, S. A.; YANG, H.; SEO, C. W. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Chemistry**, v.109, n.1, p.137-143, 2008.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods 5: microbiological specifications of food pathogens**. London: Blackel Academic & Professional, 1996. p.4-14, 513.

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

ISHIGAMI, Y. et al. Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfactant. **Langmuir: American Chemical Society**, v.9, p.1634-1636, 1993.

KANSIZ, M. et al. Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. **Phytochemistry**, v. 52, p. 407-417, 1999.

KAYSER, F. H. et al. **Medical microbiology**. New York: Thieme, 2005.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASSALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Journal Microbes and Infection**, v.2, p.189-198, 2000.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other bacilli species. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Foodborne Pathogens and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1989. p.21-70.

LANG, S.; WAGNER, F. Biological activities and applications. In: KOSARIC, N. (Ed.). **Biosurfactant**: production - properties and applications. New York: Marcel Dekker, 1993. p.251-269. (Surfactant Science Series, 48).

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

LIU, D. **Handbook of *Listeria monocytogenes***. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 540, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-276, 1951.

LU, X. et al. Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under cold stress in low nutrient media. **Food Microbiology**. v. 28, p. 537-546, 2011.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Tradução de Andrea Queiroz Maranhão. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v.29, p.138-142, 2013.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.11, p.555-608, 2012.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The Estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal Hygiene**, v.38, p.732-749, 1938.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V. M. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7-revisão. **Revista Instituto Ciências Saúde**, v.24, n.3, p.175-182, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1/2, p.55-63, 1983.

NAUMANN, D.; FIJALA, V.; LABISCHINSKI, H. The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis. **Mikrochimica Acta Journal**, v. 1, p. 373-377, 1988.

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

NAUMANN, D. Vibrational spectroscopy in microbiology and medical diagnostics. IN: LASCH, P.; KNEIPP, J. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**, Canadá: John Wiley & Sons. P. 385, 2008.

NIELSEN, L. et al. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5171-5176, 2005.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25, p.772-776, 2002.

NOTERMANS, S. et al. A Risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. **Food Microbiology**, v.14, p.143-151, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Segurança básica dos alimentos para profissionais de saúde**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro; Roca, 2002. p.7-12.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Do Campo à mesa: obtendo alimentos seguros**. 2015. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4811:di-mundial-da-saude-7-de-abril&Itemid=875>. Acesso em :17 jan. 2016.

PAULA, C. M. D.; CASARIN, L. S.; TONDO, E. C. *Escherichia coli* O157:H7 patógeno alimentar emergente. **Revista Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**. v.2, n.4, p.23-33, 2014.

PHYSICS ORGANIZATION. **Structural studies of a toxin from *Bacillus cereus* that causes diarrhea**. Disponível em: <<https://phys.org/news/2013-01-toxin-bacillus-cereus-diarrhea.html>>. Acesso em 2 Mar 2017.

PIMENTEL-FILHO, N. J. et al. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v.190, p. 1-8, 2014.

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

RAZA, Z. A. et al. Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. **Biotechnology Letters**, v.32, n.6, p.811-816, 2010.

REDE INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO DE TÉCNICOS EM SAÚDE. 2015. Disponível em: <<http://www.rets.epsjv.fiocruz.br/noticias/relatorio-da-oms-aponta-que-criancas-com-menos-de-cinco-anos-de-idade-representam-quase-um>>. Acessado em: 1 mar. 2016.

ROBERTS, A. J.; WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, n.5, p.904-918, May 2003.

RON, Z. E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, n.4, p.229-236, 2001.

ROSENBERG, M. et al. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.9, p.29-33, 1980.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. *Listeria*, listeriosis and food safety. 3thed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Boca Raton : CRC Press, 2007.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology Journal**, v.2, n.5, May. 2010. Doi: 10.1101/cshperspect.a000414.

SILVA, I. F. **Caracterização e identificação rápida de bactérias em culturas puras e mistas por microespectroscopia FT-IR**. 2010. 108p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2010.

SILVA, S. S. **Aplicação de ramnolipídeo no controle de biofilmes de patógenos alimentares**. 2016. 112f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

SOTIROVA, A. V. et al. Rhamnolipid biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram negative bacterial strains. **Current Microbiology**, v.56, p.639-644, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L. C. *Escherichia*. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Athene, 1999. p.215-226.

TRUN, N.; TREMPY, J. **Fundamental bacterial genetics**. New York: Wiley-Blackwell, 2003.

VAARA, M.; VAARA, T. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and resistant *Salmonella typhimutium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.19, n.4, p.578-583, Apr. 1981.

VALERO, M.; FERNANDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.71-79, 2003.

VERMA, P. Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time-kill curves, and population analysis. In: SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007. p.275-299.

VOS, P. (Ed.). et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nded. New York: Springer, 2009. v.3: The Firmicutes.

ZHOU, K. et al. Mode of action of pentocin 31–1: an anti-listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from chinese traditional ham. **Food Control**, v.19, p.817-822, 2008.