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

DEBORA MARIANA DRAPPÉ MAYER

**Controle de patógenos de importância alimentar utilizando
ramnolípídeo e óleoresina de *Apium graveolens***

**Control of foodborne pathogens using rhamnolipid and
Apium graveolens oilresin**

São Carlos – SP

2017

DEBORA MARIANA DRAPPÉ MAYER

**Controle de patógenos de importância alimentar utilizando
ramnolipídeo e óleoresina de *Apium graveolens***

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades 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 para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

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.

M468c Mayer, Debora Mariana Drappé
Controle de patógenos de importância alimentar utilizando ramnolipídeo e óleoresina de *Apium graveolens*. / Debora Mariana Drappé Mayer; orientadora Marcia Nitschke. São Carlos, 2017.

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, 2017.

1. *Apium graveolens*. 2. *B. cereus*. 3. biofilme. 4. *L. monocytogenes*. 5. ramnolipídeo. I. Título.

DEBORA MARIANA DRAPPÉ MAYER

Título: "Controle de patógenos de importância alimentar utilizando ramnolipídeo e oleorossina de *Apium graveolens*".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - LESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRA EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 06/10/2017

Profa. Dra. Marcia Nitschke (Orientadora)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Não votou

Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan	Instituto de Física de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovada</i>

Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo	Instituto de Física de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: <i>APROVADA</i>

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovada</i>

Homologado em: ____ / ____ / ____

Dedico este trabalho aos meus pais: Todo o amor, apoio, orações, carinho e ensinamentos de vida fizeram com que eu conseguisse chegar até aqui.

Agradecimentos

Aos meus pais, que me propiciaram uma vida acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerão de nossa vontade.

Ao meu grande companheiro e amigo Renato Aldrighi pela grande ajuda nas horas de sufoco, pela paciência, por acreditar em mim e apoiar meus objetivos.

À todos os familiares e pessoas intimamente ligadas à minha vida, que no período de desenvolvimento deste trabalho me ajudaram com paciência, carinho e compreensão.

Agradeço imensamente a orientadora, Marcia Nitschke, pelos conhecimentos e atenção dados, não somente durante a elaboração do presente trabalho, mas também durante toda esta jornada. Conhecimentos que com certeza serão utilizados por mim em nossa vida profissional e pessoal.

À Marília pela amizade e suporte sempre que precisei.

Aos amigos pelas sugestões, discussões, apoio, amizade e bons momentos de alegria que deixarão saudades.

À Deus pela saúde e pela força que me concedeu, para que conseguisse chegar até aqui.

À CAPES pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

Mayer, D. M. D. **Controle de patógenos de importância alimentar utilizando ramnolípídeo e óleoresina de *Apium graveolens***. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado) – 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.

O controle bacteriano na indústria alimentícia é de extrema importância uma vez que os microrganismos são responsáveis por causar contaminações persistentes, levando à deterioração do alimento e à transmissão de doenças. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do biossurfatante ramnolípídeo (RL) e de óleoresinas (OR) de aipo, noz moscada, alho, gengibre, pracaxi, pataúá e buriti frente as bactérias patogênicas alimentares *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). O OR de aipo foi avaliado individualmente e em combinação com o RL. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo – concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Biofilmes de *L. monocytogenes* e *B. cereus* foram formados em placas de microtitulação de poliestireno, respectivamente, nos meios de cultivo triptona de soja com extrato de levedura (TSYE) e caldo nutriente (CN) à 37 °C por 48 h e avaliados através da quantificação da biomassa e viabilidade celular após tratamento com os antimicrobianos. O RL apresentou efeito bacteriostático com CIM 125 µg. mL⁻¹ frente a *L. monocytogenes* e para *B. cereus* observou-se ação bactericida com CBM de 31,25 µg. mL⁻¹. A triagem preliminar mostrou que, dentro da faixa das concentrações testadas, os óleos de buriti, pracaxi, pataúá, alho e gengibre não apresentaram CIM frente aos patógenos. O OR de aipo inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* e *B. cereus* com CIM de 3% e 0,75%, respectivamente. A combinação de 125 µg. mL⁻¹ de RL e 3% de óleo de aipo foi bacteriostática para *L. monocytogenes*, enquanto para *B. cereus* a combinação dos agentes foi bacteriostática com menor valor de CIM (7,81 µg. mL⁻¹ de RL e 0,19% de OR de aipo), sugerindo efeito sinérgico. A linhagem de *Escherichia coli* (EHEC) foi resistente aos agentes nas concentrações testadas. O RL removeu 70,7 % dos biofilmes de *L. monocytogenes* após 24 h de tratamento, entretanto a redução da viabilidade celular foi maior após 2 h de contato com RL inibindo 66,6%. O OR de Aipo (6%) foi capaz de reduzir 57,1 % da viabilidade celular após 24 h de tratamento, já a combinação do RL com OR de aipo foi eficaz em todos os tempos de tratamentos, com redução média de 49,5% de células viáveis do biofilme de *L. monocytogenes*. Para o biofilme de *B. cereus* o melhor tratamento (13h) com RL (31,25 µg. mL⁻¹) removeu 71,5 % do biofilme, enquanto que a combinação com o OR de aipo (15,62 µg. mL⁻¹ + 0,38%) foi capaz de remover 79,5 % da biomassa. O RL (62,50 µg. mL⁻¹) mostrou inibição média de 85,4% da viabilidade celular de biofilme de *B. cereus*. O melhor tratamento com OR de aipo (1,50%) reduziu a viabilidade celular de *B. cereus* em 51,2%, após 2 h; e quando combinado com RL (15,62 µg. mL⁻¹ + 0,38%) em 71,8%. RL e OR de aipo mostraram ação antimicrobiana frente a células planctônicas e sésseis de *L. monocytogenes* e *B. cereus*, sugerindo potencial para desenvolvimento de novas formulações naturais visando o controle destes patógenos alimentares.

PALAVRAS-CHAVE: antimicrobianos, *B. cereus*, biofilme, *E. coli*, *L. monocytogenes*.

ABSTRACT

Mayer, D. M. D. **CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS USING RHAMNOLIPID AND *APIUM GRAVEOLENS* OIL RESIN** 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado) – 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.

Bacterial control in the food industry is very important once many microorganisms are responsible for causing persistent contamination, leading to food deterioration and disease transmission. Research and development of natural antimicrobial agents is a trend of the market that has been gaining increasing interest. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the rhamnolipid biosurfactant (RL) and celery oleoresin (OR) against food pathogens *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* enterohemorrhagic (EHEC) both in planktonic and in biofilms forms. Celery OR was evaluated individually and in combination with RL. Antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method and expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Biofilms of *L. monocytogenes* and *B. cereus* were formed in polystyrene microtiter plates, respectively, in tryptone yeast extract (TSYE) and nutrient broth (NB) media at 37 °C for 48 h. Biofilms were evaluated by quantification of biomass and cell viability after treatment with antimicrobials. RL presented bacteriostatic effect showing MIC of 125 µg mL⁻¹ against *L. monocytogenes* and a bactericidal effect at 31.25 µg mL⁻¹ against *B. cereus*. Preliminary screening showed that, within the range of tested concentrations, buriti, pracaxi, pataúá, garlic and ginger oils did not show minimal inhibitory concentration against pathogens. Celery OR inhibited the growth of *L. monocytogenes* and *B. cereus* at MIC of 3% and 0.75%, respectively. The combination of 125 µg mL⁻¹ RL and 3% celery oil was bacteriostatic for *L. monocytogenes*, while for *B. cereus* the combination effect was also bacteriostatic at a lower MIC (7.81 µg mL⁻¹ RL and 0.19% celery OR), suggesting synergistic effect. *Escherichia coli* strain (EHEC) was resistant to all agents at the concentration tested. The biofilms of *L. monocytogenes* were removed by 70.7% after 24 h of treatment using RL (250 µg mL⁻¹), however, at shorter time (2 h) were more effective in reducing cell viability, showing an inhibition of 66, 6%. Celery OR (6%) was able to reduce 57.1% of cell viability after 24 h of treatment, and the combination of RL and celery OR was effective at all treatment times, with a mean reduction of 49.5% of viable *L. monocytogenes* biofilm cells. Biofilms of *B. cereus* treated with RL (31.25 µg mL⁻¹) for 13 h were removed in 71.5%, while the combination of RL with celery OR (15.62 µg mL⁻¹ + 0.38%) was able to remove 79.5%. The RL (62.50 µg mL⁻¹) reduced *B. cereus* biofilm viability by a mean of 85.4%. Treatment with celery OR (1.50%) reduced the cell viability of *B. cereus* in 51.2% after 2h and when combined with RL (15.62 µg mL⁻¹ + 0.38%) in 71.8%. The RL and celery OR showed antimicrobial activity against planktonic and sessile cells of *L. monocytogenes* and *B. cereus* suggesting potential to development of new natural formulations to control these food pathogens.

KEYWORDS: antimicrobials, *B. cereus*, biofilm, *E. coli*, *L. monocytogenes*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia celular de <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 2 – Morfologia celular de <i>B. cereus</i>	30
Figura 3 – Morfologia celular de <i>E. coli</i>	32
Figura 4 – Processos que conduzem a formação de biofilme.....	35
Figura 5 – Principais forças de adesão entre célula e superfície – interações fracas e específicas.....	37
Figura 6 – Estrutura molecular do mono-ramnolipídio e di-ramnolipídio.....	39
Figura 7 – Ilustração da mistura contendo 6 % óleoresina de aipo: a) antes de ser filtrada; e b) após filtração.....	48
Figura 8 – Esquema representativo da determinação da CIM e CBM utilizando metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2012).....	51
Figura 9 – Determinação visual da CIM do RL frente <i>B. cereus</i>	56
Figura 10 – Determinação da CIM de OR de Aipo (Concentração %) para: A) <i>L. monocytogenes</i> B) <i>B. cereus</i>	56
Figura 11 – Modelo de ativação do fator sigma extracitoplasmático.....	57
Figura 12 – Ilustração da determinação da CIM da combinação entre ramnolipídeo e o OR de <i>Apium graveolens</i> (concentrações $\mu\text{g mL}^{-1}$ + %) para: A) <i>L. monocytogenes</i> B) <i>B. cereus</i>	59
Figura 13 – Análise do óleoresina de <i>A. graveolens</i> por CG-MS.....	61
Figura 14 – Estrutura química do A) α -selineno e B) β -cariofileno.....	63
Figura 15 – Estrutura química do limoneno.....	64
Figura 16 – Remoção de biomassa de biofilmes (48h) de <i>L. monocytogenes</i> tratados com diferentes concentrações de OR de Aipo; RL; e RL + OR de Aipo.....	66
Figura 17 – Inibição da Viabilidade celular de biofilmes (48h) de <i>L. monocytogenes</i> tratados com OR de aipo, RL e RL + OR de aipo.....	68
Figura 18 – Remoção de biomassa de biofilmes (48h) de <i>B. cereus</i> tratados com diferentes concentrações OR de Aipo; RL; e RL + OR de Aipo.....	70
Figura 19 – Inibição da viabilidade celular de biofilmes (48h) de <i>B. cereus</i> tratados com OR de aipo, RL e RL + OR de aipo.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos óleos utilizados no trabalho.....	47
Tabela 2 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de OR e RL.....	55
Tabela 3 – Ação antimicrobiana do RL e OR de aipo sobre <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>B. cereus</i>	59
Tabela 4. Composição química do óleo-resina de <i>Apium graveolens</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN - Caldo Nutriente

CV - Cristal violeta

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

D.O. - Densidade óptica

EHEC - Enterohemorrágica

FDA - *Food and Drug Administration*

MPE - Matriz Polimérica Extracelular

MTT - Brometo de tetrazolium

OE - Óleo essencial

OMS - Organização Mundial da Saúde

OR - Óleoresina

RL - Ramnolipídeo

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TSYEA - Ágar extrato de levedura triptona de soja

TSYEB - Caldo extrato de levedura triptona de soja

$\mu\text{g. mL}^{-1}$ - microgramas por mililitro

v/v - Volume por volume

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 PATÓGENOS ALIMENTARES	27
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.1.2 <i>Bacillus cereus</i>	29
2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	31
2.2 BIOFILMES MICROBIANOS	33
2.2.1 Mecanismos envolvidos no processo de formação de biofilme	34
2.2.2 Matriz Polimérica Extracelular – “Efeito Protetor”	38
2.3 RAMNOLIPÍDEO	39
2.4 ÓLEOS VEGETAIS	41
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 ÓLEOS	47
4.1.1 Preparo dos Óleos	48
4.2 RAMNOLIPÍDEO	48
4.3 MICRORGANISMOS	48
4.4 MEIOS DE CULTURA	49
4.5 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO	49
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E A CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS	49
4.7 COMBINAÇÃO ENTRE RAMNOLIPÍDEO E OS ÓLEOS	52
4.8 ANÁLISE DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS (FAME – “FATTY ACID METHYL ESTER”) – IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	52
4.9 FORMAÇÃO DOS BIOFILMES	53

4.10 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOFILMES.....	53
4.11 AÇÃO ANTIMICROBIANA NOS BIOFILMES FORMADOS.....	53
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E A CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS.....	55
5.2 COMBINAÇÃO ENTRE RAMNOLIPÍDEO E ÓLEORESINA DE AIPO – DETERMINAÇÃO DE CIM.....	59
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO RESINA DE AIPO.....	61
5.4 QUANTIFICAÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA EM BIOFILMES.....	65
5. 4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	65
5. 4.1 <i>Bacillus cereus</i>	69
6 CONCLUSÃO.....	75
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Estimativas globais realizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), revelam que 600 milhões de pessoas adoecem ao ingerir alimentos contaminados tendo como consequência 420.000 óbitos. No Brasil, de 2007 a 2016, ocorreram notificações de 6.848 surtos, 610.465 expostos, 121.283 doentes, 17.517 hospitalizações e 111 óbitos relacionados a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) mostram que 95,9% dos microrganismos envolvidos em DTA são bactérias, 7,7 % vírus, 1,2% protozoários e 0,1% fungos. As principais bactérias identificadas envolvidas nestes surtos foram *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2017). Nos Estados Unidos da América, em 2015, foram notificados 902 surtos de DTAs, resultando em 15.202 doenças, 950 hospitalizações e 15 mortes. Nestes surtos, foram confirmadas a presença de microrganismos como *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella*, *Staphylococcus* spp, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus* Grupo A e *Yersinia enterocolitica* (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015).

E. coli sorotipo O157:H7 (O se refere ao antígeno somático; H se refere ao antígeno flagelar), pertence ao grupo das *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), produz verotoxina que causa colite hemorrágica, insuficiência renal, síndrome hemolítico-urêmica (SHU), danos cerebrais, e até mesmo a morte em seres humanos (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011). *Listeria monocytogenes* causa infecções denominada de listeriose que provoca um conjunto de desordens incluindo septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intra-uterina; em gestantes pode provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre de gestação) ou nascimento prematuro entre outros danos (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). *B. cereus* causam dois tipos de síndromes de intoxicação alimentar: diarreica (longo período de incubação de 8 a 16 horas) e emética (curto período de incubação de 1 a 6 horas) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014).

Estas bactérias apresentam forma de vida livre (células planctônicas), porém, são também capazes de aderir a superfícies pré-condicionadas com nutrientes e outros componentes orgânicos, presentes no ambiente de processamento de

alimentos, favorecendo o crescimento na forma de biofilmes (células sésseis), que lhes confere maior proteção contra agentes externos (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA; 2010). Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz polimérica extracelular, aderidos entre si e à uma superfície (COSTERTON et al., 1995). A capacidade de formar biofilmes é um fator fundamental para a persistência desses microrganismos em superfícies de equipamentos e embalagens na indústria alimentícia, podendo causar a contaminação e/ou deterioração dos alimentos e conseqüentemente levar a transmissão de doenças (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

O surgimento de cepas resistentes aos antibióticos e a relutância do consumo de alimentos quimicamente aditivados vem incentivando a busca por agentes antimicrobianos naturais. As substâncias obtidas a partir de plantas são preferidas em relação aos bactericidas sintéticos, pois são usadas na medicina tradicional desde a antiguidade (LEONARD et al., 2010). Muitos estudos têm sido realizados, principalmente *in vitro*, envolvendo a atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente aos patógenos de origem alimentar (OUSSALAH et al., 2007). O óleoresina (OR) é um produto de origem vegetal viscoso e espesso que consiste de óleo volátil, óleo fixo, cera, resina, e compostos que atuam como fixadores para os voláteis. Apresenta a vantagem de possuir maior vida de prateleira, pois é praticamente isento de água, reduzindo a taxa de degradação oxidativa, a perda de sabor e a contaminação microbiológica (SOWBHAGYA, 2014). Apesar dos produtos do metabolismo secundário das plantas exercerem atividade antimicrobiana, quando são utilizados isoladamente apresentam fraca atividade e espectro de ação limitado. Porém, se combinadas entre si ou com outros agentes antimicrobianos, podem modificar a resistência bacteriana além de reduzir a concentração necessária para um resultado eficaz (PROBST, 2012).

Os biossurfatantes (BS) são moléculas tensoativas produzidas por microrganismos que em geral, são sintetizados para favorecer a assimilação de substratos hidrofóbicos. Os BS podem ser classificados de acordo com a natureza química como: glicolipídeos, fosfolipídios, lipossacarídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos e lipídios neutros. Dentre os glicolipídeos destacam-se os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. que vêm sendo amplamente estudados visando aplicações industriais e ambientais (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000, VARJANI et al., 2015).

Os ramnolipídeos (RL) apresentam excelente atividade tensoativa, biodegradabilidade e baixa toxicidade e são produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (HABA et al., 2003; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011). Estas moléculas possuem estrutura anfifílica, o que permite seu uso como agentes emulsionantes em diversas aplicações industriais em formulações cosméticas, farmacêuticas e alimentos (MAYER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Trabalhos anteriores demonstraram que os ramnolipídeos apresentam atividade antimicrobiana sobre *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, entre outros (HABA et al., 2003; BENINCASA et al., 2004; MAGALHÃES, 2012). Os ramnolipídeos também têm sido aplicados como agentes de remoção de biofilmes formados por patógenos alimentares, além de reduzir a adesão bacteriana a superfícies (GOMES; NITSCHKE, 2012).

O uso do ramnolipídeo combinado com óleos vegetais poderia potencializar a atividade antimicrobiana e a inibição/remoção dos biofilmes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de ramnolipídeo (RL), óleo resinas e a combinação entre o RL e óleoresinas no controle de células planctônicas e biofilmes de bactérias patogênicas de importância alimentar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Patógenos Alimentares

O desafio relacionado à identificação e origem dos agentes causadores de DTAs tem aumento com a globalização, que por sua vez contribui na disseminação destes (PAULA; CASARIN; TONDO, 2014). Um alimento inseguro expõe a população a doenças microbiológicas ou químicas. Todos os anos, bilhões de pessoas estão em risco, milhões ficam doentes e muitos morrem como resultado de consumir alimentos inseguros (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Os microrganismos causadores de DTAs podem ser classificados como clássicos, emergentes e reemergentes. Os clássicos são conhecidos clinicamente e epidemiologicamente, tendo como exemplo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* entre outros. Os emergentes são aqueles tem a atuação comprovada como novos agentes etiológicos, mas anteriormente não eram reconhecidos como causadores de DTAs, é o caso das bactérias *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni*. Os microrganismos reemergentes são aqueles considerados clássicos, avaliados como controlados, mas que estão ressurgindo com novas incidências clínicas e alguns deles apresentando maior condição de patogenicidade tendo como exemplo *Mycobacterium tuberculosis* agente causador da tuberculose; bactérias do gênero *Brucella* (esp. *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis*) causadoras da brucelose; e o platelminto *Taenia solium* causador da cisticercose (MACHADO, 2013).

2.1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bastonete curto (0,4 - 0,5 × 1-2 µm), Gram-positivo, facultativo, geralmente móvel devido à presença de flagelos peritríquios em temperaturas menores de 20°C; na temperatura de 37°C perdem a motilidade devido a não expressão da proteína flagelina (Figura 1.). Assim, a motilidade flagelar estaria associada à vantagem de proliferação e existência deste microrganismo fora do ambiente apropriado. Estas bactérias são resistentes a condições extremas, como baixa temperatura ou altas concentrações de sal, apresentando uma grande adaptabilidade ao seu ambiente; podem ser encontradas em uma variedade de

animais e nichos, incluindo alimentos processados (DWORKIN et al., 2006; VOS et al., 2009).

Figura 1 – Morfologia celular de *L. monocytogenes*.

Fonte: TODAR'S – Online Textbook of Bacteriology.

A primeira cepa reconhecida do patógeno humano *L. monocytogenes* foi isolada em 1924 após um surto envolvendo animais (coelhos e cobaias) que exibiam mononucleose grave (MURRAY et al., 1926). Em 1921, um isolado clínico de *L. monocytogenes* de um caso de meningite humana foi depositado no Instituto Pasteur (DWORKIN et al., 2006).

A listeriose é uma infecção causada por *L. monocytogenes* que provoca um conjunto de sintomas (dependendo da pessoa e da parte do corpo afetada), podendo causar febre e diarreia semelhante aos outros patógenos alimentares. Na listeriose invasiva, os sintomas podem incluir dor de cabeça, pescoço rígido, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões, além de febre e dores musculares. No entanto, as infecções em gestantes apresentam sintomas semelhantes a gripe (fadiga e dores musculares) além de febre; e podem levar ao aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro ou infecção potencialmente fatal do recém-nascido (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

Estima-se que nos Estados Unidos 1.600 pessoas adquirem listeriose a cada ano, com cerca de 260 óbitos (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). A infecção ocorre com maior frequência em pessoas imunocomprometidas, adultos (>65 anos), gestantes e recém-nascidos. Em um hospital da Espanha, foi reportado surto de listeriose relacionado à contaminação persistente de uma máquina de leite (MAZENGLIA et al., 2011 apud-AHIRE et al., 2017). A capacidade de formar biofilmes é um fator chave para a persistência de *Listeria monocytogenes* em equipamentos de processamento de alimentos, representando uma fonte potencial de contaminação, especialmente de produtos alimentícios prontos para o consumo (FERNANDES et al., 2014; DOJAD et al., 2015).

2.1.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um bastonete curto (1 x 3-4 µm), Gram-positivo, facultativo, formador de endósporos; a maioria são móveis por meio de flagelos peritríquios. É um microrganismo patogênico envolvido também na deterioração alimentar e utiliza várias estratégias para sobreviver em condições desfavoráveis no ambiente (Figura 2). A principal estratégia consiste na formação dos endósporos (DWORKIN et al., 2006; TODAR'S, 2012; HAYRAPETYAN; ABEE; NIEROP, 2016). A resistência dos endósporos ao calor, à radiação, aos desinfetantes e à dessecação os torna contaminantes problemáticos nas salas de operação, nos equipamentos cirúrgicos, nos produtos farmacêuticos e nos alimentos (VOS et al., 2009). As células vegetativas de *B. cereus* podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (5-50°C) e algumas estirpes são psicrotróficas (capazes de crescer a 4-5°C) (EFSA, 2016 apud TIRLONI et al., 2017).

Figura 2 – Morfologia celular de *B. cereus*.

Fonte: © Scimat 2005

Bacillus cereus está envolvido na deterioração dos alimentos, principalmente em produtos lácteos e também em intoxicações esporádicas (BARTOSZEWICZ; KROTEN; SWIECICKA, 2013; TIRLONI et al., 2017). Os endósporos deste microrganismo podem sobreviver à pasteurização e contaminar o produto final, com o potencial de causar deterioração e intoxicação alimentar, especialmente devido ao fato que a pasteurização eliminar a maioria das células vegetativas concorrentes (ANDERSSON; RÖNNER; GRANUM, 1995).

Os nutrientes e outros componentes orgânicos presentes no ambiente de processamento de alimentos favorecem a formação de biofilmes de *B. cereus* (HUSSAIN; OH, 2017). *B. cereus* pode também formar endósporos quando crescem na forma sésil (FAILLE et al., 2014, HAYRAPETYAN et al., 2015), podendo chegar a 90% do total de células no biofilme (WIJMAN et al., 2007). A presença de grande número de células de *B. cereus* (superior a 10^6 organismos/g) em um alimento é indicativa de crescimento ativo e proliferação do organismo e representa risco potencial para a saúde (FDA, 2014). As cepas de *B. cereus* podem causar dois tipos

de síndromes de intoxicação alimentar, devido à produção de dois tipos de enterotoxinas: a diarreica e a emética. (DWORKIN et al., 2006; FDA, 2014)

Os sintomas da intoxicação alimentar do tipo diarreica por *B. cereus*, assemelha-se a intoxicação alimentar causada por *Clostridium perfringens*, e se manifesta principalmente por cólicas abdominais (75%) e diarreia (96%). O aparecimento de diarreia aquosa, cólicas abdominais e dor ocorre 6-15 horas após o consumo de alimentos contaminados. A diarreia pode ser acompanhada de náuseas, no entanto os vômitos (êmese) raramente ocorrem. Os sintomas persistem por 24 horas na maioria dos casos (DWORKIN et al., 2006; FDA, 2014).

O tipo emético de intoxicação alimentar por *B. cereus* é caracterizado por náuseas e vômitos dentro de 0,5 a 6 h após o consumo de alimentos contaminados. A duração dos sintomas geralmente é inferior à 24h e ocasionalmente, podem ocorrer cólicas abdominais e/ou diarreia. Os sintomas deste tipo de intoxicação assemelham-se àqueles causados por *Staphylococcus aureus* em sintomatologia e ao curto período de incubação (DWORKIN et al., 2006; FDA, 2014).

2.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo, facultativo, não formador de endósporos, comumente móvel por meio de flagelos peritríquios (Figura 3). Mede aproximadamente 0,5 µm de diâmetro e 1,0-3,0 µm de comprimento. A maioria das linhagens não são patogênicas e fazem parte da microbiota dos homens e de animais. Entretanto, *E. coli* sorotipo O157:H7 (O se refere ao antígeno somático; H se refere ao antígeno flagelar), é considerada um patógeno emergente, sendo a mais estudada do grupo das enterohemorrágicas (EHEC); produz verotoxina, uma enterotoxina similar à produzida por *Shigella dysenteriae*, a toxina Shiga, que causa inflamação e sangramento do colo, incluindo colite hemorrágica, insuficiência renal, síndrome hemolítico-urêmica (SHU), danos cerebrais, e até mesmo a morte em seres humanos (DWORKIN et al., 2006; CVE, 2011; TODAR'S, 2012).

Figura 3 – Morfologia celular de *E. coli*.

Fonte: CDC – Centers for Disease Control and Prevention

E. coli O157:H7 pode ser transmitida através da contaminação da carne bovina durante o abate ou na ordenha do leite; de frutas e produtos hortícolas frescos devido a contaminação da água utilizada para a lavagem; por exposição em feiras onde o gado está presente ou em zoológicos; e também pela presença em águas recreativas (CDC, 2016).

Nos últimos anos, os surtos de infecções por *Escherichia coli* O157: H7 estão associados frequentemente ao consumo de produtos frescos contaminados (BANG et al., 2014). O sorotipo *E. coli* O157: H7 é a EHEC prototípica é a mais frequentemente implicada em doenças em todo o mundo. A dose infecciosa para O157: H7 é estimada em 10 - 100 células (TODAR's, 2012); além disso é capaz de formar biofilmes em alface, brotos de alface, espinafre e outros vegetais folhosos (FINK et al., 2012, MACARISIN et al., 2014). As áreas mais comuns de formação de biofilmes nos vegetais são os estômatos, na base de tricomas, na cutícula, e ao longo das veias nas folhas, que permite a melhor proliferação e condições de agregação para as bactérias (BEATTIE; LINDOW, 1999). Portanto, a presença de *E. coli* O157:H7 em biofilmes é um problema sério para a higiene alimentar devido à sua maior resistência antimicrobiana (CUI; MA; LIN, 2016).

O Brasil era considerado livre de *E. coli* O157:H7 e existem poucos dados epidemiológicos disponíveis que associam alimentos com a ocorrência de SHU, já que os métodos capazes de detectar este microrganismo não estão implementados na maioria dos laboratórios e não havia obrigatoriedade de pesquisa de *E. coli* O157:H7 em alimentos envolvidos em surtos (VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014). No entanto, nos últimos anos foi demonstrada a ocorrência de casos de SHU (SOUZA et al., 2011) e atualmente existem diversos registros envolvendo o isolamento desse microrganismo em território nacional (LUCATELLI, 2012; CALDORIN et al., 2013; LOIKO 2013; RODRIGUES et al., 2014).

2.2 Biofilmes microbianos

Biofilmes podem ser definidos como uma população de microrganismos metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Pode-se dizer ainda, que os biofilmes consistem em micro colônias que se desenvolvem nas superfícies como comunidades organizadas com heterogeneidade funcional, uma vez que as células exibem diferentes padrões de expressões gênicas em diferentes regiões de um biofilme (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Cerca de 95% a 99% dos microrganismos presentes em ambientes naturais existem na forma de biofilmes, e podem ser encontrados em quase todos os substratos que apresentem nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Assim, a forma de vida bacteriana livre pode ser considerada, simplesmente, como um mecanismo de translocação entre superfícies (WATNICK; KOLTER, 2000).

A formação de biofilmes é um fator preocupante na indústria alimentícia, uma vez que quando estabelecido pode causar obstrução de tubulações, corrosão de equipamentos, redução da eficiência de sistemas de transferência de temperatura e, além disso, deterioração e contaminação de produtos prontos para o consumo com patógenos alimentares (KUMAR; ANAND, 1998). Assim, o biofilme formado em equipamentos não afeta apenas a economia do processo industrial, como também a saúde dos consumidores. Como relatado na revisão de Oliveira, Brugnera e Piccoli (2010), quase todos os microrganismos sob condições favoráveis podem formar

biofilmes. Na indústria alimentícia, as bactérias deteriorantes, frequentemente, são as que mais produzem biofilmes, destacando-se entre elas: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterococcus faecium*. Entre as patogênicas destacam-se: *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*.

Mesmo com procedimentos de limpeza e higienização seguindo as boas práticas de fabricação, os microrganismos de um biofilme podem permanecer na superfície dos equipamentos e sobreviver por longos períodos (CLOETE et al., 2009). Além disso, os biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos quando comparados com as células planctônicas, o que torna a sua eliminação das plantas de processamento de alimentos um grande desafio. Assim, é indispensável buscar novas estratégias de controle de biofilme, uma vez que o modo de vida dos microrganismos em biofilme os tornam mais resistentes aos biocidas (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2009).

2.2.1 Mecanismos envolvidos no processo de formação de biofilme

Os processos que conduzem a formação de biofilmes, podem ser observados resumidamente na Figura 4: 1. Formação de filme condicionante na superfície de adesão por macromoléculas presentes no meio; 2. Deposição de células planctônicas na superfície; 3. Adsorção de células na superfície; 4. Dessorção (liberação) de células adsorvidas reversivelmente; 5. Adsorção irreversível de células bacterianas na superfície e produção de moléculas de sinalização célula-célula; 6. Metabolismo e transporte de produtos para dentro e fora do biofilme; 7. Crescimento, replicação celular; 8. Produção expressiva de matriz polimérica extracelular (MPE); 9. Dispersão do biofilme por erosão ou desprendimento (BREYERS; RATNER, 2004).

Figura 4 – Processos que conduzem a formação de biofilme

Fonte: (Breyers; Ratner, 2004).

Há uma série de mecanismos pelos quais os microrganismos são capazes de entrar em contato com uma superfície, anexarem-se firmemente a esta, promover as interações célula-célula e crescer como uma estrutura complexa (BREYERS; RATNER, 2004). Em geral, a adesão ocorre mais facilmente em superfícies ásperas, hidrofóbicas e revestidas por filme condicionante (OULAHAL et al., 2008, SIMÕES et al., 2008). A formação de um filme condicionante acontece através da adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície, alterando as propriedades físico-químicas e favorecendo a adesão inicial dos microrganismos. Nas indústrias alimentícias, resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, são fatores importantes para a formação da camada condicionante nos equipamentos de processamento (WATNICK; KOLTER, 2000).

As propriedades da superfície celular, particularmente a presença de apêndices extracelulares (como presença de flagelo, fímbrias, pili, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula), as interações envolvidas na comunicação célula-célula e a produção de substância polimérica extracelular influenciam na aderência à superfície e desenvolvimento do biofilme (TRACHOO, 2003, PARSEK; GREENBERG, 2005), que ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (MITTELMAN, 1998). A adesão reversível se dá pela interação inicial da bactéria com o substrato envolvendo forças de interação fracas (van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas), como ilustrado pela Figura 5. Durante a adesão reversível, as bactérias exibem movimentos Brownianos

(movimento aleatório das partículas suspensas num fluido) e são facilmente removidas através de aplicação de forças mínimas (WATNICK; KOLTER, 2000).

Na adesão irreversível, as ligações entre as células e a superfície se fortalecem através da união de apêndices (pili, flagelo, proteínas adesina) e/ou da produção de substâncias poliméricas extracelulares, envolvem interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (Figura 5) (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990). De acordo com estudos de Chavant et al. (2007), essa adesão geralmente ocorre em pouco tempo, 20 minutos de contato variando no máximo até 4 horas (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). A remoção dos microrganismos aderidos irreversivelmente é difícil e requer aplicação de força mecânica e/ou aplicação de enzimas, detergentes, sanitizantes e/ou calor para a interrupção química da aderência. No entanto, mesmo após a higienização, de acordo com Oliveira, Brugnera e Piccoli (2010) existe grande possibilidade de que as células permaneçam aderidas.

Figura 5 – Principais forças de adesão entre célula e superfície – interações fracas e específicas

Fonte: Andrade, 2014

Ainda na adesão irreversível as células passam por um processo de agregação e crescimento dos microrganismos acompanhado pela produção extensiva de substância polimérica extracelular resultando na formação de microcolônias, consecutivamente o biofilme sofre maturação (ocorre de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias ; HEYDORN et al., 2000) desenvolvendo uma estrutura complexa com áreas densas, formando uma arquitetura tridimensional com presença de poros e canais para a circulação de água, oxigênio e nutrientes para o interior e também transporte de produtos para fora do biofilme. Algum estresse na estrutura pode levar ao desprendimento de partes do biofilme ou de células planctônicas capazes de contaminar o alimento que está sendo processado ou de levar a colonização para outras regiões, dando origem a um novo biofilme em uma nova superfície (FLEMMING; WINGENDER, 2010, OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

2.2.2 Matriz Polimérica Extracelular – “Efeito Protetor”

De acordo com Tsuneda et al. (2003), as proteínas e os polissacarídeos são os principais componentes representando 75-89% da composição da matriz polimérica extracelular (MPE) de um biofilme. Uma função frequentemente atribuída a MPE é o seu efeito protetor geral sobre os microrganismos do biofilme contra condições adversas. Várias pesquisas têm comprovado que as células de biofilme podem tolerar concentrações elevadas de biocidas (SIMÕES; PEREIRA; VIEIRA, 2005). A MPE atrasa ou impede que os antimicrobianos alcancem microrganismos alvo dentro do biofilme por limitação de difusão e/ou interação química com as proteínas e polissacarídeos extracelulares (MAH; O'TOOLE, 2001).

O papel dos diferentes componentes da MPE como polissacarídeos e proteínas (elementos estruturais fundamentais da matriz de biofilme que determinam a estabilidade mecânica de biofilmes) permanece a ser estabelecido. Os lipídeos e ácidos nucleicos podem influenciar significativamente as propriedades reológicas e, portanto, a estabilidade dos biofilmes (NEU, 1996). O DNA extracelular é necessário para o estabelecimento inicial de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*, e possivelmente para biofilmes formados por outras bactérias que liberam especificamente DNA (WHITCHURCH et al., 2002).

2.3 Ramnolipídeo

Os ramnolipídeos (RL) destacam-se como um dos principais tipos de biosurfactantes, pertencem a classe dos glicolipídeos e são produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. A biossíntese e as propriedades dos ramnolipídeos dependem da estirpe microbiana, das condições de fermentação e dos substratos utilizados. Quando estas condições são cuidadosamente controladas, é possível produzir ramnolipídeos com propriedades bem definidas e consistentes (VARJANI; UPASANI, 2016, BAI; MCCLEMENTS, 2016). Estes compostos são anfifílicos constituídos por porção polar formada por moléculas de ramnose ligadas a porção apolar que consiste em cadeia de ácidos graxos. Os RL diferem entre si pelo número de ramnoses e pelo tamanho da cadeia de ácidos graxos sendo os principais representantes os mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos (Figura 6) (LOTFABAD et al., 2010).

Figura 6 – Estrutura molecular do mono-ramnolipídio e di-ramnolipídio

Fonte.: BAI; MCCLEMENTS, 2016

Os biosurfactantes são considerados atóxicos ou de baixa toxicidade. Em comparação com surfactantes sintéticos apresentam atividade hemolítica para os eritrócitos humanos inferiores aos tensoativos catiônicos e SDS; não apresentam efeitos prejudiciais para o coração, pulmão, fígado e rim ou interferem na coagulação sanguínea; sua toxicidade aguda e crônica é muito menor que a do tensoativo sintético Triton X-100 (CHOMICZEWSKA; MĘDRZYCKA; KARPENKO, 2009).

Os ramnolipídeos são biodegradáveis, atóxicos e não mutagênicos. Em condições aeróbias e anaeróbicas os ramnolipídeos são biodegradáveis, enquanto que o Triton X-100 em condições anaeróbicas não é biodegradável e sob condições aeróbicas é apenas parcialmente biodegradável (MOHAN et al., 2006). Os ramnolipídeos foram degradados em 92% após 7 dias de incubação em solos argilosos e arenosos (PEI et al., 2009). Fiebig et al. (1997) observaram que o RL foi completamente degradado após 4 dias de incubação com cultura mista isolada do solo.

Estudos demonstram que os ramnolipídeos apresentam atividade anti-adesiva inibindo a formação de biofilmes de bactérias de importância alimentar como a *L. monocytogenes* (SINGH; CAMEORA, 2004; ARAÚJO et al., 2011). Apresentam também atividade antimicrobiana sobre vários microrganismos como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e leveduras (HABA et al., 2003; ABALOS et al. 2001). Suas propriedades antiadesivas e antimicrobianas têm sido cada vez mais exploradas, o que pode levar ao seu uso como ingrediente multipropósito para aplicações em alimentos, uma vez que a capacidade do ramnolipídeo de formar e estabilizar emulsões é muito útil para a indústria alimentícia (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011).

Pela sua natureza tensoativa, os ramnolipídeos podem ser utilizados em grande variedade de produtos comerciais na forma de emulsão. Quando submetidos a homogeneização em alta pressão (HAP) os ramnolipídeos são capazes de formar nanoemulsões óleo-água com diâmetros de gotas relativamente pequenos ($d_{32} < 150$ nm) com baixas relações surfactante/óleo (SOR $< 1:10$). As nanoemulsões podem ser formadas a partir de vários tipos de óleo, incluindo triglicerídeos de cadeia média, triglicerídeos de cadeia longa e óleos aromatizantes. As gotas revestidas com ramnolipídeos são estáveis dentro de uma gama de tratamentos térmicos (30-90°C), concentrações de sal (< 100 mM de NaCl) e condições de pH (pH 5-9) (BAI; MCCLEMENTS, 2016).

As propriedades da superfície celular são características importantes que afetam diretamente as interações entre o microrganismo e o ambiente externo e consequentemente o transporte, o crescimento e o metabolismo do microrganismo (SHAO et al., 2017). A adsorção de RL na superfície celular inclui atração eletrostática ou repulsão, interação de Van der Waals, ligação de hidrogênio, força dipolar, bem como a interação hidrofóbica. Em geral, os efeitos da adsorção de monômeros são

mais significativos do que a adsorção de micelas (ZHONG et al., 2007). Os ramnolipídeos podem alterar a composição química da superfície celular (OWSIANIAK et al., 2009). A concentração de proteínas e polissacárideos é alterada quando ocorre a interação dos ramnolipídeos com grupos funcionais da superfície celular (MOHANTY; MUKHERJI, 2013), que conduz à alteração da hidrofobicidade. Como consequência, os ramnolipídeos podem causar alteração da permeabilidade e até mesmo a ruptura da membrana, o que pode levar ao extravasamento de metabólitos e à lise celular (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

A razão para o aumento da permeabilidade da membrana pode dever-se ao fato de o ramnolipídeo induzir a liberação de proteínas e à fusão de ramnolipídeos na membrana celular, o que resulta na formação de poros transmembranares nas membranas celulares (SOTIROVA et al., 2009). Estudos realizados por Yuan et al. (2012) mostraram um aumento da permeabilidade da membrana celular de *Penicillium simplicissimum* tratada por ramnolipídeos, que resultou em acúmulo de cargas negativas sobre a superfície da parede celular e redução do potencial Zeta. Bharali et al. (2013) relataram que os ramnolipídeos danificam significativamente a membrana celular de *Staphylococcus aureus* (MTCC 3160), o que aumenta a permeabilidade da membrana e leva à lise celular.

O conhecimento da atividade biológica dos ramnolipídeos é um fator chave para sua exploração em produtos de alto valor agregado. Além disso, a formação de vesículas de ramnolipídeos pode satisfazer critérios para aplicação em fórmulas farmacêuticas e cosméticas.

2.4 Óleos vegetais

As plantas são fontes inesgotáveis de produtos naturais e comumente utilizadas em indústrias de alimentos e cosméticos. Os óleos essenciais são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes encontrados nas plantas que também podem apresentar atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (COWAN, 1999). Robert Koch (1843-1910) foi o precursor no estudo da ação bactericida de óleos essenciais, em 1881 publicou os primeiros relatos da atividade da essência da terebintina sobre endósporos do bacilo do carbúnculo (CAVALEIRO, 2007). Os óleos possuem vantagens como propriedades aromáticas agradáveis, são produtos naturais biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade para os mamíferos; e

ainda podem ser utilizadas na proteção de culturas agrícolas, contra doenças e pragas (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO et al., 2007).

Os óleos essenciais podem ser extraídos de frutos, flores, cascas e sementes. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. São imiscíveis em água e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidro-destilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou através da utilização de solventes orgânicos ou gorduras (TROMBETTA et al., 2005, EDRIS, 2007).

Óleoresina (OR) é um produto de origem vegetal viscoso e espesso que consiste em mistura de compostos como óleos voláteis (óleos essenciais), materiais resinosos e graxos não voláteis (atuam como fixadores para os voláteis), pigmentos e outros ingredientes ativos, extraídos por solventes adequados. O uso de óleoresinas têm aumentado significativamente na indústria de alimentos, principalmente em alimentos congelados, semi-prontos, molhos, cremes e outros. Apresentam facilidade de processamento (mistura, sabor uniforme e economia), são praticamente isentos de água o que faz com que possuam maior vida de prateleira, além de reduzir a degradação e contaminação microbiana (FERREIRA, 1991; SOWBHAGYA, 2014).

O metabolismo das plantas pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pelo desenvolvimento e manutenção celular, participam desses processos moléculas como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos. Os produtos do metabolismo secundário são comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para determinada espécie, oferecendo vantagens para a manutenção e desenvolvimento das plantas que os sintetizam como processos de defesa contra patógenos e herbívoros, atração de polinizadores, tolerância a temperaturas extremas e adaptação a estresse hídrico ou deficiência de nutrientes e minerais do solo (PROBST, 2012).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por vários compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados como álcoois, éster, ésteres, cetonas, fenóis e óxidos. Outros compostos voláteis incluem fenilpropanóides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (BAJPAI; RAHMAN; SUN, 2008). A composição química pode variar conforme a parte da planta, o grau de desenvolvimento, o horário do dia e o

ambiente onde tais plantas se encontram. Geralmente, quase todos os óleos têm constituintes voláteis, o que possibilita alterações em suas composições químicas até mesmo após a produção (MAIA, 2008 apud BARBOSA, 2010).

Várias pesquisas descrevem a atividade antimicrobiana de terpenos e extratos de plantas ricos em terpenos, tais como óleos essenciais (BURT 2004; BAKKALI; et al. 2008). Os monoterpenos atuam comprometendo a integridade e a função da membrana celular microbiana. Alguns efeitos específicos associados à membrana incluem alterações no potencial de membrana (FISHER; PHILLIPS, 2009, XU et al., 2008), extravasamento de componentes intracelulares (OUSSALAH et al., 2006) e inibição da respiração (COX; MARKHAM, 2007).

Estudos têm sido realizados, principalmente *in vitro*, sobre a atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a patógenos de origem alimentar. (OUSSALAH et al., 2007). Jadhav et al. (2013) demonstraram efeito inibitório do óleo essencial de *Achillea millefolium* contra células planctônicas e biofilmes de *Listeria* spp. obtidos a partir de um ambiente de processamento de alimentos. Óleos essenciais também apresentam atividade na inibição de crescimento e desenvolvimento de biofilmes. Bazargani e Rohloff (2016) relataram atividade antimicrobiana dos extratos de óleo essencial e derivados de coentro (*Coriandrum sativum*), anis (*Pimpinella anisum*) e hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) frente às células planctônicas de *E. coli* e *S. aureus* e atividade antimicrobiana do óleo essencial de coentro contra biofilmes formados por *S. aureus* e *E. coli*, sendo o maior CIM apresentado para *E. coli*. Bactérias Gram-negativas, geralmente apresentam maiores valores de CIM em comparação com as Gram-positivas, devido à estrutura característica da membrana externa de bactérias Gram-negativas que os tornam mais resistentes às moléculas lipofílicas (NAZZARO et al., 2013).

3 OBJETIVOS

Avaliar o potencial antimicrobiano de ramnolípideos e óleoresinas individualmente e em combinação (dos que exercerem atividade antimicrobiana), sobre células planctônicas e biofilmes de *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *E. coli*.

3.1 Objetivos Específicos

- Selecionar os óleoresinas (alho, aipo, gengibre e noz moscada) e óleos refinados (maracujá, buriti, pracaxi e patauá) que apresentam atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *E. coli*.
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima do ramnolípideo, dos OR selecionados e da combinação de ambos sobre as células planctônicas das bactérias.
- Determinar a atividade antimicrobiana do RL, do OR e da combinação de ambos sobre células sésseis das respectivas bactérias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Óleos

Foram utilizados os óleos e resinas de: noz moscada; gengibre, aipo e alho; além de alguns óleos refinados de espécies nativas da Amazônia: patauá, pracaxi, buriti e maracujá – fornecidos por Beraca Sabará Químicos e Ingredientes S.A® (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação dos óleos utilizados no trabalho.

Produto	Código	Descrição
Óleo-resina de Noz Moscada 40%	OR1410	Extraído das sementes secas da noz moscada (espécie <i>Myristica fragans</i> Hout) (aromatizante natural).
Óleo-resina de Gengibre 30%	OR0610	Extraído dos rizomas secos do gengibre (espécie <i>Zingiber officinale</i> Rcoe) (aromatizante natural).
Óleo-resina de Aipo 8%	OR0510	Extraído das sementes secas do aipo (espécie <i>Apium graveolens</i> L.) (aromatizante natural).
Óleo-resina de Alho 10%	OR0710	Extraído do alho fresco (espécie <i>Allium sativum</i> L.) (aromatizante natural).
Óleo de Patauá refinado*	RF5710	Extraído a partir da polpa – mistura de ácidos graxos vegetais do Patauá (espécie <i>Oenocarpus bataua</i>).
Óleo de Pracaxi refinado*	RF5110	Extraído a partir das sementes – mistura de ácidos graxos vegetais do Pracaxi (espécie <i>Pentaclethra macroloba</i>).
Óleo de Buriti refinado*	RF3810R	Extraído a partir da polpa – mistura de ácidos graxos vegetais do Buriti (espécie <i>Mauritia flexuosa</i>).
Óleo de Maracujá refinado*	RF3510	Extraído a partir das sementes – mistura de ácidos graxos do Maracujá (espécie <i>Passiflora edulis</i>).

Fonte: autoria própria

* sem informações sobre a concentração

4.1.1 Preparo dos Óleos

Para a determinação da CIM foi preparada uma mistura de 4% - 6% do óleo e propilenoglicol na proporção 1:1. Esta mistura foi acrescida de caldo de cultivo com 0,02% de Tween™ 80 (PATI e KURADE, 1987), homogeneizada em vortex, filtrada (0,45 µm) e novamente homogeneizada (Figura 7) para proceder os ensaios de microdiluições em caldo.

Figura 7 – Ilustração da mistura contendo 6 % óleos resina de aipo: a) antes de ser filtrada; e b) após filtração.

Fonte: Autoria própria.

4.2 Ramnolipídeo

Foi utilizado o ramnolipídeo comercial (Rhamnolipid Inc®) em solução 25%, com grau de pureza 99%. Para os ensaios, foi preparada uma solução de RL na concentração de 2000 µg mL⁻¹ em meio de cultivo que foi esterilizada por filtração (0,22 µm).

4.3 Microrganismos

As cepas utilizadas nesta pesquisa, foram: *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, isolada de fluido espinhal humano; *Bacillus cereus* ATCC 33018, isolada de leite em pó infantil; e *Escherichia coli* (EHEC) ATCC 43895, isolada de carne crua de hambúrguer implicada no surto de colite hemorrágica.

4.4 Meios de cultura

Para os ensaios com *L. monocytogenes* e *E. coli* foram utilizados: Caldo Triptona de Soja com Extrato de Levedura (TSYEB - *Tryptone Soy Yeast Extract Broth*) e Agar Triptona de Soja com Extrato de Levedura (TSYEA - *Tryptone Soy Yeast Extract Agar*) Himedia®, o pH final foi ajustado para $7,3 \pm 0,2$ (Hanna Instruments® - HI 221). Para os ensaios com *B. cereus* foram utilizados: Caldo nutriente (*Nutrient Broth*) Acumedia® e Ágar Nutriente (Caldo Nutriente acrescido de ágar), o pH final foi ajustado para $6,8 \pm 0,2$.

4.5 Padronização do Inóculo Bacteriano

As culturas foram inoculadas em placas contendo meio sólido, a partir do estoque (-20°C) e incubadas por 24 h a 37°C . Com auxílio de uma alça esterilizada, algumas colônias foram selecionadas e preparou-se uma suspensão em solução salina (NaCl 0,86%) ajustando a população para aproximadamente 10^8 UFC/mL, utilizando-se como referência o padrão 0,5 da escala de McFarland (0,5 mL de cloreto de bário (BaCl_2) a 1% + 99,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1%), com a densidade ótica medida em 610 nm e ajustada para 0,1 ($\pm 0,01$) em espectrofotômetro Thermo Scientific® (Genesys. 10 UV Scanning).

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) em células planctônicas

A atividade antimicrobiana dos óleos (4 – 6%) e do RL ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi avaliada através da determinação da CIM utilizando metodologia de microdiluição em caldo adaptada de CLSI, 2012. Primeiramente, todas as cavidades das placas de microdiluição de poliestireno (96 poços) foram adicionadas de 100 μL de caldo de cultivo. Na sequência, foram adicionados 100 μL de amostra contendo o agente a ser testado (50% v/v) a um volume igual do caldo e diluídos serialmente no gradiente de concentração de 25% v/v a 0,781% v/v. O inóculo bacteriano padronizado foi diluído para 10^7 UFC/mL, e 20 μL deste inóculo foram adicionados a cada poço e incubados durante 24 h a 37°C . Controles positivos de crescimento (inóculo + caldo de cultura) e controles de solvente (inóculo + caldo de cultura + solvente) também foram incluídos na placa, no caso dos óleos. A inibição do crescimento bacteriano nas cavidades contendo o óleo foi avaliada visualmente em comparação com o crescimento em

cavidades de controle. O corante brometo de tetrazolio (MTT – 1 mg mL⁻¹) foi utilizado para melhor evidenciar a viabilidade celular, mudando de cor amarelo para roxo na presença de atividade metabólica. Os valores de CIM foram definidos como as menores concentrações que inibiram o crescimento visível das bactérias. Para a determinação da CBM alíquotas de todas as cavidades onde não foi observado crescimento bacteriano foram transferidas com auxílio da alça para placas de TSYEA e incubadas durante 24 h a 37°C para *E.coli* e *L. monocytogenes* e 48 h para *B. cereus*. A menor concentração onde não houve crescimento foi registrada como a CBM ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema representativo da determinação da CIM e CBM utilizando metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2012).

Fonte: Autoria própria.

4.7 Combinação entre ramnolipídeo e os óleos

A combinação entre o ramnolipídeo e o óleo-resina de aipo foi realizada a partir da definição prévia da CIM individual dos agentes em relação à cada bactéria. Foi preparada uma solução na concentração 4xCIM procedendo-se novamente o teste de microdiluição em caldo descrito no item 4.6.

4.8 Análise de metil ésteres de ácidos graxos (FAME – “Fatty Acid Methyl Ester”) – Identificação dos constituintes químicos.

Amostra de 10mg do óleo-resina de aipo foi tratada e com 1mL de metanol e 1gota de ácido sulfúrico concentrado, e mantidos sob agitação a 60°C por 30 minutos (metanólise). Após os 30 minutos deixou-se esfriar a solução até temperatura ambiente e adicionaram-se 2mL de cloreto de sódio e 1mL de n-hexano, a solução foi agitada e deixada em repouso até separação das fases. A fase orgânica foi separada e coletada em um frasco para ser analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (ADAMS, 2007).

A cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/MS) foi realizada no cromatógrafo a gás Shimadzu® QP2010 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) sistema que consiste de auto-amostrador AOC-20 e cromatografia gasosa interconectada a um espectrômetro de massa (GC-MS QP2010 Plus) com uma coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5MS (Folsom, CA, EUA) (5% fenil - metilpolisiloxano) (30 cm por 0,25 mm i.d., espessura de fase de 0,25 µm). O procedimento foi realizado em modo de choque de elétrons a 70 eV. Utilizou-se hélio (99,99%) como gás transportador a um fluxo constante de 0,99 mL min⁻¹ e o volume de injeção de 1 µL (razão de divisão de 1:10). A temperatura do injetor e a temperatura da fonte de íons foi de 250°C. A temperatura do forno foi programada para 50°C (isotérmica durante 1 min) com um aumento de 5°C min⁻¹ até atingir 300°C, terminando com um período isotérmico de 10 min a 300 ° C. Os espectros de massa foram tomados a 70 eV com um intervalo de varrimento de 0,3 s e fragmentos de 40 a 500 Da.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por correspondência computadorizada dos espectros de massa adquiridos com aqueles armazenados nas bibliotecas de massa em WILEY8, NIST107, NIST05, NIST05s e NIST21 do sistema

de dados GC-MS. Para a análise de terpenos, uma mistura de hidrocarbonetos (C_9H_{20} - $C_{18}H_{38}$) foi injetada sob as condições descritas acima e os constituintes também foram identificados por correspondência computadorizada e comparação dos espectros obtidos com os do banco de dados, considerando o índice de retenção relativa (RRI) (Adams, 2007). A identificação dos constituintes químicos foi analisada por Darlisson de Alexandria Santos (IQSC-Grupo de Química Orgânica e Biocatálise).

4.9 Formação dos biofilmes

Para o estabelecimento de biofilmes alíquotas de 100 μ L de suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL) foram inoculadas em microplaca de poliestireno de 96 cavidades contendo 100 μ L de caldo de cultivo incubando-se a 37°C por 48 h (adaptado de GOMES, 2011).

4.10 Quantificação dos biofilmes

Foi avaliado segundo metodologia descrita por Mireles II et al. (2001). O biofilme aderido foi lavado duas vezes com água destilada, fixado com 200 μ L de metanol por 15 minutos e a adesão bacteriana visualizada após coloração com 200 μ L de solução aquosa de cristal violeta 0,5% por 15 min. Após lavagem com água destilada (duas vezes) o corante foi extraído com 200 μ L com ácido acético glacial 33% procedendo-se a leitura da densidade ótica da solução a 630 nm em leitora automática de microplacas Perkin-Elmer (EnSpire®). A quantidade de biofilme removido foi comparada com ensaio controle tratado com água destilada.

4.11 Ação antimicrobiana nos biofilmes formados

A atividade metabólica dos biofilmes formados pelas bactérias foi avaliada utilizando um ensaio de redução do brometo tetrazólio (MTT) modificado de Schillaci et al. (2008). O sal de MTT foi dissolvido em tampão fosfato (PBS), na concentração de 5 mg/mL. Os biofilmes foram formados em caldo de cultivo por 48 h conforme descrito no item 4.9. Após o estabelecimento do biofilme os poços foram lavados uma vez com tampão PBS (200 μ L). Cada poço foi preenchido com 100 μ L de caldo de cultivo suplementado com RL, OR de aipo e a combinação de RL e OR nas

concentrações $\frac{1}{2}$ CIM, CIM e 2 CIM conforme foi determinado anteriormente deixando-se em contato por 2, 13 e 24h a 37°C. Após o período de contato as soluções foram removidas, posteriormente adicionou-se 100 μ L de tampão fosfato (PBS) e 5 μ L de solução de MTT em cada orifício incubando-se por 3 h a 37°C (SCHILLACI et al., 2008). O produto insolúvel púrpura (produzido por hidrólise enzimática do MTT pela enzima desidrogenase presente nas células viáveis) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e absorbância medida em 570 nm em leitora de microplaca Perkin-Elmer (EnSpire®). Este ensaio foi também acompanhado de medida da biomassa do biofilme pela metodologia do cristal violeta descrita previamente e ambos acompanhados pelo ensaio controle (biofilme sem tratamento). Para os tratamentos com OR foi incluído também grupo controle com meio de cultura adicionado de Tween™ 80 e propilenoglicol (solventes) na mesma proporção descrita anteriormente no item 4.1.1 porém sem a adição do óleo-resina.

A viabilidade celular foi comparada com ensaio controle sem a adição das moléculas e expressa como percentual de inibição de acordo com a fórmula abaixo:
(%) Porcentagem de inibição = $100 - [(DO \text{ tratamento} / DO \text{ controle}) \times 100]$

4.12 Análise estatística

Os valores de CIM e CBM foram expressos como a moda de no mínimo três repetições independentes.

Os ensaios para os biofilmes foram realizados em triplicata e expressos como a média de no mínimo três repetições independentes. Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e as diferenças entre as médias avaliadas utilizando o teste de Tukey. As análises foram realizadas através do software Origin 9.0 (Origin Lab Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) em células planctônicas

A triagem preliminar mostrou que os óleos de aipo e noz moscada apresentaram CIM frente *L. monocytogenes* e *B. cereus* e dentro da faixa das concentrações testadas os demais óleos não apresentaram concentração inibitória mínima frente aos patógenos. Assim, o OR de aipo e noz moscada foram selecionados para a continuidade do trabalho. Os resultados de CIM e CBM do ramnolípido, de óleo de noz moscada (*Myristica fragrans* Hout) e de aipo (*Apium graveolens* L.) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de OR e RL.

Bactérias	RL ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)		OR aipo (% v/v)		OR noz moscada (% v/v)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>L. monocytogenes</i>	125	----	3	----	0,75	1,50
<i>E. coli</i>	> 1000	----	> 3	----	>3	----
<i>B. cereus</i>	31,25	31,25	0,75	----	0,03	----

---- CBM não encontrada

Fonte: Autoria própria

O OR de noz moscada inibiu *L. monocytogenes* com CIM de 0,75% e também mostrou efeito bactericida na concentração de 1,50% enquanto que para *B. cereus* observou-se ação bacteriostática com CIM de 0,03%. O ramnolípido apresentou atividade bactericida na concentração de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *B. cereus* e inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ promovendo ação bacteriostática. A Figura 9 ilustra ensaio antimicrobiano de RL frente a *B. cereus*.

Figura 9 – Determinação visual da CIM do RL frente *B. cereus*

Fonte: autoria própria

O óleo de aipo inibiu o crescimento das bactérias Gram positivas e mostrou predominância de ação bacteriostática frente aos patógenos. Na Figura 10 mostra a determinação da CIM de OR de aipo frente a *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

Figura 10 – Determinação da CIM de OR de Aipo (Concentração %) para: A) *L. monocytogenes* B) *B. cereus*

Fonte: autoria própria

A linhagem de *E. coli* utilizada foi resistente a todos os agentes testados. As bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes à ação de antibióticos, pois a membrana externa presente na parede celular atua como uma barreira adicional. Para que as substâncias antimicrobianas atuem as moléculas devem ser relativamente pequenas e hidrofílicas permitindo penetrar na bactéria através dos canais de porinas (canais aquosos) presentes na membrana externa da parede celular bacteriana. Assim, antibióticos com maior atividade frente a bactérias Gram-negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Esse fato explica porque bactérias Gram-negativas apresentam menor sensibilidade aos óleos resinas e sugere a hipótese de *E. coli* apresentar resistência em relação às substâncias testadas. Outro mecanismo que pode explicar a provável resistência de *E. coli* são os fatores sigma de função extra-

citoplasmática que consistem em uma subfamília de fatores sigma σ que ativam genes envolvidos em funções de resposta ao estresse (Figura 11) (WOOD, MCBRIDE 2017).

Figura 11 – Modelo de ativação do fator sigma extracitoplasmático.

Fonte: Wood e McBride 2017.

(A) Os fatores sigma (σ) geralmente são mantidos inativos por meio de seqüestro na membrana celular por um fator anti-sigma (anti- σ). (B) Um sinal ou perturbação extracelular inicia uma cascata proteolítica que inativa o fator anti-sigma para liberar o fator sigma. (C). Após a liberação, o fator sigma é livre para se ligar ao DNA e direcionar a RNA polimerase (RNAP) para transcrever genes específicos.

RpoE (RNA polimerase E) é um dos dois fatores sigma extra-citoplasmático em *E. coli*. A atividade de RpoE é induzida em resposta a proteínas dobradas na membrana externa (MECSAS; ROUVIERE; ERIKSON; DONOHUE; GROSS, 1993). Embora esses fatores não estejam implicados diretamente na resistência antimicrobiana, eles são necessários para manter a integridade da membrana celular, o que faz com que cepas de *E. coli* se tornem mais adaptadas aos danos induzidos por antimicrobianos (WOOD, MCBRIDE 2017).

O mecanismo da ação antimicrobiana do RL não é completamente elucidado, porém a hipótese mais aceita é de que seu alvo é a membrana citoplasmática, uma vez que possuem um carácter anfipático que permite a interação com os fosfolípidos

(MAGALHÃES; NITSCHKE, 2012). Pesquisas têm sugerido que os ramnolipídeos aumentam a permeabilidade da membrana e conseqüentemente, ocasionam alteração da integridade e danos celulares, como extravasamento de proteínas, íons e outros componentes, levando à morte das células (BAHARALI, 2012). A ação antimicrobiana das substâncias ativas vegetais (como os óleos essenciais) está relacionada ao fato de serem moléculas capazes de alterar a estrutura fosfolipídica da membrana celular, interromper o sistema enzimático, comprometer o material genético da bactéria e formar compostos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio. A atividade antimicrobiana de terpenos e extratos vegetais ricos em terpenos é bastante descrita na literatura (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). Os monoterpenos presentes em óleos vegetais estão associados a alterações na integridade e a função da membrana celular. Alguns dos efeitos específicos associados à membrana incluem mudanças no potencial da membrana (FISHER; PHILLIPS 2009; XU et al., 2008), extravasamento de componentes intracelulares (INOUE et al., 2004; LAMBERT et al., 2001; OUSSALAH et al., 2006) e inibição da respiração celular (COX et al., 2000).

O aipo e a noz moscada são especiarias utilizadas pela população, pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas no preparo de alimentos e para o tratamento de doenças. No entanto, ingestão acidental ou intencional da noz moscada, em quantidades além do comum, tem levado a intoxicações potencialmente letais caracterizadas por quadros excitatórios, alucinatórios e distúrbios no aparelho digestório (OLIVEIRA, 2007). Devido a possível toxicidade da noz moscada, o OR de aipo foi selecionado para a continuidade do trabalho, destacando-se que existem poucos relatos na literatura acerca de suas propriedades antimicrobianas frente a patógenos de importância alimentar. O aipo além de ser comercialmente importante, possui propriedades como antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno, antimicrobiano, atividade antiplaquetária, anti-lipêmico e anti-hipertensivo (SOWBHAGYA, 2014).

Partindo-se da hipótese que tanto o OR quanto os RL atuam à nível de membrana citoplasmática foram realizados ensaios antimicrobianos combinando-se ambos os agentes.

5.2 Combinação entre ramnolipídeo e óleoresina de aipo – determinação de CIM

Após a determinação da CIM do RL e de OR de aipo individualmente foi realizada ensaio com a combinação de ambos. A solução de partida foi preparada como 4 X CIM de cada um frente à cada patógeno particular sendo para *L. monocytogenes* (RL 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + OR de Aipo 12%), *E. coli* (RL 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + OR de Aipo 12%) e *B. cereus* (RL 125 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + OR de Aipo 3%), prosseguindo-se com as microdiluições. Para *E. coli* não se observou ação antimicrobiana tanto isoladamente quanto na combinação. A combinação entre RL e o OR de aipo (Tabela 3 e Figura 12) mostrou resultado semelhante ao obtido pelas agentes individualmente frente a *L. monocytogenes* (CIM igual à 125 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ + 3%), entretanto, para *B. cereus* houve um efeito positivo na combinação das substâncias, ou seja, a combinação do OR com o RL sugere possível sinergismo (CIM igual à 7,81 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ + 0,187%). Nas concentrações testadas não foi encontrado CBM.

Tabela 3 – Ação antimicrobiana do RL e OR de aipo sobre *L. monocytogenes*, *E. coli* e *B. cereus*.

Bactérias	RL ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	OR Aipo (%)	R L ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) + OR aipo (% v/v)
<i>L. monocytogenes</i>	125	3	125 + 3
<i>E. coli</i>	> 1000	> 3	> 1000 + 3
<i>B. cereus</i>	31,25	0,75	7,81 + 0,19

Fonte: Autoria própria.

Figura 12 – Ilustração da determinação da CIM da combinação entre ramnolipídeo e o OR de *Apium graveolens* (concentrações $\mu\text{g mL}^{-1}$ + %) para: A) *L. monocytogenes* B) *B. cereus*.

Fonte: Autoria própria.

A combinação de RL com OR de aipo permitiu a redução da concentração dos agentes provavelmente devido a potencialização da atividade antimicrobiana de ambos frente a *B. cereus*.

Os endósporos de *B. cereus* são resistentes e podem ser isolados em vários ambientes, estando amplamente distribuídos na natureza (FORGHANI et al., 2014, GHELARDI et al., 2002). Por esta razão este é um dos contaminantes mais encontrados em alimentos como vegetais, cereais, condimentos, carnes, laticínios, sobremesas, alimentos processados, refrigerados entre outros, e sua presença pode causar deterioração além de intoxicação alimentar (BENNETT et al., 2013, AGATA; OHTA; YOKOYAMA, 2002).

De acordo com dados do FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA) eventos de contaminação associados às espécies de *Bacillus* representam uma proporção relativamente alta (SANDLE, 2014). Esta bactéria tem sido a segunda principal causa de surtos alimentares na França desde 2012 e também é uma causa crescente de surtos na União Européia (GUÉRIN, et al., 2017). Dados coletados entre 2007 a 2017, no Brasil, também apontam este microrganismo entre os principais causadores de DTAs (SVS, 2017). O principal motivo para a contaminação com espécies de *Bacillus*, relaciona-se com procedimentos inadequados de limpeza e desinfecção. Este fato se deve a falha em incluir um agente esporicida como parte do regime de desinfecção ou, quando tal esporicida é usado, uma falha em qualificá-lo de uma maneira que demonstre que o desinfetante pode matar ou inativar esporos (SANDLE, 2014).

A fim de melhorar o potencial terapêutico dos antibióticos convencionais e combater a resistência dos microrganismos, as combinações de adjuvantes de antibióticos e o uso de nanopartículas podem ser consideradas estratégias antimicrobianas viáveis (BROOKS e BROOKS, 2014). Os ramnolípidos são capazes formar nanoemulsões O/A em água em baixas proporções de surfactante. As nanoemulsões podem ser formadas a partir de vários tipos diferentes de óleos, incluindo triglicerídeos e óleos flavorizantes (BAI; MCCLEMENTS, 2016). Assim os resultados obtidos neste trabalho podem ser explorados visando desenvolver nanoemulsão antimicrobiana a partir da combinação de ramnolípido com o OR de Aipo.

5.3 Identificação dos Constituintes Químicos do Óleo Resina de Aipo

Através da análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (Figura 13) verificou-se que os principais constituintes do OR de aipo foram: limoneno (terpeno), α e β -selineno (sesquiterpeno), 3-butilftalide, 3Z-butilidenoftalide, sedanenolide, Neocnidilide; ésteres graxos: Hexadecanoato de metila, 9,12-octadecadienoato de metila, 9-octadecenoato de metila, octadecanoato de metila, ácido 9-octadecenoico; além de trans-esqualeno e estigmasterol.

Figura 13 – Análise do óleoresina de *A. graveolens* por CG-MS.

De acordo com os resultados da investigação de Hassanen et al. (2015), entre os constituintes químicos ativos do óleo essencial de *Apium graveolens* foram encontrados terpenos monocíclicos: D-limoneno e γ -terpinina; e sesquiterpenos: β -cariofileno, β -selineno e α -selineno. Estes compostos também foram encontrados neste trabalho utilizando-se óleresina de aipo, com exceção de γ -terpinina (Tabela 4).

Os produtos do metabolismo secundário das plantas apresentam atividade contra vários microrganismos como vírus, fungos, protozoários e bactérias (PROBST, 2012). Os terpenos são os principais componentes de óleos essenciais, alteram a permeabilidade da célula penetrando através das cadeias de ácidos graxos da bicamada de lipídica da membrana, ocasionando ruptura e extravasamento celular (DI PASQUA; HOSKINS; BETTS; MAURIELLO, 2006; SERIO; CHIARINI; TETTAMANTI e PAPARELLA, 2010). Em linhagens de *S. aureus* produtoras de endotoxinas, os terpenos podem interferir na expressão de genes codificadores de fatores de virulência e em *Salmonella enterica* com a expressão de proteínas de membrana e citoplasmáticas (PROBST, 2012).

Tabela 4. Composição química do óleo-resina de *Apium graveolens*

	TR (min)	Composto	%GC-MS	IRR exp.	IRR lit.
1	9.965	Limoneno	9.48	1039	1024
3	13.415	pentil cicloexa-1,3-dieno	0.36	1158	1156
4	18.980	1-fenil-1-pentanona	0.57	1358	1364
5	20.705	β -cariofileno	0.23	1423	1417
6	22.455	β -selineno	3.11	1494	1489
7	22.615	α -selineno	0.77	1501	1498
8	23.190	dodecanoato de metila	0.06	1524	--
11	24.725	óxido de cariofileno	0.27	1586	1582
12	26.295	3-butilftalide	5.67	1655	1647
13	26.415	β -eudesmol	0.86	1661	1649
14	26.730	3Z-butilideno ftalide	0.20	1675	1671
16	27.765	Sedanenolide	7.41	1722	1719
17	27.915	Neocnidilide	1.75	1728	1722
18	28.040	Z-ligustilide	0.34	1734	1734
19	29.980	pentadecanoato de metila	0.27	1815	--
23	31.435	7,10,13-hexadecatrienoato de metila	0.28	1859	--
24	31.535	7-hexadecenoato de metila	0.37	1862	--
25	31.600	9-hexadecenoato de metila	0.87	1865	--
27	32.045	Hexadecanoato de metila	8.23	1878	--
28	32.745	ácido hexadecanoico	0.08	1900	--
31	33.985	heptadecanoato de metila	0.26	1947	--
35	35.280	9,12-octadecadienoato de metila	11.68	1996	--
36	35.465	9-octadecenoato de metila	30.50	2003	--
37	35.875	octadecanoato de metila	3.58	2019	--
38	36.115	ácido 9-octadecenoico	1.03	2028	--
40	38.880	11-eicosenoato de metila	0.23	2134	--
42	39.375	eicosanoato de metila	0.66	2152	--
44	41.030	heneicosanoato de metila	0.08	2216	--
47	42.620	docosanoato de metila	0.56	2276	--
48	44.155	tricosanoato de metila	0.18	2334	--
52	45.630	tetracosanoato de metila	0.58	2391	--
53	46.785	trans-esqualeno	0.14	2435	--
54	47.065	pentacosanoato de metila	0.08	2445	--
57	48.440	hexadocosanoato de metila	0.40	2498	--
60	51.070	octacosanoato de metila	0.49	2598	--
61	52.705	β -estigmasterol	0.51	2660	--
63	54.045	triacontanoato de metila	0.16	2711	--
Identificados			92.30		
Não identificados			7.70		
Ésteres graxos			60.63		
Total			100.00		

Fonte: autoria própria.

As espécies ricas em sesquiterpenos geralmente apresentam um amplo espectro de efeitos biológicos, como atividade antineoplásica, antimalária, antiviral e antimicrobiana. Os selinenos são um grupo de compostos químicos isoméricos classificados como sesquiterpenos. Todos os selinenos tem a fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ e têm sido isolados a partir de uma variedade de fontes vegetais: α -selineno e β -selineno são os mais comuns e são dois dos principais componentes da semente aipo (Figura 14) (ATTOKARAN, 2011). O β -cariofileno (Figura 14), também é um sesquiterpeno encontrado em diversos óleos essenciais e é conhecido por possuir forte aroma e atividade anti-inflamatória, anti-alérgica, anestésica local, antifúngica e anticarcinogênica (ALCÂNTARA et al., 2010).

Figura 14 – Estrutura química do A) α -selineno e B) β -cariofileno

Fonte: A) *National Institute of Standards and Technology* e B) *National Center for Biotechnology Information*

O limoneno (Figura 15), $C_{10}H_{16}$, é um composto orgânico responsável pelo aroma forte dos cítricos. Apresentando-se principalmente sob a forma do isômero D, e este, quando puro, é um líquido incolor (podendo apresentar uma ligeira coloração amarela), com um aroma cítrico. Conforme Montironi, Cariddi e Reinoso (2016), o limoneno mostrou efeitos inibitórios contra as células planctônicas e biofilmes de *Streptococcus uberis*. Outros trabalhos mostraram que o D-Limoneno apresentou CIM de $1,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*, e CIM de $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ contra *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANGA; VRIESEKOOPEB; YUANA, LIANGA, 2013). O mecanismo de ação de terpenos e terpenóides ainda não são completamente compreendidos. No entanto, o limoneno pertence à família de hidrocarbonetos monoterpênicos cíclicos, e sabe-se que o acúmulo destes compostos causa

mudanças na estrutura da membrana como rompimentos das interações lipídeo-proteína que afeta a permeabilidade seletiva de íons e moléculas hidrofílicas. A permeabilidade para prótons e outros íons é especialmente importante, pois os extravasamentos de íons afetam diretamente as propriedades de transdução de energia da membrana, sugerindo ser a ruptura da membrana o principal mecanismo de inativação (SIKKEMA; BONT; POOLMAN,1994). Assim a presença de limoneno pode ser responsável pelo efeito antibacteriano mostrado pelo OR de Aipo. Outros trabalhos também relataram o limoneno como o principal constituinte do óleo essencial de *Apium graveolens* por Misic et al., (2008), Fazal e Singla (2012) e Hassanen et al. (2015).

Figura 15 – Estrutura química do limoneno

Fonte: Química Nova Interativa (Sociedade Brasileira de Química).

Em geral, os óleos essenciais que contêm terpenos exibem atividade antimicrobiana (DORMAN; DEANS, 2000; VAN VUUREN, 2008). No entanto, vários estudos mostraram que o efeito antimicrobiano do óleo essencial é resultado da interação entre todos os componentes do óleo, e não apenas devido a efeitos dos compostos únicos (MOUREY; CANILLAC, 2002; DELAQUIS; STANICH, 2004). O uso de um composto específico por si só não é eficaz o suficiente para a inibição do crescimento do biofilme, o que enfatiza possíveis efeitos sinérgicos entre os compostos secundários vegetais (SANDASI; LEONARD; VILJOEN, 2008).

5.4 Quantificação e Ação Antimicrobiana em Biofilmes

5.4.1 *Listeria monocytogenes*

O cristal violeta (CV) é um corante básico que se liga a moléculas carregadas negativamente e a polissacarídeos na matriz extracelular, servindo como indicador de biomassa em um biofilme (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Este método foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do RL, OR de aipo e a combinação de ambos, sobre a biomassa dos biofilmes comparando com os grupos controles.

Os tratamentos com OR de Aipo (1/2 CIM = 1,50%; 1 CIM = 3,00%; e 2 CIM = 6,00%) indicaram um aumento na biomassa em relação ao controle podendo significar que além das células do biofilme, moléculas de óleo-resina também podem ter sido “aderidas” no biofilme de *L. monocytogenes*. No entanto, o RL (1/2 CIM = 62,5 µg. mL⁻¹; 1 CIM = 125 µg. mL⁻¹; e 2 CIM = 250 µg. mL⁻¹), por ser uma molécula tensoativa, mostrou-se em geral eficaz na remoção da biomassa deste biofilme quando comparamos com os grupos controles. A combinação entre o RL e o OR de Aipo (1/2 CIM = 62,50 µg. mL⁻¹ + 1,50%; 1 CIM = 125 µg. mL⁻¹ + 3,00%; e 2 CIM = 250 µg. mL⁻¹ + 6,00%) também não se mostrou eficaz em relação a remoção da biomassa, mostrando ter um perfil semelhante ao comportamento do tratamento feito somente com o OR de Aipo (Figura 16).

Figura 16 – Remoção de biomassa de biofilmes (48h) de *L. monocytogenes* tratados com diferentes concentrações de OR de Aipo; RL; e RL + OR de Aipo. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: autoria própria.

O sal de brometo de tetrazólio (MTT), é amplamente utilizado em ensaios como método para avaliar a viabilidade celular (TSUKATANI et al., 2009; WANG et al., 2010) e se baseia na capacidade da enzima desidrogenase, presente em células vivas, em reduzir o MTT formando um composto (formazan) roxo insolúvel (ABE; MATSUKI, 2000). A quantidade de formazan é medida e utilizada para estimar a viabilidade celular relativa, sendo amplamente aceito que esta conversão ocorre apenas em células viáveis (ZHU et al., 2004). Este método foi utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano dos tratamentos de RL, OR de aipo e combinação de ambos sobre os biofilmes comparativamente ao grupo controle.

Os ensaios com MTT mostraram que o tratamento com RL inibiu expressivamente a viabilidade celular do biofilme de *L. monocytogenes* em todas as concentrações e tempos de tratamentos, sendo o melhor resultado observado na concentração de 2 CIM (2 CIM = 250 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) no tempo de 2h com redução da viabilidade celular em 66,64%, em relação ao grupo controle (Figura 17). Para biofilmes de *L. monocytogenes* os tratamentos com RL não só inibiram a atividade metabólica celular como também reduziram a biomassa, como indicado pelo ensaio

de CV (Figura 16). Contudo, os resultados indicam que o tratamento com RL em menor tempo (2 h) na concentração 2 CIM, foi mais eficaz na redução do metabolismo celular, em relação à remoção da biomassa que necessita de maior tempo de contato (24 h) para um efeito significativo, o que sugere que não necessariamente a redução da viabilidade celular esteja correlacionada diretamente com a remoção da biomassa de um biofilme. O tratamento com OR de Aipo mostrou que a redução da viabilidade está relacionada ao tempo de tratamento e concentração, sendo que a menor atividade celular foi observada no tempo 24h com a concentração 1 CIM (3,00%) e 2 CIM (6,00%), reduzindo a viabilidade respectivamente em 50,78% e 57,11%. O OR de Aipo, por apresentar natureza hidrofóbica, pode permanecer associados às membranas das células bacterianas que são ricas em lipídeos, permeando-as com maior facilidade, conduzindo à morte celular. Desta forma, à medida que o tempo de exposição aumenta, a perda dos constituintes celulares também aumentará (OLIVEIRA, BRUGNERA, CARDOSO et al., 2010). A combinação entre RL e OR de aipo mostrou-se eficaz em todas as concentrações e tempos de tratamentos, com redução 44,47% a 57,31% de células viáveis (Figura 17). O RL e o OR de aipo ao serem combinados, podem atuar conjuntamente, modificando a resistência de biofilmes de *L. monocytogenes* e gerando um resultado mais eficaz.

Figura 17 – Inibição da Viabilidade celular de biofilmes (48h) de *L. monocytogenes* tratados com OR de aipo, RL e RL + OR de aipo. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: Autoria própria

O tratamento com RL mostrou efeito tanto sobre a biomassa, como sobre a viabilidade celular no biofilme. Estudos anteriores demonstraram que os ramnolipídeos podem provocar a ruptura dos biofilmes pré-formados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e também, de biofilmes formados por *Bacillus pumilus* (RIENZO et al., 2015 e DUSANE et al., 2010). Os biosurfatantes podem alterar as propriedades físico-químicas das superfícies, modificando a molhabilidade e carga da superfície e, portanto, afetando a interação das bactérias com a superfície e assim favorecendo a remoção do biofilme (NEU, 1996; BANAT et al., 2010). A remoção de biofilmes está vinculada com a capacidade do RL penetrar na interface entre o substrato e o biofilme. O RL pode adsorver na interface e reduzir a tensão interfacial, fazendo com que as interações entre as superfícies bacterianas e a superfície do substrato sólido responsáveis pela adesão contínua das bactérias sejam reduzidas, o que facilita a remoção do biofilme (MCLANDSBOROUGH et al., 2006).

O OR de Aipo reduziu a viabilidade celular do biofilme (MTT), porém este efeito não foi correlacionado com o ensaio de remoção de biomassa (cristal violeta). Apesar

do aumento da biomassa do biofilme, a atividade metabólica foi reduzida. Alguns estudos também indicaram uma correlação inversa ou nenhuma correlação entre a biomassa e a atividade metabólica para o extrato de plantas ou óleo essencial (BAZARGANI; ROHLOFF, 2015).

5.4.2 *Bacillus cereus*

Nos biofilmes de *B. cereus* os tratamentos com OR de Aipo (1/2 CIM = 0,37%; 1 CIM = 0,75%; e 2 CIM = 1,50%) não indicaram um aumento ou redução significativos na biomassa em relação ao controle. O RL (1/2 CIM = 15,62 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; 1 CIM = 31,25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; e 2 CIM = 62,50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) mostrou-se eficaz na remoção da biomassa deste biofilme apenas no tempo de tratamento de 13 h, sendo de 62,47%, 71,49% e 68,84% respectivamente nas concentrações 1/2 CIM, 1 CIM e 2 CIM. A combinação entre o RL e o OR de Aipo (1/2 CIM = 3,90 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ + 0,09%; 1 CIM = 7,81 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ + 0,19%; e 2 CIM = 15,62 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ + 0,38%) promoveu remoção de até 80,16 % do biofilme após 13-24 h de tratamento (Figura 18).

Figura 18 – Remoção de biomassa de biofilmes (48h) de *B. cereus* tratados com diferentes concentrações OR de Aipo; RL; e RL + OR de Aipo. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: Autoria própria

Os ensaios com MTT indicaram que o OR de aipo reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade das células no biofilme de *B. cereus* na concentração de 2 CIM (1,50%) nos tempos 2 h e 13 h em 51,19% e 43,29% respectivamente. Ao comparar com o OR de aipo, o RL se mostrou mais eficaz na redução de células viáveis de biofilme de *B. cereus*, pois todos os tempos e concentrações de tratamento foram significativos sendo que para a concentração de $62,50 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (2 CIM) a remoção média foi de 85,45%. A combinação entre o RL e o OR de aipo novamente sugere possível sinergismo (também observado para as células planctônicas de *B. cereus*); nos tempos de tratamento 2h e 13 h e nas concentrações $1/2 \text{ CIM}$ ($3,90 \mu\text{g. mL}^{-1} + 0,09\%$) 1 CIM ($7,81 \mu\text{g. mL}^{-1} + 0,19\%$) e 2 CIM ($15,62 \mu\text{g. mL}^{-1} + 0,38\%$) ocorreu redução na viabilidade celular, no tempo 24 h a inibição significativa (42,66%) foi apenas na concentração de 2 CIM (Figura 19). A remoção da biomassa não se mostrou vinculada com a inibição da viabilidade celular sendo que a combinação entre o RL e o OR de aipo no ensaio com CV não mostrou redução significativa da biomassa no tratamento de 2 h enquanto no ensaio de MTT ocorreu inibição de 56,77%, 58,06% e 60,71% respectivamente nas concentrações $1/2 \text{ CIM}$, 1 CIM e 2 CIM . Uma

interação sinérgica é observada quando o efeito das substâncias combinadas é maior que a soma dos efeitos individuais (BASSOLÉ; JULIANI, 2012). O uso simultâneo do RL e o OR de aipo, pode intensificar a atividade dos agentes, necessitando de menores concentrações para que ocorra a ação antimicrobiana.

Figura 19 – Inibição da viabilidade celular de biofilmes (48h) de *B. cereus* tratados com OR de aipo, RL e RL + OR de aipo. * redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: Autoria própria

Como indicado pelo ensaio de CV e MTT, os tratamentos com RL reduziram tanto a biomassa como a viabilidade celular nos biofilmes de *L. monocytogenes* e de *B. cereus*. Porém, apesar dos tratamentos com OR de aipo mostrarem uma redução na atividade metabólica celular, não foi observado uma significativa redução de biomassa.

Em biofilmes de *B. cereus* a redução da viabilidade promovida pelo OR de aipo foi menor a medida que aumentou o tempo de contato, sendo mais eficaz duas horas após a incubação (Figura 20). Possivelmente este fato se deve a eliminação das células presentes nas camadas mais externas do biofilme que estão mais facilmente expostas ao agente e assim gerando redução inicial da viabilidade. A presença da

matriz polimérica pode repelir a entrada do óleo para as camadas mais profundas do biofilme e assim tempos maiores não se mostram mais eficazes; além disso, a disposição tridimensional compacta de um biofilme mais maduro que pode dificultar a entrada desses compostos (SANDASI et al., 2008). Outro fator que também pode contribuir para a resistência aumentada em relação ao tempo é que a maioria dos compostos antimicrobianos são mais eficazes contra as células que crescem ativamente. As células em um biofilme têm uma taxa de crescimento menor devido à falta de nutrientes e oxigênio, o que pode reduzir os efeitos antimicrobianos dos compostos (SANDASI et al., 2010). Entretanto, para o biofilme de *L. monocytogenes* foi observado o contrário, o tratamento de 24 h foi o que apresentou melhor resultado (Figura 17).

No presente estudo foi observado que o tempo de tratamento com RL não afetou significativamente a redução da viabilidade celular mantendo-se um perfil semelhante para os biofilmes de *B. cereus* e *L. monocytogenes*, porém para a remoção da biomassa o tempo de tratamento apresentou diferença, sendo 13 h o melhor tempo para a redução da biomassa.

Os tratamentos com RL podem ser empregados com a finalidade de remoção de biomassa e diminuição da viabilidade de biofilmes de *L. monocytogenes*. Para a indústria de alimentos é economicamente vantajoso o emprego de tratamentos por períodos curtos de tempo. Desta forma, para a remoção de biofilmes o emprego do RL se mostra melhor em relação aos demais tratamentos tanto para *L. monocytogenes* como *B. cereus*. Para a redução da viabilidade celular do biofilme de *B. cereus* a combinação entre o RL e o OR de aipo mostrou ser mais vantajoso.

Comparando-se a atividade antimicrobiana nas células planctônicas, é importante destacar que esta foi avaliada após 24 h de tratamento, sendo que nestas condições os agentes foram mais eficazes quando comparados com células sesséis (biofilmes pré-formados de 48 h). Este fato provavelmente se deve a proteção exercida pela matriz polimérica extracelular que dificulta a penetração de desinfetantes, antibióticos. Em comparação com vida planctônica, as bactérias no biofilme são 1000 vezes mais resistentes ao tratamento com antibióticos convencionais e respostas imunes do hospedeiro, tornando-os muito mais difíceis de erradicar (BURMOLLE et al., 2010).

Os produtos aromáticos naturais e as especiarias têm sido amplamente utilizados como agentes conservantes em muitos produtos alimentares, como

produtos cárneos, produtos lácteos e de panificação (REDDY et al., 2005; SHAHSAVARI et al., 2008). Os extratos de plantas também têm aplicação generalizada na indústria farmacêutica, pois contêm vários compostos bioativos com propriedades antimicrobianas (BAZARGANI; ROHLOFF, 2016). As propriedades antimicrobianas do OR de aipo (*Apium graveolens*) são atribuídas especialmente ao limoneno (9,48%), composto também presente no óleo essencial em grandes quantidades (76,55%) de acordo com Hassanen et al. (2015). Os ramnolipídeos são surfatantes naturais efetivos sob iversas condições ambientais e, portanto, podem ser adequados para utilização em formulações de emulsões comerciais (BAI; MCCLEMENTS, 2016). Assim, pode-se afirmar que a combinação do RL e OR de aipo pode ser uma alternativa eficaz no controle dos patógenos alimentares *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados desta pesquisa demonstraram que o ramnolípídeo e óleoresinas de aipo e noz moscada foram capazes de inibir células planctônicas de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*.
- A triagem preliminar mostrou que os demais óleos (pracaxi, patauá, maracujá, alho, gengibre e buriti) não apresentaram atividade contra os microorganismos dentro da faixa das concentrações testadas.
- A combinação entre OR de Aipo e RL se mostrou eficiente frente a células planctônicas e sésseis de *B. cereus*, com redução significativa da atividade metabólica dos biofilmes.
- O tratamento com RL mostrou maior eficácia na remoção de biomassa de biofilmes de *L. monocytogenes* e *B. cereus*.
- O RL e OR de aipo são agentes antimicrobianos eficazes contra células planctônicas e sésseis de *L. monocytogenes* e *B. cereus*, o que permite a futura inclusão destes agentes naturais em formulações visando o controle destes patógenos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar:

- O sinergismo entre o RL e o OR de aipo frente a várias linhagens de *B. cereus*.
- O potencial esporocida do RL frente a *B. cereus*.
- A toxicidade do RL e de OR de aipo.
- A ação antimicrobiana em células planctônicas e sésseis das substâncias testadas sobre diversas condições físico-químicas.

Analisar:

- Efeito antimicrobiano sobre células planctônica e sésseis de culturas mistas.

Desenvolver:

- Emulsões e nanoemulsões entre RL e OR de aipo.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, A. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v.17, n.5, p.1367-1371, 2001.
- ABE, K.; MATSUKI, K. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neuroscience Research**, v.38, n.4, p.325-329, 2000.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. 4thed. Carol Stream: Allured, 2007.
- AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, n.1, p.23-27, 2002.
- AHIRE, J.J. et al. Surfactin-loaded polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers alters adhesion of *Listeria monocytogenes* to polystyrene. **Materials Science and Engineering: C**, v.77, p.27–33, 2017.
- ALCÂNTARA, J.M. et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v.40, n.3, p.567–571, 2010.
- ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P.E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, n.2, p.145-155, 1995.
- ARAUJO, L.V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v.44, p.481-488, 2011.
- BAI, L.; MCCLEMENTS, D.J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.479, p.71–79, 2016.
- BAJPAI, V.K.; RAHMAN, A.; SUN C.K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandinadomestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.117-22, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446–475, 2008.
- BANG, J. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. **International Journal of Food Microbiology**, v.191, p.129-134, 2014.
- BARBOSA, L.N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 121p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Biociências) – Universidade Estadual mPaulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

BARTOSZEWICZ, M.; KROTEN, M.A.; SWIECICKA, I. Germination and proliferation of emetic *Bacillus cereus* sensu lato strains in milk. **Folia Microbiologica**, v.58, n.6, p.529-535, 2013.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v.17, n.4, p.3989–4006, 2012.

BAZARGANI, M.M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v.61, p.156–164, 2016.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, n.5, p.353-359, 1999.

BENINCASA, M. et al. Chemical structures, surface properties and biological activities of the biosurfactant produce by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.85, n.1, p.1-8, 2004.

BENNETT, S.D.; WALSH, K.A.; GOULD, L.H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. **Clinical Infectious Diseases**, v.57, n.3, p.425-433, 2013.

BERENBAUM, M.C. What is synergy?. **Pharmacological Reviews**, v.41, n.2, p.93-141, 1989.

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. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2017. Disponível em:<<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos (DTA)** – descrição da doença. 2014. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11216-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

BREYERS, J.D.; RATNER, J.P. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, v.70, n.5, p.232–237, 2004.

BROOKS, B.D.; BROOKS, A.E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance – review. **Advanced Drug Delivery**, v.78, p.14–27, 2014.

BURMOLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.59, n.3, p.324–336, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223–253, 2004.

CAAMAÑO, A.S. et al. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. **Food Microbiology**, v.46, p.288–298, 2015.

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.

CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. In: FIGUEIREDO, A.C.; BARBOSA, J.G.; PEDRO, L.G. (Ed.). **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**: curso teórico-prático. 3.ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2007. p.55–62. Disponível em:<<http://cbv.fc.ul.pt/PAM/pdfsLivro/CarlosCavaleiro.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Surveillance for foodborne disease outbreaks United States 2015**: annual report. Disponível em:<https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/2015FoodBorneOutbreaks_508.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2017.

_____. **Escherichia coli**. Clifton Road Atlanta: CDC, 2015. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

_____. **Listeria (Listeriosis)**. Clifton Road Atlanta: CDC, 2016. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/listeria/>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Disponível em:<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/surtodta_pergresp.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2015.

_____. Disponível em:<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/2013LISTERIA_MONOCYTOGENES.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2016.

_____. Disponível em:<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/2Bacillus_rev2011.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2016.

_____. **Doenças transmitidas por água e alimentos – Escherichia coli O157:H7 (EHEC)**. Informe – NET DTA, 2011. São Paulo: Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo; CVE; DDTHA, 2011. Disponível em:<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/10EHEC_rev2011.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2016.

CHAVANT, P. et al. A New device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, n.3, p.605-12, 2007.

CHRISTENSEN, B.E.; CHARACKLIS, W.G. Physical and chemical properties of biofilms. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. (Ed.). **Biofilms**. New York: John Wiley, 1990. p. 93-130.

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

CLOETE, T.E. et al. The Antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.2, p.379–384, 2009.

- COSTERTON, J.W.; STEART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999.
- COSTERTON, J.W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.
- COWAN, M.M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.
- COX, S.D.; MARKHAM, J.L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.4, p.930–936, 2007.
- CUI, H., MA, C.; LIN, L. Synergetic antibacterial efficacy of cold nitrogen plasma and clove oil against *Escherichia coli* O157: H7 biofilms on lettuce. **Food Control**, v.66, p.8–16, 2016.
- DANIEL DE PAULA, C.M.; CASARIN, L.S.; TONDO, E.C. *Escherichia coli* O157:H7- patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.2, n.4, p.23–33, 2014.
- DELAQUIS, P.J.; STANICH, K. Antilisterial properties of cilantro essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, n.5, p.409-414, 2004.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.7, p.2745-2749, 2006.
- DOIJAD, S.P. et al. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. **PLoS ONE**, v.10, n.9, p.0137046, 2015.
- DORMAN, H.J.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-316, 2000.
- DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3thed. New York: Springer, 2006. v.3.
- EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.4, p.308-323, 2007.
- FAILLE, C. et al. Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. **Food Microbiology**, v.40, p.64-74, 2014.
- FERNANDES, M.S. et al. Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures. **International Dairy Journal**, v.72, p.23-28, 2017.
- FERREIRA, S.R.S. **Extração com dióxido de carbono líquido subcrítico de óleo essencial de pimenta do reino**. 191 f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- FIEBIG, R. et al. Biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the presence of a bioemulsifier produced on sunflower oil. **Biodegradation**, v.8, n.2, p.67-75, 1997.

- FIGUEIREDO, A.C.; PEDRO, L.G.; BARROSO, J.G. Plantas aromáticas e medicinais óleos essenciais e voláteis. **Revista da Associação Portuguesa da Horticultura**, v.114, p.29–33, 2007.
- FINK, R.C. et al. Transcriptional responses of *Escherichia coli* k-12 and O157:H7 associated with lettuce leaves. **Applied & Environmental Microbiology**, v.78, n.6, p.1752-1764, 2012.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The Ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, n.6, p.1749–1757, 2009.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER J. The Biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.9, p.623–633, 2010.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook - *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp.** Washington: U.S.Department of Health and Human Services, 2014. Disponível em:<<https://wayback.archive-it.org/7993/20170406190200/https://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070492.htm>>. Acesso em: 9 abr. 2017.
- FORGHANI, F.; KIM, J.B.; OH, D.H. Enterotoxigenic profiling of emetic toxin and enterotoxin-producing *Bacillus cereus*, isolated from food, environmental, and clinical samples by Multiplex PCR. **Journal of Food Science**, v.79, n.11, p.M2288-M2293, 2014.
- GHELARDI, E. et al. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v.208 n.1, p.129-34, 2002.
- GOMES, M.Z.V. **Utilização de biossurfactantes no controle da adesão bacteriana e na remoção de biofilmes de patógenos alimentares em superfície de poliestireno.** 2011. 96p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v.25, n.2, p.441-447, 2012.
- GUÉRIN, A. et al. Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells. **Food Microbiology**, v.64, p.195–201, 2017.
- GUIMARÃES, D.O.; SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667–679, 2010.
- HABA, E. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.3, p.316-322, 2003.
- HASSANEN, N.H.M.; EISSA, A.M.F.; HAFEZ, S.A.M. Original research article antioxidant and antimicrobial activity of celery (*Apium graveolens*) and coriander (*Coriandrum sativum*) herb and seed essential oils. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.3, p.284–296, 2015.
- HAYRAPETYAN, H.; ABEE, T.; NIEROP GROOT, M. Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. **Food Control**, v.60, p.493–499, 2016.

HAYRAPETYAN, H. et al. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 72-79, 2015.

HEYDORN, A. et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v.146, n.10, p.395-407, 2000.

HUSSAIN, M.S.; OH, D.H. Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. **Food Control**, v.77, p.270–280, 2017.

JADHAV, S. et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v.29, n.1, p.125–130, 2013.

KAPETANAKOU, A.E. et al. Assessing the response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheese types and after subsequent simulated digestion. **International Journal of Food Microbiology**, v.246, p.50-63, 2017.

KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I.E.; MĘDRZYCKA, K.; KARPENKO, E. Biosurfactants - biodegradability, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants. **Advances in Chemical and Mechanical Engineering**, v.2, n.2, p.1–8, 2009.

KUMAR C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal Food Microbiology**, v.42, n.1/2, p.9–27, 1998.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potencial. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, n.1, p.22-32, 1999.

LEONARD, C.M. et al. Bioactivity of selected essential oils and some componentes on *Listeria monocytogenes* biofilms. **South African Journal of Botany**, v.76, n.4, p.676-680, 2010.

LOIKO, M.R. **Quantificação de micro-organismos indicadores e caracterização de *Listeria* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 em etapas do abate de bovinos no Rio Grande do Sul.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LOTFABAD, T.B. et al. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.8, n.2, p.397–405, 2010.

LUCATELLI, A. ***Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP.** 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MACARISIN, D.; PATEL, J.; SHARMA, V.K. Role of curli and plant cultivation conditions on *Escherichia coli* O157:H7 internalization into spinach grown on hydroponics and in soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.173, n.3, p.48-53, 2014.

MACHADO, T.F. **Patógenos emergentes em alimentos.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v.29, n.1, p.138-142, 2013.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, p.34–39, 2001.

MAIA, J.G.S. Os Óleos essenciais. In: BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. (Org.). **Os Recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para produção de aromas e sabores**. Vitória: Edufes, 2008.

MAROUANI-GADRI, N.; AUGIER, G.; CARPENTIER, B. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakaï and EDL 933 *E. coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, n.1/2, p.62-67, 2009.

MAYER, R.M.; SOBE´RN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipidis: biosynthesis and potencial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, n.5, p.625-633, 2000.

MCELROY, D.M.; JAYKUS, L.A.; FOEGEDING, P.M. Validation and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. **Journal of Food Protection**, v.63, n.2, p.268-72, 2000.

MCLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, n.1, p.15–33, 2004.

MECSAS, J. et al. The Activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. **Genes & Development**, v.7, n.12b, p.2618–2628, 1993.

MENDES, A.N. et al. Physicochemical properties of rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to applications in microemulsions. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.6, n.1, p.64–79, 2015.

MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P.F. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. **Journal of Food Protection**, v.64, n.10, p.1535-1541, 2001.

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

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.10, p.2760-2764, 1998.

MOHAN, P.K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E.K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**, v.40, n.3, p.533–540, 2006.

MOHANTY, S.; MUKHERJI, S. Surfactant aided biodegradation of NAPLs by Burkholderia multivorans: comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR- 515. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.102, p.644–652, 2013.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v.13, n.4/5, p.289-292, 2002.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A Disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **Journal of Pathology**, v.29, n.4, p.407-439, 1926.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEU, T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological Reviews**, v.60, n.1, p.151-166, 1996.

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

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

OLIVEIRA, G.F.T. **Noz moscada, *Myristica fragrans*, houtt**: um estudo de composição e efeito do consumo crônico no comportamento de animais de laboratório. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2007.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p.277-284, 2010.

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: propylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, v.19, p.178-185, 2008.

OUSSALAH, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v.73, n.2, p.236-244, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n.5, p.414-420, 2007.

OWSIANIAK, M. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.84, n.3, p.545-553, 2009.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, n.1, p.27-33, 2005.

PATI, U.S.; KURADE, N.P. **Antibacterial screening methods for evaluation of natural products**. Disponível em: <<http://www.hillagric.ac.in/edu/covas/vpharma/winter%20school/lectures/31%20Antibacterial%20screening%20methods.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

PEETERS, E.; NOELIS, H.J.; COENYE T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v.72, p.157-165, 2008.

PEI, X.; ZHAN, X.; ZHOU, L. Effect of biosurfactant on the sorption of phenanthrene onto original and H₂O₂-treated soils. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, n.10, p.1378-1385, 2009.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIT, R. Rhamnolipid biosurfactants: production and their potential in environmental biotechnology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.672, p.211–221, 2010.

PROBST, I.D.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

RANDHAWA, K.K.S.; RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.1-7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.00454>.

REDDY, V.; UROOJ, A.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. **Food Chemistry**, v.90, n.1/2, p.317-321, 2005.

RIENZO, A. et al. Different mechanisms confer gradual control and memory at nutrient- and stress-regulated genes in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v.35, n.21, p.3669-3683, 2015.

RODRIGUES, R.Q. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v.42, p.152-164, 2014.

SANDASI, M.; LEONARD, C.M.; VILJOEN, A. The Effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v.19, n.11, p.1070-1075, 2008.

_____. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, n.1, p.30-35, 2010.

SANDLE, T. The Risk of *Bacillus cereus* to pharmaceutical manufacturing. **American Pharmaceutical Review**, 2014. Disponível em: <<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/169507-The-Risk-of-em-Bacillus-cereus-em-to-Pharmaceutical-Manufacturing/>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

SCHILLACI, D. et al. In Vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, n.5, p.433-438, 2008.

SERIO, A. et al. Electronic paramagnetic resonance investigation of the activity of *Origanum vulgare* L. essential oil on *Listeria monocytogenes* membrane. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, n.2, p.149-157, 2010.

SHAHSAVARI, N. et al. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.63, n.4, p.183-188, 2008.

SHAO, B. et al. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: a review. **Microbiological Research**, v.200, p.33-44, 2017.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.11, p.8022-8028, 1994.

- SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. **Water Research**, v.39, n.20, p.5142–5152, 2005.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, v.43, n.1, p.229–237, 2009.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A Review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, n.4, p.573-583, 2010.
- SIMÕES, M. et al. The Effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.335–341, 2008.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potencial applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.3, p.142-146, 2004.
- SOTIROVA, A. et al. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**, v.164, n.3, p.297–303, 2009.
- SOUZA, J.R. et al. Cinética e caracterização de Rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas Aeruginosa* Msic02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v.37, n.3, p.431-441, 2014.
- SOWBHAGYA, H.B. Chemistry, technology, and nutraceutical functions of celery (*Apium graveolens* L.): an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.54, n.3, p.389–398, 2014.
- TEIXEIRA, L.A.B.; BONACIM J.E. **Levantamento dos aspectos microbiológicos dos produtos alimentícios comercializados no município de Curitiba no período 1998-2001**. 2003. Monografia (Especialização em Vigilância em Saúde) - Universidade Tuiuti, Curitiba, 2003.
- TIRLONI, E. et al. *Bacillus cereus* in fresh ricotta: comparison of growth and Haemolysin BL production after artificial contamination during production or post processing. **Food Control**, v.79, p.272-278, 2017.
- TODAR, K. **Todar's**: online textbook of bacteriology. Madison, 2012. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/>>. Acesso em: 22 abr. 2017.
- TROMBETTA, D. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.
- TSEN, H.Y. et al. *Bacillus cereus* group strains, their hemolysin bl activity, and their detection in foods using a 16s rna and hemolysin bl gene-targeted multiplex polymerase chain reaction system. **Journal of Food Protection**, v.63, n.11, p.1496-1502, 2000.
- TSUKATANI, T. et al. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. **Analytical Biochemistry**, v.393, n.1, p.117-125, 2009.
- TSUNEDA, S. et al. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, v.223, n.2, p.287–292, 2003.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects: part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.24, n.6, p.604–620, 2006.

VAN VUUREN, S.F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, n.3, p.462-472, 2008.

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant. **Bioresource Technology**, v.221, p.510–516, 2016.

VARJANI, S.J. et al. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from onshore sites of Gujarat, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.103, p.116-124, 2015.

VOS, P. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nded. New York: Springer, 2009. v.4.

WANG, H. et al. An Improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.82, n.3, p.330-333, 2010.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.10, p.2675-2679, 2000.

WHITCHURCH, C.B. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v.295, n.5559, p.1487, 2002.

WIJMAN, J.G.E. et al. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied & Environmental Microbiology**, v.73, n.5, p. 1481-1488, 2007.

WOODS, E.C.; MCBRIDE, S.M. Regulation of antimicrobial resistance by extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. **Microbes and Infection**, v.19, n.4/5, p.238-248, 2017.

XU, J.J. et al. Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. **Toxicological Sciences**, v.105, n.1, p.97-105, 2008.

YUAN, X. et al. Adsorption of surfactants on a pseudomonas aeruginosa strain and the effect on cell surface hydrophobicity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.76, n.5, p.1189–1198, 2007.

YUAN, X.Z. et al. Effect of rhamnolipids on cadmium adsorption by *Penicillium simplicissimum*. **Journal of Central South University**, v.19, n.4, p.1073-1080, 2012.

ZHONG, H. et al. Adsorption of rhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.77, n.2, p.447–455, 2007.

ZHU, X. et al. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. **Biomaterials**, v.25, n.18, p.4087-4103, 2004.