

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Programa de Pós-Graduação em Química  
IQSC/USP

Tathiane Ferroni Passos

Efeito de pH e solutos na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente a bactérias de importância alimentar

São Carlos  
2023



Tathiane Ferroni Passos

Efeito de pH e solutos na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente a bactérias de importância alimentar

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química orgânica e biológica

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

São Carlos

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Assinatura:** *Tathiane Ferroni Passos*  
**Data:** 12/06/2023

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Passos, Tathiane Ferroni

Efeito de pH e solutos na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente a bactérias de importância alimentar / Tathiane Ferroni Passos. — São Carlos, 2023.

117 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

1. Biossurfactante. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Patógenos de origem alimentar. 4. Aditivos alimentares. 5. Ramnolipídeo. I. Título.

*Solange M S Puccinelli1 - CRB: 1500/8*



## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, pois, mesmo em momentos de pouca fé, sei que nunca deixou de olhar por mim.

À minha mãe, Raquel, que por muito tempo foi meu anjo na terra e hoje olha por mim do céu. Agradeço o amor incondicional e por sempre acreditar que eu conseguiria, até mesmo mais do que eu mesma. Meus agradecimentos se estendem muito além deste. Este trabalho é para você.

Ao meu pai, Adevar, pois, graças ao incentivo e apoio eu ingressei e hoje termino meu doutorado. Agradeço ainda pela imensa confiança depositada em mim. Aos meus irmãos, Neto e Rodrigo, por serem meus primeiros amigos, pela força e encorajamento. À Giseli, minha cunhada, amiga, irmã, pelas longas conversas e por sempre me mostrar o lado bom das coisas. E às minhas sobrinhas Mariana e Heleninha, que sempre iluminam meus dias com todo o carinho e puro amor, que só uma criança pode transbordar.

Ao meu companheiro de vida, Higor, por todo carinho, amor e principalmente por escolher percorrer esta caminhada comigo, você me faz muito feliz.

À Profa. Dra. Márcia Nitschke pela incrível orientação, por todo o incentivo, confiança e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, e também pela amizade.

Aos técnicos Marília e João Pedro por todo o suporte durante a realização dos experimentos.

À técnica Eloisa, pelas conversas, amizade e principalmente por me ajudar a encontrar minhas “micelinhas”.

Aos colegas do grupo de Biotecnologia Microbiana, especialmente ao Marcos, por todas as conversas, sejam científicas ou não, e por sempre me dizer que tudo iria ficar bem.

Aos amigos, Isabeli, Cristian e Chiara, pela torcida, pelas histórias vividas e por ajudar a tornar o período de doutorado muito mais leve.

À CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.



## Resumo

PASSOS, Tathiane Ferroni. Efeito de pH e solutos na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente a bactérias de importância alimentar. 2023. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O número de pessoas acometidas por Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) vem crescendo anualmente, e a maioria dos casos têm sido relacionados com agentes biológicos, destacando-se as bactérias. Neste cenário, as propriedades antimicrobianas de biossurfactantes (BS) vem sendo exploradas como alternativas para o controle de contaminações em alimentos. Os ramnolipídeos (RLs) são BS, que demonstram estabilidade em uma ampla faixa de pH e concentração de eletrólitos, além de serem biodegradáveis e de baixa toxicidade, propriedades desejáveis para a aplicação em alimentos. Neste trabalho, avaliou-se o efeito da interação dos RLs com NaCl (cloreto de sódio) e sacarose, em diferentes valores de pH, investigando sua relação com a atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) na forma planctônica e em biofilmes. Determinou-se as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM), dos RLs, RL-NaCl e RL-sacarose, em uma faixa de pH de 5,0 a 8,0, além de se avaliar o crescimento microbiano na presença de RLs, e sua atividade antibiofilme. Parâmetros físico-químicos como Concentração Micelar Crítica (CMC), e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) dos RLs também foram determinados nas diferentes condições de trabalho. A atividade antimicrobiana dos RLs foi dependente do valor de pH, e a adição de NaCl e sacarose resultou em um aumento significativo da sua eficácia. O RL apresentou atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* apenas em pH 5,0, com CBM de 78,1 mg/L. Entretanto, a presença dos solutos ampliou a faixa de pH em que os RLs atuam, em especial quando combinados com NaCl, com CBM de 156,2 mg/L e 1250,0 mg/L para pH 7,0 e 8,0, respectivamente. Além disso, a associação do RL com os solutos resultou na maior remoção de biofilmes, observando-se redução na população bacteriana em torno de 5 logs na presença de 5% do sal e 3 logs com 50% de açúcar. A adição de 5% de NaCl também contribuiu para a ação inibitória dos RLs frente a *E. coli*, observando-se valores de CIM entre 19,5 mg/L (pH 5,0) e 156,2 mg/L (pH 8,0), revelando-se um efeito bacteriostático em células planctônicas. A

presença dos solutos promoveu alterações no tamanho dos agregados micelares de RLs, principalmente em pH 7,0 e 8,0, sendo este efeito mais expressivo para a adição do sal. Adicionalmente, a redução nos valores de CMC na presença de 5% de NaCl, de 94,2 mg/L para 16,0 mg/L em pH 7,0 e de 121,4 mg/L para 15,5 mg/L em pH 8,0 sugere relação entre a agregação micelar e a atividade antimicrobiana dos RLs. Os resultados obtidos indicam que os RLs apresentam potencial promissor visando o controle de patógenos na indústria de alimentos.

Palavras-chave; Biossurfactante. Atividade antimicrobiana. Patógenos de origem alimentar. Aditivos alimentares. Ramnolipídeo.

## Abstract

PASSOS, Tathiane Ferroni. Effect of pH and solutes on the antimicrobial activity of rhamnolipids against bacteria of food importance. 2023. Thesis (Ph.D. in Chemistry) – Graduate Program in Chemistry - Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

The number of people affected by Foodborne Diseases (FBD) has been growing annually, and most cases have been related to biological agents, especially bacteria. In this scenario, the antimicrobial properties of biosurfactants (BS) have been explored as alternatives to control food contamination. Rhamnolipids (RLs) are BS that demonstrate stability in a wide range of pH and electrolyte concentration, besides being biodegradable and of low toxicity, desirable properties for application in food. In this work, we evaluated the effect of the interaction of RLs with NaCl (sodium chloride) and sucrose, on different pH values, investigating its relationship with antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) in planktonic form and in biofilms. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) of the RLs, RL-NaCl, and RL-sucrose, were determined in a pH range of 5.0 to 8.0, in addition to evaluating microbial growth in the presence of RLs, and their antibiofilm activity. Physical-chemical parameters such as Critical Micellar Concentration (CMC) and Dynamic Light Scattering (DLS) of the RLs were determined under different working conditions. The antimicrobial activity of the RLs was dependent on the pH value, and the addition of NaCl and sucrose resulted in a significant increase in their efficacy. The RL showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes* only at pH 5.0, with an MBC of 78.1 mg/L. However, the presence of the solutes increased the pH range in which the RLs act, especially when combined with NaCl, with MBC of 156.2 mg/L and 1250.0 mg/L at pH 7.0 and 8.0, respectively. Furthermore, the association of RL with the solutes resulted in greater biofilm removal, with a reduction in the bacterial population of around 5 logs in the presence of 5% of salt and 3 logs with 50% of sugar. The addition of 5% NaCl also contributed to the inhibitory action of RLs against *E. coli*, observing MIC values between 19.5 mg/L (pH 5.0) and 156.2 mg/L (pH 8.0), revealing a bacteriostatic effect on planktonic cells. The presence of solutes promoted changes in the size of micellar aggregates of RLs, mainly at pH 7.0 and 8.0, and such an effect was more expressive for the addition of

salt. In addition, a reduction in CMC was observed in the presence of 5 % NaCl, from 94.2 mg/L to 16.0 mg/L at pH 7.0 and from 121.4 mg/L to 15.5 mg/L at pH 8.0, which suggests a relationship between micellar aggregation and antimicrobial activity of RLs. The results obtained indicated that RLs were promising for controlling pathogens in the food industry.

Key words; Biosurfactant. Antimicrobial activity. Foodborne pathogens. Food additives. Rhamnolipid.

## Lista de ilustrações

Figura 1: Etapas de desenvolvimento e formação de biofilmes bacterianos.....	26
Figura 2: Representação esquemática de um surfactante genérico, contendo domínio hidrofóbico, cauda apolar, geralmente composto por hidrocarbonetos, e domínio hidrofílico, cabeça polar, a qual pode ser iônica.....	28
Figura 3: Estrutura química dos principais homólogos dos ramnolipídeos. (A) Mono-ramnolipídeo Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> e (B) di-ramnolipídeo Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> . ....	32
Figura 4: O processo de micelização. (A) Tensão superficial em função da concentração do BS, (B) Estruturas típicas de micelas e (C) Micelas formadas em solventes aquosos e orgânicos. ....	34
Figura 5: Esquema de possíveis conformações para moléculas de RLs. (A) Formato assumido quando na conformação de micelas após adição de eletrólitos ao meio, como o NaCl e (B), Formato assumido por mono e di-RLs de modo a minimizar energia. ....	35
Figura 6: Possível formato de cone, que a molécula de RL assume ao interagir com membrana fosfolipídica, modelo baseado em testes <i>in vitro</i> . ....	36
Figura 7: Ensaio para determinação dos valores de CIM e CBM. (A) Esquema para montagem da microplaca de 96 orifícios, (B) Exemplo de microplaca após acréscimo de MTT e (C) Exemplo de placa após ensaio para verificação de CBM. ....	41
Figura 8: Esquema para montagem da microplaca de 24 orifícios para avaliação da atividade antimicrobiana de RLs em biofilmes. (A) Inóculo e (B) Tratamento com RLs. ....	42
Figura 9: Curva de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de RLs (CIM-CBM), em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0. ....	53
Figura 10: Curva de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs, em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, (D) pH 8,0, (E) RLs em meio TSYEB sem adição de NaCl e (F) RLs em meio TSEYB contendo 5% NaCl. ....	55
Figura 11: Curva de crescimento de <i>E.coli</i> ATCC 25922 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs, em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0,	

(C) pH 7,0, (D) pH 8,0, (E) RLs em meio TSYEB sem adição de NaCl e (F) RLs em meio TSYEB contendo 5% NaCl. ....	57
Figura 12: Curva de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de RLs (CIM-CBM), em 0 e 50% (m/v) de sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, e (D) pH 8,0. ....	59
Figura 13: Curva de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de 650 mg/L de RLs, em 0 e 50% (m/v) de sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, (D) pH 8,0, (E) RLs em meio TSYEB sem adição de sacarose e (F) RLs em meio TSYEB contendo 50% de sacarose. ....	60
Figura 14: Aspecto visual do meio de cultura durante crescimento de <i>L. monocytogenes</i> . (A) Controle em meio de cultura TSYEB, (B) Controle em meio de cultura contendo 50% de sacarose e (C) Contagem de UFC/mL em meio de cultura TSYEA em diferentes diluições. ....	62
Figura 15: Atividade antibiofilme de RLs (300 mg/L) frente a <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0. ....	66
Figura 16: Atividade antibiofilme de RLs (650 mg/L) frente a <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, em 0 e 50% (m/v) de sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0. ....	67
Figura 17: Microscopia confocal de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> após coração com o kit de fluoróforos <i>live/dead</i> <sup>®</sup> . (A) pH 5,0 controle, (B) pH 7,0 controle, (C) pH 5,0 RL 300 mg/L, (D) pH 7,0 RL 300 mg/L, (E) pH 5,0 5% NaCl RL 300 mg/L e (F) pH 7,0 5% NaCl RL 300 mg/L. Escalas de tamanho correspondem à 20 µm. ....	70
Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> em TSYEB cotendo 50% de sacarose. (A) pH 5,0 Controle, (B) pH 7,0 Controle, (C) pH 5,0 RL 650 mg/L e (D) pH 7,0 RL 650 mg/L. Setas apontam células. ....	72
Figura 19: Fotografia ilustrando o ensaio para determinação dos valores de CEMB dos RLs frente a biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> , em pH 5,0 e 7,0, no meio TSYEB contendo 0, 5% NaCl e 50% de sacarose (m/v). ....	74
Figura 20: Atividade antimicrobiana de RLs contra biofilme de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de NaCl (0 e 5% (m/v)) e sacarose (50% (m/v)). (A) pH 5,0 0NaCl, (B) pH 5,0 5% NaCl, (C) pH 5,0 50% Sacarose (D) pH 7,0 0 NaCl, (E) pH 7,0 5% NaCl, (F) pH 5,0 50% Sacarose. ....	75

Figura 21: Microscopia de fluorescência de estruturas micelares de ramnolipídeos (1000 mg/L) formados em solução aquosa. (A) pH 5,0, (B) pH 5,0 5% NaCl, (C) pH 5,0 5% Sacarose, (D) pH6,0, (E) pH 6,0 5% NaCl, (F) pH 6,0 5% Sacarose, (G) pH7,0, (H) pH 7,0 5% NaCl, (I) pH 7,0 5% Sacarose, (J) pH8,0, (K) pH 8,0 5% NaCl e (L) pH 8,0 5% Sacarose. Concentrações de solutos em (m/v). Escalas de tamanho correspondem à 20 µm. ....	79
Figura 22: Curva de distribuição de intensidade de espalhamento de luz por tamanho para ramnolipídeos em solução aquosa (300 mg/L) em diferentes valores de pH contendo 5% (m/v) NaCl e 50% (m/v) sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 5,0 NaCl, (C) pH 5,0 Sac, (D) pH 6,0, (E) pH 6,0 NaCl, (F) pH 6,0 Sac, (G) pH 7,0, (H) pH 7,0 NaCl, (I) pH 7,0 Sac, (J) pH 8,0, (K) pH 8,0 NaCl e (L) pH 8,0 Sac.....	81
Figura 23: Microscopia de fluorescência de agregados micelares de ramnolipídeos (1000 mg/L) e células de <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19112). Imagens obtidas com auxílio de filtro verde (535 nm) e em campo claro. (A) pH 5,0 5% NaCl, (B), pH 7,0 5% NaCl e (C) pH5,0 5% de sacarose. Concentrações de solutos em (m/v). ....	85
Figura 24: Microscopia confocal de agregados micelares de ramnolipídeos (1000 mg/L), e células de <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19112). Imagens obtidas com fluorescência, em campo claro e com a sobreposição de ambas. (A) pH 5,0 5% NaCl, (B), pH 5,0 5% NaCl com <i>L. monocytogenes</i> , (C) pH7,0 5% NaCl, (D) pH 7,0 5% NaCl com <i>L. monocytogenes</i> . ....	86
Figura 25: Perfil de crescimento <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs em 0 e 5% de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0. ....	114
Figura 26: Perfil de crescimento <i>E.coli</i> ATCC 25922 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs em 0 e 5% de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0.....	115



## Lista de tabelas

Tabela 1: Efeito da variação de pH e concentração de NaCl na atividade antimicrobiana de RLs (mg/L) frente a <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19112). .....	50
Tabela 2: Efeito da variação de pH e concentração de NaCl na atividade antimicrobiana de RLs (mg/L) frente a <i>E. coli</i> (ATCC 25922).....	50
Tabela 3: Efeito da variação de pH e concentração de sacarose na atividade antimicrobiana de RLs (mg/L) frente a <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19112). .....	51
Tabela 4: Atividade antimicrobiana de RLs (mg/L), em biofilmes de <i>L. monocytogenes</i> . .....	73
Tabela 5: Valores de CMC (mg/L) de soluções aquosas de ramnolipídeos (300 mg/L) em diferentes valores de pH e concentração de NaCl. ....	76
Tabela 6: Valores de CMC (mg/L) de soluções aquosas de ramnolipídeos (300 mg/L) em diferentes valores de pH e concentração de sacarose.....	77
Tabela 7: Índice de polidispersão (PDI) para soluções aquosas de ramnolipídeos (300 mg/L) em diferentes valores de pH e concentração de NaCl e sacarose.....	83
Tabela 8: Sensibilidade de linhagens de <i>L. monocytogenes</i> às concentrações crescentes de NaCl. ....	107
Tabela 9: Sensibilidade de linhagens de <i>B.cereus</i> às concentrações crescentes de NaCl. ....	107
Tabela 10: Sensibilidade de linhagens de <i>E.coli</i> e <i>S.enterica</i> às concentrações crescentes de NaCl. ....	108
Tabela 11: Crescimento microbiano das linhagens de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com variações de NaCl e pH.....	108
Tabela 12: Crescimento microbiano das linhagens de <i>E.coli</i> de acordo com variações de NaCl e pH.....	109
Tabela 13: Crescimento microbiano das linhagens de <i>S. enterica</i> de acordo com variações de NaCl e pH. ....	109
Tabela 14: Crescimento microbiano das linhagens de <i>B. cereus</i> de acordo com variações de NaCl e pH. ....	110
Tabela 15: Efeito da variação de pH e concentração de NaCl na atividade antimicrobiana de RLs frente a <i>B. cereus</i> (ATCC 33018). ....	111
Tabela 16: Crescimento microbiano* das linhagens de <i>L. monocytogenes</i> e <i>E.coli</i> de acordo com variações de sacarose e pH. ....	112



## Lista de abreviaturas e siglas

ATCC- *American Type Culture Collection*

aw- Atividade de água

BS- Biossurfactantes

CBM-Concentração Bactericida Mínima

CEMB- Concentração de Erradicação Mínima de Biofilme

CIMB- Concentração Inibitória Mínima de Biofilme

CIM-Concentração Inibitória Mínima

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMC- Concentração Micelar Crítica

CN-Controle Negativo

CP-Controle Positivo

D.O-Densidade Óptica

DLS- Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*

DTHA- Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar

EFSA- *European Food Safety Authority*

EPA- *Environmental Protection Agency- United States*

EPS- exopolissacarídeo

INCQS-FIOCRUZ- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

LMMC- Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal

LPS- lipopolissacarídeos

MELs- lipídeos de manosileritritol

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT- *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

OMS- Organização Mundial da Saúde

PDI- Índice de Polidispersão, do inglês *Polydispersity Index*

RLs- Ramnolipídeos

TS- Tensão Superficial

TSYEA- meio de cultura Ágar Soja Triptona acrescido de Extrato de Levedura, do inglês *Tryptic Soy Yeast Extract Agar*

TSYEB- meio de cultura Caldo Soja Triptona acrescido de Extrato de Levedura, do inglês *Tryptic Soy Yeast Extract Broth*

UFC- Unidade Formadora de Colônia

## Sumário

1. Introdução .....	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. Revisão bibliográfica.....	23
3.1 Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) – Desafios que ainda persistem.....	23
3.2 Agentes tensoativos.....	27
3.2.1 Surfactantes.....	27
3.2.2 Biossurfactantes .....	29
3.2.2.1 Ramnolipídeos .....	31
3.2.3 A formação de micelas .....	33
3.2.4 Ramnolipídeos como agentes antimicrobianos .....	35
4. Material e métodos.....	39
4.1 Ramnolipídeos (RLs).....	39
4.2 Microrganismos e preparação dos inóculos .....	39
4.3 Determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) <sup>40</sup> .....	
4.4 Curva de crescimento bacteriano.....	41
4.5 Atividade antimicrobiana em Biofilmes bacterianos.....	42
4.5.1 Microscopia confocal em biofilmes.....	43
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
4.6 Determinação das concentrações inibitória mínima de biofilme e de erradicação mínima de biofilme (CIMB) e (CEMB) .....	44
4.7 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	45
4.8 Avaliação dos agregados moleculares de RLs.....	45
4.8.1 Microscopia de fluorescência .....	45
4.8.2 Microscopia confocal de agregados micelares .....	46
4.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	46
4.10 Análise estatística.....	47
5. Resultados e discussões .....	49
5.1 Concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM).....	49
5.1.1 Efeito do NaCl.....	49
5.1.2 Efeito da sacarose.....	50

<b>5.2</b>	<b>Curva de crescimento bacteriano</b>	52
5.2.1	Efeito do NaCl	52
5.2.2	Efeito da sacarose	58
<b>5.3</b>	<b>Atividade antimicrobiana em Biofilmes bacterianos</b>	65
5.3.1	Efeito do NaCl	65
5.3.2	Efeito da sacarose	67
5.3.3	Microscopia confocal em biofilmes	69
5.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
<b>5.4</b>	<b>Determinação das concentrações inibitória mínima de biofilme e de erradicação mínima de biofilme (CIMB) e (CEMB)</b>	72
<b>5.5</b>	<b>Concentração Micelar Crítica (CMC)</b>	76
5.5.1	Efeito do NaCl	76
5.5.2	Efeito da sacarose	77
<b>5.6</b>	<b>Avaliação dos agregados moleculares de RLs</b>	78
5.6.1	Interação das células bacterianas com micelas de RLs	84
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b>	89
<b>7.</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros</b>	91
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		93
<b>APÊNDICE</b>		107

## 1. Introdução

No campo da saúde pública, toxi-infecções são consideradas uma das principais causas de morte em todo mundo. As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) estão entre as mais significativas, sendo relatados diversos tipos de doenças ocasionadas por contaminações de origem alimentar. (1,2) Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano as DTHA acometem cerca de uma a cada 10 pessoas no mundo, acarretando aproximadamente 420 mil mortes. (3)

As DTHA podem ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas, sendo as bactérias mais comumente relacionadas a este tipo de doenças. (4,5) Alguns desses patógenos são capazes de sobreviver em baixas temperaturas, permitindo contaminações mesmo sob refrigeração, outros produzem enterotoxinas termoestáveis, o que pode dificultar sua eliminação em alimentos. (6) Além disso, muitas bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, são capazes de formar biofilmes, os quais apresentam maior resistência à antimicrobianos se comparados com células planctônicas, o que também contribui para sua disseminação. (7) Dentre as espécies relacionadas a DTHA, pode-se destacar *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus*. (4,6) A grande diversidade e patogenia das bactérias causadoras de DTHA, impulsiona a busca por novas estratégias que visem erradicar ou prevenir contaminações em alimentos.

Majoritariamente, os surfactantes disponíveis no mercado são sintetizados a partir do petróleo ou de fontes não renováveis. (8) São moléculas anfifílicas que apresentam uma porção hidrofóbica e uma hidrofílica, o que lhes permite formar emulsões, facilitando a solubilização de compostos hidrofóbicos em água, além de exibirem propriedades tensoativas, sendo capazes de reduzir a tensão interfacial e a tensão superficial. (9,10) Apesar da ampla gama de propriedades e aplicações, os surfactantes sintéticos podem ser tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente, o que tem implicado buscas por compostos biodegradáveis. (9,11)

Os biossurfactantes (BS) têm emergido como alternativas ao uso dos surfactantes sintéticos, uma vez que oferecem uma série de vantagens, incluindo alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, além de serem obtidos a partir de fontes renováveis. (12) Os ramnolipídeos (RLs) são BS da classe dos glicolipídeos,

produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Apresentam estabilidade em extremos de pH e alta concentração de eletrólitos, elevado poder emulsificante, baixa concentração micelar crítica, o que os torna alvos de interesse para uso como aditivos em medicamentos, cosméticos e em alimentos. (9,11,13)

Alguns estudos evidenciaram a atividade antimicrobiana dos RLs contra diversos tipos de patógenos alimentares, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tanto na forma planctônica como em biofilmes. (13–18) E apesar do mecanismo de ação dos RLs ainda não ser completamente elucidado, sugere-se que esteja relacionado a interações com a membrana. (19) A eficácia bactericida dos RLs, mostrou-se dependente do valor de pH do meio, sendo favorecida em condições ácidas principalmente contra bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus*. (15) Ademais, a força iônica do meio também parece interferir na ação antimicrobiana dos RLs. A adição de eletrólitos em solução, resultou em um aumento significativo da eficácia bactericida do BS contra *S.aureus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*, mais expressivamente em valores de pH neutro e alcalino. (15,20)

Sabe-se que o sal (NaCl) e o açúcar (sacarose), são aditivos comuns em alimentos, que além do aspecto sensorial, podem estar relacionados com o controle do crescimento microbiológico. (21) Apesar da importância da concentração de solutos, como NaCl e sacarose, e do valor de pH para o desenvolvimento bacteriano, pouco se conhece sobre a influência da combinação destes fatores na ação dos RLs. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o efeito da presença de NaCl ou sacarose sob diferentes valores de pH na atividade antibacteriana dos RLs em células planctônicas e biofilmes de bactérias de importância alimentar, de modo a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias, visando garantir a segurança microbiológica de alimentos.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar a interação do ramnolipídeo (RL) quando combinado com NaCl e sacarose (RL-NaCl e RL-sacarose), em diferentes valores de pH, e investigar sua relação com atividade antimicrobiana frente a bactérias de importância alimentar, tanto na forma planctônica como em biofilmes.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar os valores das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas dos RLs, RL-NaCl e RL-sacarose em diferentes valores de pH;
- Avaliar o crescimento das bactérias na presença dos RLs nas diferentes condições de pH e presença de solutos;
- Avaliar a inibição e erradicação de biofilmes bacterianos pela ação de RLs, RL- NaCl e RL- sacarose;
- Determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC), tamanho e distribuição de agregados moleculares de RL formados nas diferentes condições testadas;
- Visualizar os agregados de RLs formados por microscopia de fluorescência;
- Verificar a interação das células bacterianas com os agregados de RLs por microscopia confocal.



### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) – Desafios que ainda persistem

Contaminações por DTHA podem se iniciar em qualquer estágio da cadeia de produção, distribuição, até o consumo dos alimentos, tendo como origem diversos tipos de contaminação ambiental, como poluição de águas, solo, ar, assim como armazenamento e processamento incorretos. (3)

Infecções causadas pela ingestão de alimentos contaminados são de grande importância para a saúde pública global, uma vez que apresentam potencial para evoluir para infecções generalizadas, o que pode acarretar mortes prematuras além de gerar alto impacto econômico para as indústrias de alimentos. (22,23) Os sintomas mais comuns de DTHA são gastrointestinais, embora também possam conduzir problemas neurológicos, ginecológicos e imunológicos. Casos mais severos tendem a ocorrer em idosos e crianças menores de 5 anos, em pessoas com sistema imune comprometido, e em gestantes. (6) Segundo dados da OMS, cerca de 33 milhões de pessoas morrem por ano devido as DTHA no mundo. (3) No Brasil entre os anos 2019 e 2021 foram registrados 1.331 surtos, os quais acometeram 37.065 pessoas, das quais 18.571 adoeceram e 17 morreram. (24)

Nas últimas décadas, departamentos de saúde vêm intensificando a aplicação e regulamentação de normas relacionadas à segurança alimentar, desde a produção até a distribuição dos alimentos ao redor do mundo, incluindo a *United States Environmental Protection Agency* (EPA), a qual publicou diversos guias de prevenção contra DTHA. Apesar dos esforços, continuam-se observando altas taxas de surtos caracterizados pela ocorrência de dois ou mais casos similares resultantes da ingestão de um alimento em comum. (1,6)

Alguns fatores que contribuem para a ocorrência de DTHA são, a produção em larga escala e ampla distribuição dos alimentos, globalização de suplementos alimentares, crescimento populacional, alimentação fora de casa, higiene precária, emergência de novos patógenos e mutações, e o aumento da resistência bacteriana à antimicrobianos convencionais. (1,14)

Os patógenos de origem alimentar, como vírus, parasitas e bactérias são considerados agentes biológicos que podem causar DTHA. Estas podem ocorrer

quando um desses patógenos é ingerido por meio do alimento, se estabelece e se multiplica no organismo hospedeiro, ou quando o alimento ingerido contém toxinas produzidas por esses microrganismos. Casos de infecções, envolvem mais tempo entre a ingestão do alimento e o aparecimento dos sintomas, uma vez que é necessário um período de incubação do microrganismo. (6)

Bactérias são a causa mais comum de DTHA e devido à grande variabilidade, sua erradicação na indústria de alimentos é dificultada. Dentre as espécies comumente envolvidas em casos de DTHA destacam-se *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, e *Staphylococcus aureus*. (6)

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa que compreende um diverso grupo de linhagens, algumas são inofensivas, constituintes normais da microbiota humana, não apresentando riscos à saúde, outras podem adquirir fatores de virulência possibilitando a invasão e infecção em humanos e outros animais. (25) Além disso, algumas linhagens podem produzir toxinas, o que as torna patogênicas para os seres humanos. As variantes patogênicas de *E. coli* estão relacionadas principalmente com doenças do trato gastrointestinal, e apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo uma das principais fontes de preocupação para a saúde pública, uma vez que uma população pequena do microrganismo pode causar infecções. (26) No Brasil, segundo a norma nº 60 de 23 de dezembro de 2019 publicada pelo ministério da saúde em conjunto com a agência nacional de vigilância sanitária, o padrão microbiológico aceitável para *E. coli* é de 10 UFC/g em carnes bovinas, suínas e outras. (27)

*E. coli* é uma das principais causas de DTHA ao redor do mundo, afetando todas as faixas etárias, em países desenvolvidos e em países subdesenvolvidos. (25) Dados do Ministério da saúde, apontam que 35,7% dos casos de DTHA reportados entre os anos 2016 e 2019 no Brasil foram causados por *E. coli*. (24) Causas da doença podem estar relacionadas com um saneamento básico precário, assim com a ocorrência de contaminações cruzadas ao longo da cadeia produtiva dos alimentos, sendo mencionados casos de contaminação mais frequentes em leite, queijos e carnes. (4,25)

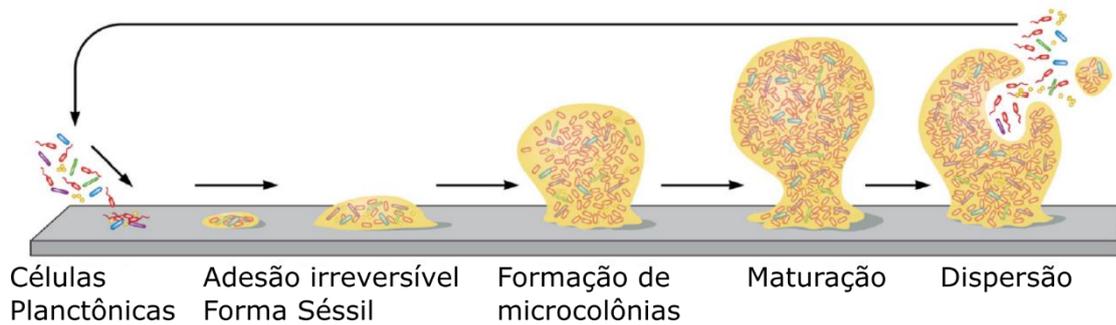
*L. monocytogenes* é o patógeno de maior importância de alimentos, é uma bactéria Gram-positiva, e além de estar relacionada com grande parte dos casos de contaminação por alimentos apresenta elevada taxa de mortalidade por DTHA. Esta bactéria tem sido isolada de alimentos de origem animal e vegetal, crus e

processados, sendo carne e derivados de leite os mais comuns; e sua ocorrência em alimentos prontos para o consumo tem alertado o setor alimentício. (28,29) A EFSA (*European Food Safety Authority*) apontou risco de contaminação por *L. monocytogenes* em frutas e vegetais congelados, podendo atingir um nível insatisfatório (100 UFC/g) de contaminação no alimento após 48 horas de estocagem. (28)

*L. monocytogenes* pode sobreviver em ampla faixa de temperatura (0-45 °C), concentração salina (10%), e pH (4,4-9,4), além de ser capaz de se aderir à diferentes tipos de superfícies, o que a torna um patógeno difícil de eliminar. É capaz de se multiplicar em ambientes frios, como geladeiras, e em tubulações, e uma vez que a bactéria se instala em uma indústria, pode permanecer no ambiente por anos, vindo a contaminar os produtos alimentícios ali produzidos. Ademais, essa espécie é responsável por ocasionar uma doença conhecida como Listeriose, causada pela ingestão de alimentos contaminados. Apesar de ser uma doença rara, (0,1 a 10 casos por milhão), apresenta alta taxa de mortalidade (20-30%). (28–30) Além disso, foram encontradas linhagens de *L. monocytogenes* resistentes à tratamentos antimicrobianos convencionais, como penicilina, tetraciclina, oxacilina, e clindamicina, e sua presença em alimentos representa um problema para saúde pública e economia. (28)

Infecções causadas por bactérias podem ainda ser agravadas pelo fato de que a maioria destes patógenos são capazes de formar biofilmes. Biofilmes são caracterizados por um grupo ordenado de microrganismos vivendo em comunidade, envoltos por uma matriz extracelular polimérica. A formação do biofilme ocorre em várias etapas, que envolvem a transição da bactéria de sua forma livre, planctônica, para a forma séssil. O processo de formação do biofilme pode ser influenciado por condições externas, como pH, força iônica e temperatura. Durante a fase inicial, os microrganismos se ligam fracamente e de forma reversível às superfícies. As células aderidas passam então a se multiplicar e a se agregar formando micro colônias. A formação da matriz extracelular auxilia na maturação do biofilme, estabilizando a estrutura e mantendo as células agregadas. Um biofilme maduro pode ser composto por três camadas, no qual a camada externa contém células planctônicas prontas para sair do biofilme, deste modo, pode ocorrer uma nova dispersão dos microrganismos iniciando um novo ciclo (Figura 1). (31)

Figura 1: Etapas de desenvolvimento e formação de biofilmes bacterianos.



Fonte: Adaptado de Chatzipanagiotou *et al.* (32)

O estilo de vida do biofilme resulta em características diferentes daquelas da existência planctônica, como alterações na taxa de crescimento e atividade metabólica, o que fornece à bactéria propriedades que permitem sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis, facilitando o bloqueio ou prevenção do acesso de agentes bactericidas em sua estrutura interna, proteção contra as próprias defesas do hospedeiro, além do aumento da resistência a agentes antimicrobianos. A matriz polimérica produzida pelas bactérias atua como uma barreira, o que facilita o espalhamento de infecções. (14,31,32)

Nutrientes advindos de resíduos de alimentos combinados com condições ambientais favoráveis, aumentam as chances de crescimento de microrganismos em superfícies. (16) Os biofilmes bacterianos são capazes de se desenvolver em diferentes tipos de materiais e superfícies, e uma vez aderidos, podem contaminar os produtos alimentícios que entrem em contato (contaminação cruzada), apresentando resistência à agentes sanitizantes, o que tende a dificultar o processo de erradicação da contaminação na indústria. (7,28)

Os veículos alimentares implicados em DTHA são em sua maioria de origem animal, em particular ovos e carne de porco, carne de frango, queijo, peixes e produtos à base de peixes, leite e derivados, carne bovina e crustáceos (33). Para preservar os alimentos de contaminações por microrganismos, indústrias alimentícias fazem o uso de diversos processos, incluindo pasteurização, refrigeração, redução de O<sub>2</sub> por meio de embalagens a vácuo, adição de conservantes, entre outros. (1)

Com relação à adição de conservantes, tem-se investido cada vez mais em compostos de origem natural, o que tem se refletido na tendência de substituição dos surfactantes sintéticos por biosurfactantes (BS). (9)

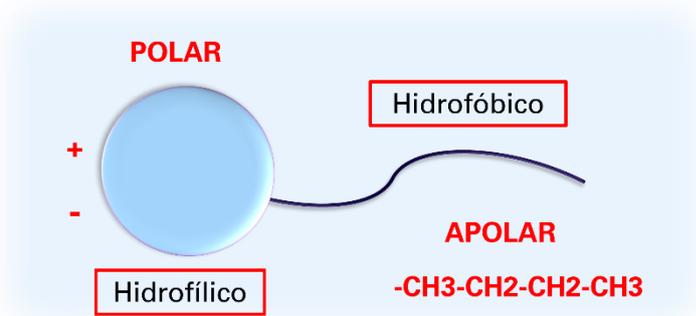
## **3.2 Agentes tensoativos**

### **3.2.1 Surfactantes**

O primeiro relato da presença de surfactantes no mundo foi registrado em vestígios de sabão observados em um sítio arqueológico da Babilônia na Mesopotâmia em 2800 ac. A partir desta data, os surfactantes têm sido utilizados em uma ampla gama de aplicações, em especial para formulações de produtos de limpeza e higiene pessoal, contribuindo para o desenvolvimento da civilização humana, atingindo marcas de produção em torno de 20 milhões de toneladas ao ano. (19,34)

A palavra “surfactante” é uma contração da expressão “agente de superfície ativa”, indicando que os surfactantes agem na superfície ou entre interfaces, mais especificamente, apresentam propriedades tensoativas, atuando na redução da tensão superficial e tensão interfacial. Este comportamento é observado devido a sua estrutura molecular anfifílica, a qual é definida desta forma por conter ao menos um domínio hidrofílico e um domínio hidrofóbico. (9,19) Geralmente são compostos orgânicos, e como apresentam uma região apolar, muitas vezes composta por hidrocarbonetos, e uma região polar, ou iônica, pode-se considerar que serão solúveis em ambos, solventes aquosos e orgânicos. (35) Ademais, esses compostos podem auxiliar na solubilização de moléculas hidrofóbicas em meios aquosos por meio da formação de emulsões. (10) Frequentemente são representados conforme a Figura 2, apresentando uma “cabeça” polar e uma “cauda” apolar.

Figura 2: Representação esquemática de um surfactante genérico, contendo domínio hidrofóbico, cauda apolar, geralmente composto por hidrocarbonetos, e domínio hidrofílico, cabeça polar, a qual pode ser iônica.



Fonte: do autor.

A depender das características do seu grupo hidrofílico, os surfactantes podem ser classificados em quatro tipos: surfactantes catiônicos, que apresentam grupos com carga efetiva positiva, surfactantes aniônicos, com carga efetiva negativa, surfactantes zwitteriônicos, que apresentam tanto carga positiva quanto carga negativa e surfactantes não iônicos, os quais não possuem cargas efetivas. (36)

Moléculas anfifílicas no geral, e em particular alguns surfactantes, estão presentes na natureza, em organismos vivos, atuando em sistemas biológicos, como é o caso dos sais biliares, importantes para a solubilização de moléculas hidrofóbicas durante a digestão, surfactantes pulmonares, que reduzem a tensão superficial entre o ar e líquidos no pulmão, e os fosfolípidos, que constituem a membrana externa das células, sendo estes apenas alguns exemplos de moléculas anfifílicas naturais. (19)

Atualmente, o uso comum de surfactantes pode trazer uma falsa sensação de segurança, porém é necessário redobrar a atenção, principalmente quando se trata de ambientes aquosos, uma vez que os surfactantes exibem considerada toxicidade para organismos aquáticos, além de apresentarem certa toxicidade em humanos, sendo relacionados com questões dermatológicas, como reações alérgicas e irritações na pele. (37) Além disso, os surfactantes utilizados industrialmente, são obtidos majoritariamente de recursos petroquímicos, e como sua produção parte de meios muitas vezes não renováveis, ela tem sido associada com processos poluentes. (8,19)

Desta forma, buscas por compostos tensoativos não tóxicos e obtidos de recursos renováveis vêm sendo cada vez mais importantes para a substituição dos surfactantes sintéticos.

### **3.2.2 Biosurfactantes**

A definição de biosurfactantes é aplicada para moléculas que exibem propriedades tensoativas, atuam na redução da tensão superficial e tensão interfacial, obtidas a partir de seres vivos. Esse campo se divide em duas abordagens diferentes de produção. Na primeira, tem-se ainda uma abordagem química, na qual moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas de origem biológica são quimicamente ligadas. O segundo método de abordagem corresponde à biológica, no qual os BS são extraídos de plantas, produzidos por biocatálise, utilizando-se enzimas, ou obtidos a partir de microrganismos. (19,38)

Uma projeção do mercado de surfactantes, aponta para um faturamento de 66,4 bilhões de dólares em 2025, destes, apenas 4% são obtidos de biomassas, ou seja, não contém carbono de origem fóssil. (19) Já o mercado de BS aponta para um valor bem menor, de aproximadamente 2520 milhões de dólares. (39) Fatores econômicos limitantes para a produção de BS tem sido relacionados com altos custos dos substratos, porém estudos apontam para o uso de resíduos da indústria de refinaria de petróleo, glicerol, óleos vegetais, resíduos de óleo de fritura e águas residuais de mandioca, para redução do investimento inicial. (40) Outras estratégias que podem tornar a produção de BS mais atrativa economicamente, dizem respeito ao melhoramento genético de linhagens, de modo a torná-las superprodutivas, além de se investir na obtenção simultânea de BS e outras biomoléculas, como enzimas, ou bioplásticos. (41)

O interesse na produção de BS começou em 1980 e tem crescido a cada ano, principalmente por serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade comparados aos surfactantes sintéticos, o que os torna mais compatíveis com o meio ambiente. Além disso, são estáveis em condições extremas de pH, temperatura e concentração salina e exibem atividade biológica. (9,11,42)

Para obtenção de BS microbianos, geralmente é necessário utilizar um meio de cultura rico em açúcar além do acréscimo de algum tipo de óleo vegetal, para que o microrganismo cresça em um substrato com certa hidrofobicidade. A fonte de

carbono influencia diretamente na produção dos BS, podendo alterar o tipo de molécula obtida, quantidade e qualidade do produto. Os BS são obtidos majoritariamente como metabólitos secundários, geralmente produzidos em superfícies de células microbianas ou excretados para o meio extracelular. (42) Sabe-se que os BS desempenham papéis importantes para os microrganismos que os produzem, principalmente devido ao acesso à substratos hidrofóbicos por meio de sua solubilização. Ademais, os BS podem atuar como auxiliares de motilidade, participando no processo de adesão e liberação de superfícies, o que contribui para a colonização e estabilização de biofilmes bacterianos, além de apresentarem ação antimicrobiana, o que contribui para a inibição do crescimento de microrganismos de outras espécies. Ainda, as moléculas de BS produzidas podem atuar como fonte de carbono e energia. (43)

Os BS podem ser utilizados como aditivos na indústria farmacêutica, para produção de cosméticos, na biorremediação de poluentes e na indústria de alimentos. (9) Nesta última, eles podem ser inseridos de duas maneiras: utilização indireta para o tratamento e limpeza de superfícies que entrarão em contato com o alimento, e uso direto como aditivos ou ingredientes. (44) Como agentes de limpeza, os BS são excelentes aliados para a desinfecção de superfícies e eliminação de possíveis contaminações microbianas, atuando contra bactérias na forma planctônica, e em biofilmes, impedindo a adesão de células, além de atuarem em biofilmes estabelecidos. De acordo com a EFSA, aditivos alimentares são substâncias adicionadas ao alimento intencionalmente para realizar determinada função. Podem ser caracterizados como conservantes, aditivos nutricionais, agentes aromatizantes, agentes de coloração, agentes de texturização, entre outros. As principais aplicações dos BS na indústria de alimentos são como conservantes, agindo como agentes antimicrobianos e antioxidantes, aumentando o tempo de prateleira dos alimentos, além de atuarem como emulsificantes, estabilizando emulsões e melhorando a consistência e textura principalmente de massas. (41)

Apesar da ampla gama de aplicações, os BS ainda não são utilizados em larga escala no processamento de alimentos, e isto se deve provavelmente aos processos regulatórios requeridos para a aprovação de novos ingredientes alimentícios, exigidos por agências governamentais. Além disso, para o uso em alimentos, apenas BS obtidos de *Lactobacillus* ou leveduras tendem a ser aceitos, devido à maior segurança agregada à baixa patogenicidade destes gêneros. No entanto, um número crescente

de patentes tem sido emitido para BS reivindicando seu uso como aditivos para alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. (45)

Os BS exibem em sua maioria, uma variedade de estruturas químicas, o que leva a ampla gama de propriedades observadas. A classificação dos BS microbianos leva em consideração essa diversidade de estruturas, propriedades exibidas e origem, além da carga. As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e particulados. A maioria dos BS são neutros ou aniônicos, o domínio hidrofóbico geralmente é composto por ácidos graxos de cadeia longa e o domínio hidrofílico pode ser formado por carboidratos, aminoácidos, fosfatos, entre outros. (46,47)

Os glicolipídeos são a classe de BS mais comumente isolados e estudados. (9) São considerados BS de baixo peso molecular, geralmente são mais efetivos na redução da tensão superficial e interfacial, e podem ser sintetizados a partir de resíduos industriais, principalmente resíduos de óleos de cozinha. (43,48) A estrutura dos glicolipídeos é composta por carboidratos em combinação com ácidos graxos de cadeia longa. A molécula geral varia de acordo com a natureza do carboidrato e das frações lipídicas sendo divididos em ramnolipídeos, lipídeos de trealose, lipídeos de manosileritritol (MELs), lipídeos de celobiose e soforolipídeos. (49)

### 3.2.2.1 Ramnolipídeos

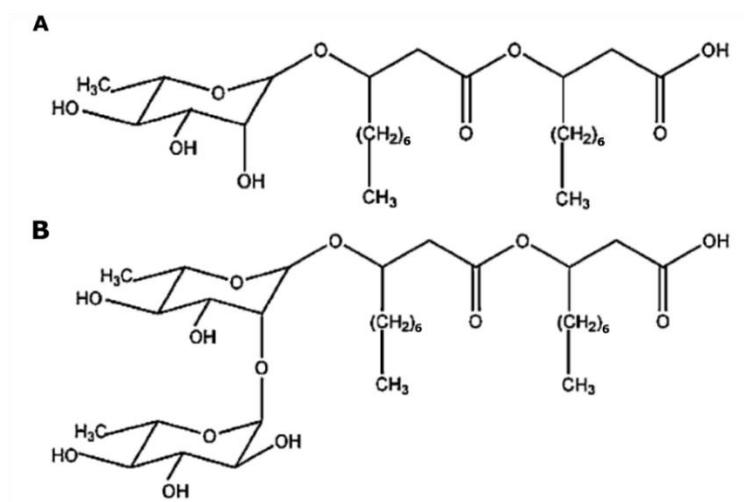
Ramnolipídeos (RLs) são BS de caráter aniônico, que apresentam alta afinidade por moléculas hidrofóbicas. São pertencentes à classe dos glicolipídeos, e podem ser obtidos de diferentes espécies de bactérias. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é considerada a produtora primária de RLs, uma vez que a maioria dos homólogos descobertos até o momento foram obtidos a partir deste microrganismo. Porém, especialmente nos últimos anos, foram descobertas outras espécies de bactérias capazes de produzir RLs, como *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* entre outras. (50,51)

Os RLs são sintetizados como uma mistura de homólogos, majoritariamente composta por mono-ramnolipídeos, que contém uma unidade de ramnose ligada a duas moléculas do ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico, e di-ramnolipídeos, nos quais duas unidades de ramnose são ligadas a duas moléculas do ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico (Figura 3). (9,51) Uma variedade de estruturas tem sido encontradas em relação ao

comprimento da cadeia carbônica do domínio hidrofóbico, além da presença de insaturações, e de alguns grupos funcionais, no entanto essas variantes são identificadas em menor quantidade em misturas de RLs. (48,51)

Bergström e colaboradores descobriram os RLs em 1946, quando reportaram a produção de um glicolípido oleoso, obtido da bactéria *P. aeruginosa*, cultivada em glicose. A partir deste, aproximadamente 60 homólogos ou congêneres de ramnolípideos foram descobertos em diferentes espécies de *Pseudomonas* e outras bactérias, até o ano de 2010. (50) E mais recentemente entre 2010 e 2017, um adicional de 53 novos homólogos também foram caracterizados. (52)

Figura 3: Estrutura química dos principais homólogos dos ramnolípideos. (A) Mono-ramnolípideo Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> e (B) di-ramnolípideo Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>.



Fonte: Adaptado de Pornsunthorntawe; Chavadej; Rujiravanit. (53)

Estruturalmente, os RLs fazem parte de um grupo bastante diverso de BS, o que possibilita uma ampla gama de propriedades, além disso, a presença de diferentes homólogos tende a aumentar sua especificidade. São agentes tensoativos capazes de reduzir a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores em torno de 30 mN/m, e a tensão interfacial entre água e óleo para valores abaixo de 1 mN/m. (54) Além disso, são capazes de manter suas propriedades físico-químicas, mesmo em condições extremas de pH e concentração de eletrólitos. Piróllo, *et al.* (55), demonstraram estabilidade dos RLs em uma ampla faixa de pH (entre 5,0 e 10,0) e em concentração de NaCl entre 3 e 5% (m/v). Além disso, de acordo com a EPA, os

ramnolípídeos são considerados seguros para uso no controle de fungos em culturas agrícolas. (56) Estas propriedades fazem dos RLs potenciais alvos de interesse para indústrias, como farmacêuticas e de cosméticos, para agricultura, biorremediação de poluentes, e no segmento de alimentos. (18,57)

### **3.2.3 A formação de micelas**

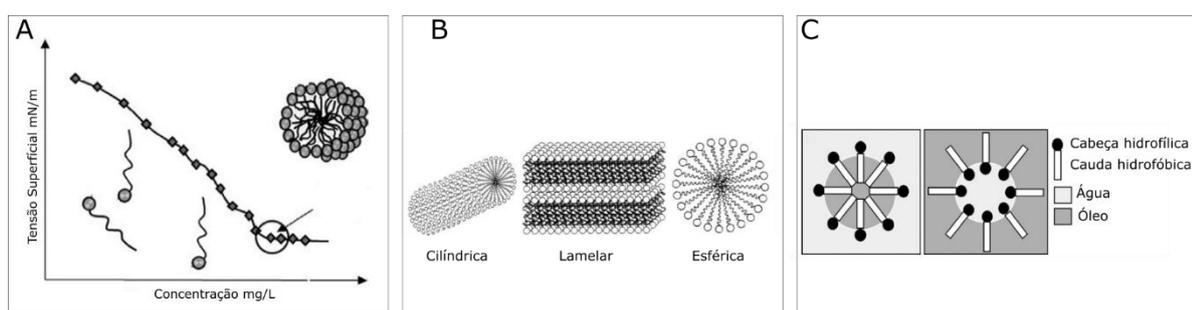
Assim como os surfactantes, os BS quando em baixa concentração em solução aquosa existem como monômeros. Esses monômeros empacotam juntos na interface, formando uma monocamada, onde contribuem para a redução da tensão superficial e interfacial. Conforme a concentração de BS aumenta, a área disponível na superfície para adsorção diminui e os monômeros começam a se acumular. No entanto, a cauda hidrofóbica das moléculas do BS tem solubilidade extremamente baixa em água e a cabeça hidrofílica têm solubilidade extremamente pequena em solventes apolares. Conseqüentemente, acima de determinada concentração o efeito hidrofóbico irá conduzir os monômeros para formar agregados de forma a minimizar, tanto quanto possível, o contato entre seus grupos hidrofóbicos e a água. Esses agregados podem existir em equilíbrio com os monômeros dos BS. (58)

O processo de agregação é chamado de micelização e os agregados são conhecidos como micelas. As micelas começam a se formar de maneira distinta e frequentemente em concentração baixa conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC), na qual tem-se o predomínio de micelas em solução. Além disso, na CMC tem-se uma condição ótima para as propriedades tensoativas, uma vez que a monocamada de BS está completa. Abaixo da CMC, as moléculas do BS estão na forma monomérica e a tensão superficial reduz expressivamente com a adição de BS no meio (Figura 4A), o aumento na concentração do BS interfere diretamente na formação das micelas. (49,58)

Os BS são capazes de formar uma variedade de microestruturas em solução, como micelas com formatos esféricos, cilíndricos, vesículas esféricas ou irregulares, bicamadas tubulares e lamelas (Figura 4B). A morfologia destes agregados é afetada pela concentração do BS, pH, temperatura, concentração de eletrólitos no meio, polaridade, entre outros. Todas essas estruturas são dinâmicas, ou seja, moléculas de RLs estão em constante movimento, entrando e saindo da microestrutura em uma escala de tempo de microsegundos. A formação de agregados moleculares tende a

auxiliar a solubilização de compostos (Figura 4C). Em meios aquosos o domínio hidrofóbico permanecerá na parte interna do agregado, deste modo, a formação de micelas podem aumentar a solubilidade de compostos orgânicos favorecendo a formação de emulsões. (49,53,59)

Figura 4: O processo de micelização. (A) Tensão superficial em função da concentração do BS, (B) Estruturas típicas de micelas e (C) Micelas formadas em solventes aquosos e orgânicos.



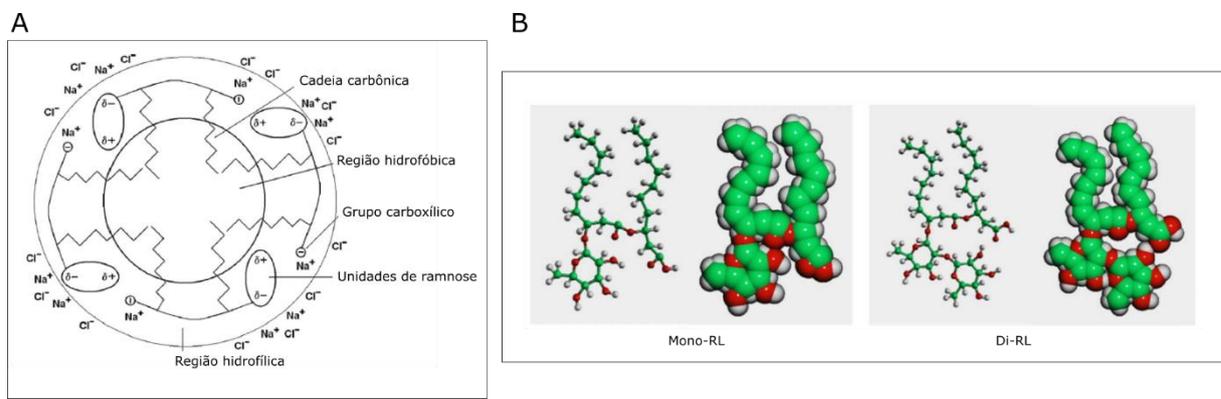
Fonte: (A e C) Adaptado de Ribeiro; Guerra; Sarubbo,(49) e (B) Adaptado de Farn. (58)

A estrutura molecular dos RLs é um dos principais fatores que podem alterar a CMC. Algumas condições relacionadas com a redução da CMC são, aumento no número de carbonos na porção hidrofóbica, e adição de eletrólitos como NaCl, e condições que levam ao aumento da CMC podem estar relacionadas com a presença de duplas ligações entre átomos de carbono, grupos polares na cauda hidrofóbica (O ou OH), aumento no pH de ácidos fracos, entre outros. (58) Misturas de RLs contendo maior quantidade de di-RL apresentaram valores de CMC menores do que aquelas contendo mais mono-RL. Ademais, RLs contendo ácidos graxos com cadeias insaturadas tendem a ter CMC maiores que os correspondentes com cadeias saturadas, também há relação entre a presença de cadeias carbônicas maiores e a redução dos valores de CMC. (53) A CMC dos RLs depende da estrutura das moléculas variando de 5 a 200 mg/L. (51,58)

Moléculas de RLs possuem grupos carboxílicos em sua porção hidrofóbica, o que as caracteriza como ácidos fracos, que a depender do valor de pH podem se apresentar na forma ionizada ou não. (60–62) A adição de eletrólitos no meio, pode reduzir repulsões eletrostáticas entre grupos ionizados dos RLs, o que pode favorecer a formação de agregados do BS mais organizados na interface (Figura 5A). (60,61,63) A adição de co-solutos, como a sacarose em soluções aquosas também pode interferir

na morfologia de agregados micelares de BS. Carboidratos apresentam caráter hidrofílico devido a presença de vários grupos hidroxila (-OH), os quais podem realizar ligações de hidrogênio com as moléculas do BS. (64) Além disso, de modo a reduzir a energia, o grupo carboxílico tende a ocupar uma posição lateral na molécula de RLs, conforme apresentado na Figura 5B.

Figura 5: Esquema de possíveis conformações para moléculas de RLs. (A) Formato assumido quando na conformação de micelas após adição de eletrólitos ao meio, como o NaCl e (B), Formato assumido por mono e di-RLs de modo a minimizar energia.



Fonte: (A) Adaptado de Lovaglio, *et al.* (9) e (B) Adaptado de Helvac, Peker e Özdemir. (63)

### 3.2.4 Ramnolípídeos como agentes antimicrobianos

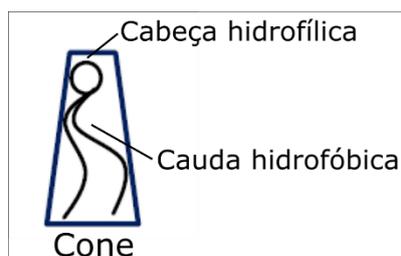
Muitos trabalhos na literatura vêm destacando as propriedades antimicrobianas dos RLs. Quando realizada uma busca na plataforma *Scopus, Elsevier*, utilizando-se as palavras-chave *rhamnolipid* e *antimicrobial*, foram encontrados 272 trabalhos publicados entre os anos 2000 e 2022. O primeiro trabalho que reporta a atividade antimicrobiana dos RLs remete ao ano de 1971, no qual Itoh, *et al.* (65), demonstraram a eficácia de dois tipos de RLs produzidos por *P. aeruginosa* contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Desde então, diferentes homólogos de RLs foram testados frente a amplo espectro de microrganismos, sendo a maioria dos estudos desenvolvidos sobre bactérias na forma planctônica. Alguns resultados relevantes envolvendo os RLs neste sentido estão apresentados no Quadro 1.

O mecanismo de ação dos RLs ainda não é completamente conhecido, porém, supõe-se que as membranas plasmáticas são os principais alvos de dano celular por

biossurfactantes. (66) Segundo Otzen, (67), a presença de diferentes homólogos de RLs, assim como adaptação do microrganismo ao ambiente também podem interferir na atividade antimicrobiana dos BS. Assim como, a atividade antimicrobiana dos BS também pode estar relacionada com a formação de agregados micelares (59,67), sendo estas dependentes do valor de pH e presença de eletrólitos no meio.

Estudos *in vitro* demonstraram que BS podem modular membranas fosfolipídicas. Ao interagir com a membrana, a molécula de RL pode assumir um formato semelhante a um cone, (Figura 6) permeabilizando a membrana em uma proporção RL:lipídeos praticamente de 1:1, o que provavelmente resultará em moderados defeitos na membrana, permitindo a passagem de pequenos solutos. (67)

Figura 6: Possível formato de cone, que a molécula de RL assume ao interagir com membrana fosfolipídica, modelo baseado em testes *in vitro*.



Fonte: Adaptado de Otzen. (67)

Existem diferenças na eficácia antimicrobiana dos RLs entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sotirova, *et al.* (66) demonstraram distinção nos níveis de uma proteína extracelular em cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas após contato com um BS. O mesmo efeito foi observado por Gaur, *et al.* (13) A causa da liberação de proteínas para o meio extracelular pode estar relacionada, em ambos os casos, com a permeabilização da membrana pelo BS, efeito este mais expressivo para as bactérias Gram-positivas testadas.

Quadro 1: Estudos *in vitro* utilizando RLs para o controle de microrganismos (anos 2000-2022).

Ramnolípídeo	Microrganismos	Forma de vida do microrganismo	Efeito	Procedimento experimental
RL comercial de (Jeneil Biosurfactant Co.)	<i>Salmonella enterica</i>	Biofilme	Inibição do crescimento do biofilme	(68)
RL Mistura (11 homólogos) de <i>P. aeruginosa</i> 47T2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Planctônica	CIM (Concentração Inibitória Mínima)	(69)
RL <sub>LBI</sub> (Mistura de 6 homólogos) de <i>P. aeruginosa</i> LBI	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>P. aeruginosa</i>	Planctônica	CIM	(54)
16 diferentes RL congêneres de <i>P. aeruginosa</i> L2-1	<i>Bacillus cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Planctônica	CIM	(70)
RL de <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella enteritidis</i>	Biofilme	Redução da adesão e rompimento do biofilme	(17)
RL comercial JBR599 (Jeneil Biosurfactant Co.)	<i>L. monocytogenes</i>	Planctônica	CIM	(18)
RL de <i>P. aeruginosa</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	Zoósporos e micélios	Lise dos zoósporos e inibição do crescimento de micélios	(71)
RL comercial (Urumqui Unite Bio-Technology Co.)	<i>P. aeruginosa</i>	Biofilme	Redução do biofilme	(72)
RL cadeia longa de <i>Burkholderia thailandensis</i> E264	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Neisseria mucosa</i> <i>Streptococcus oralis</i>	Biofilme	Ação antibiofilme	(73)
RL de <i>P. aeruginosa</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Suspensão de esporos	CIM	(20)

Continuação Quadro: 1: Estudos *in vitro* utilizando RLs para o controle de microrganismos (anos 2000-2022).

RL comercial (Rhamnolipid Incorporation- USA)	<i>S. aureus</i>	Biofilme	Redução da adesão e rompimento do biofilme	(16)
RL comercial (Rhamnolipid Incorporation- USA)	<i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>B. cereus</i>	Planctônica	CIM	(15)
RL de <i>Lactobacillus casei</i>	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>S. aureus</i>	Planctônica	CIM	(74)
RLs de <i>Planococcus rifietoensis</i> IITR53 e <i>Planococcus halotolerans</i> IITR55	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Planctônica	CIM	(13)
RL de <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	Biofilme	Ação antibiofilme	(75)
RL comercial (R90; Sigma-Aldrich)	<i>S. enterica</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	Planctônica e Biofilme	Atividade inibitória	(76)
RL comercial (AGAE Technologies)	<i>B. cereus</i>	Planctônica e endosporos	Atividade bactericida e inibição da germinação de endosporos	(77)
RL comercial (R90; AGAE Technologies)	<i>S. enteritidis</i> <i>E. coli</i> <i>Campylobacter ssp.</i>	Biofilme	Ação antiadesiva e antibiofilme	(78)

## 4. Material e métodos

### 4.1 Ramnolipídeos (RLs)

Utilizou-se o biossurfatante ramnolipídeo (RL) comercial (*Rhamnolipid Inc.* ®) em solução a 250000 mg/L (25%), contendo aproximadamente 54,4% RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e 24,2% Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> como componentes majoritários. Inicialmente, a solução foi diluída em água em uma razão 1:9, seguida de esterilização por filtração (0,22 µm). A partir desta realizou-se uma segunda diluição, em uma razão 1:4, em meio de cultura Caldo Soja Triptona acrescido de Extrato de Levedura (TSYEB – acumedia®) pH 7,3 ± 0,2 com e sem adição de NaCl (0, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% m/v) e sacarose (0, 5%, 10%, 25% e 50% m/v) em diferentes valores de pH (5,0, 6,0, 7,0 e 8,0), obtendo-se uma concentração final de 5000 mg/L para cada solução.

### 4.2 Microrganismos e preparação dos inóculos

As cepas bacterianas testadas são provenientes da coleção de culturas, *American Type Culture Collection* (ATCC) adquiridas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ), e pertencentes ao Grupo de Biotecnologia Microbiana da Universidade de São Paulo. Para realização dos ensaios foram utilizadas as linhagens de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Em cada ensaio, a bactéria foi transferida de sua cultura estoque (mantida a -20°C) para uma placa contendo o meio de cultura Ágar Soja Triptona acrescido de Extrato de Levedura (TSYEA - acumedia®) pH 7,3 ± 0,2. Realizou-se o cultivo em dois dias subsequentes, mantendo-se a incubação em estufa a 37°C ± 1 °C por 24 horas. Obteve-se colônias isoladas, as quais foram transferidas para o meio de cultura TSYEB.

O inóculo foi então padronizado por meio da utilização de um espectrofotômetro UV-vis (*Thermo Scientific, Genesys 10UV*), obtendo-se um valor de densidade óptica (D.O) de 0,10 ± 0,01 para *L. monocytogenes* e de 0,2 ± 0,01 para *E.coli* correspondente a aproximadamente 1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (Valores de D.O foram relacionados com a contagem do número de colônias para obtenção de 10<sup>8</sup> UFC/mL). Para realização dos testes antimicrobianos na forma planctônica, após ajuste de D.O,

a suspensão foi diluída em TSYEB obtendo-se uma população de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL, requerida para os inóculos iniciais.

#### **4.3 Determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)**

Para determinação da CIM e CBM foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, estabelecida pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). (79)

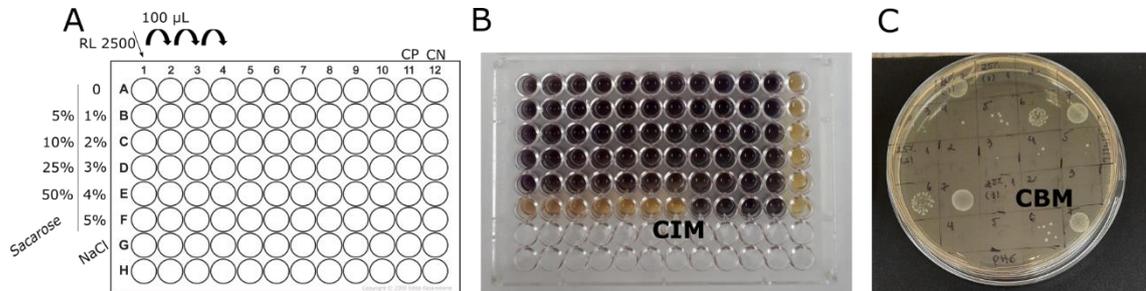
Utilizou-se o meio de cultura TSYEB, acrescido de diferentes concentrações de NaCl (0, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% m/v) e sacarose (0, 5%, 10%, 25% e 50% m/v). Ajustou-se o pH de cada solução, separadamente, para os valores 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0  $\pm$  0,1 utilizando-se as soluções de HCl 1,63 mol/L e NaOH 0,5 mol/L quando necessário. A esterilização ocorreu por meio de filtração (0,22  $\mu$ m).

A montagem do experimento deu-se em microplacas de 96 orifícios (Figura 7A), as quais foram separadas por valores de pH específicos. Adicionou-se 100  $\mu$ L do meio de cultura TSYEB nas diferentes concentrações de NaCl e sacarose, em linhas distintas da microplaca, seguiu-se com a adição de 100  $\mu$ L da solução de RLS (preparada como em 4.1) nos poços das primeiras colunas de cada linha da microplaca.

Com o intuito de se realizar a diluição seriada dos RLS, transferiu-se 100  $\mu$ L da primeira coluna para a segunda, e assim sucessivamente até a décima coluna. Em seguida, adicionou-se 20  $\mu$ L dos inóculos (preparados como em 4.2) às colunas 1-11, mantendo-se a 11ª coluna como controle positivo (CP). A 12ª coluna foi designada como controle negativo (CN) e após 24 horas de incubação a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano aparente foi designada como sendo a CIM. Para melhor visualizar o valor da CIM, adicionou-se em cada poço 20  $\mu$ L de uma solução de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* 98%- Sigma®) 1 mg/mL, observando-se o resultado após uma hora (Figura 7B).

Para determinar o valor da CBM, retirou-se o conteúdo de cada poço onde não havia crescimento bacteriano aparente no teste de CIM (100  $\mu$ L), e transferiu-se para placas contendo o meio de cultura TSYEA (Figura 7C). As placas foram incubadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , e o valor de CBM foi designado como a menor concentração de RLS, que após o período de incubação, não apresentou crescimento microbiano.

Figura 7: Ensaio para determinação dos valores de CIM e CBM. (A) Esquema para montagem da microplaca de 96 orifícios, (B) Exemplo de microplaca após acréscimo de MTT e (C) Exemplo de placa após ensaio para verificação de CBM.



Fonte: do autor.

#### 4.4 Curva de crescimento bacteriano

De modo a validar os valores de CIM e CBM, analisou-se o crescimento microbiano com as concentrações estabelecidas para os RLs, RL-NaCl e RL-sacarose, frente a *L. monocytogenes* (ATCC 19112). Realizou-se também, curvas de crescimento para as duas linhagens testadas utilizando-se uma concentração fixa de RLs de 300 mg/L em meio TSYEB acrescido de 0 e 5% de NaCl (m/v), e na concentração de 650 mg/L de RLs em 0 e 50% de sacarose (m/v) frente a bactéria Gram-positiva, em pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0  $\pm$  0,1 (ajustado com em 4.3). Adicionou-se 200 µL da suspensão bacteriana padronizada como em 4.2 em microtubos contendo 1 mL de cada solução a ser testada e incubou-se a 37°C  $\pm$  1 °C, mantendo-se um CP e um CN.

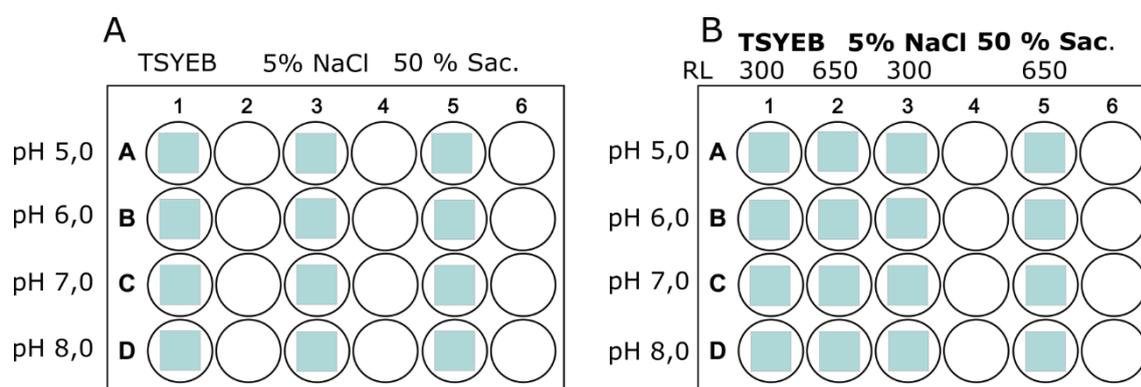
Para realizar o estudo cinético da ação antimicrobiana dos RLs, RL-NaCl, e RL-sacarose, escolheu-se os tempos de 2, 4, 8, 16 e 24 horas de incubação. Após cada período pré-estabelecido, retirou-se uma alíquota de 100 µL da amostra original transferindo-a para um microtubo contendo 900 µL de solução de NaCl 0,86% (m/v), segundo metodologia adaptada de Balouiri, *et al.* (80). Realizou-se então diluições seriadas e o número de células viáveis foi determinado pelo método da gota. (81)

#### 4.5 Atividade antimicrobiana em Biofilmes bacterianos

Para os testes em biofilmes bacterianos baseou-se na metodologia descrita por Passos, *et al.* (82) A linhagem de *L. monocytogenes* (ATCC 19112), foi selecionada para este ensaio uma vez que apresentou maior sensibilidade aos tratamentos com RLs na forma planctônica. Padronizou-se o inóculo como em 4.2, ajustando-se a D.O para  $0,40 \pm 0,01$ , valor correspondente a aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/mL, (Espectrofotômetro UV-vis *Thermo Scientific, Genesys 10UV*). Diluiu-se a suspensão em TSYEB acrescido de 0, 5% de NaCl e 50% de sacarose (m/v) em pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 (ajustados como em 4.3), obtendo-se uma concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL.

Os corpos de prova (poliestireno de 1 cm x 1 cm x 0,1 cm) foram higienizados em três etapas, primeiramente com detergente neutro, seguido de água destilada, e álcool etílico 70% v/v, mantendo-se cada solução em ultrassom (*Unique, UltraCleaner 1400A 50/60 Hz*) por 15 minutos. Posteriormente, foram esterilizados por radiação ultravioleta, permanecendo sob exposição por 20 minutos cada lado. Utilizou-se uma microplaca de 24 orifícios e adicionou-se 1 mL do inóculo bacteriano sobre os corpos de prova, incubando-se por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Figura 8A).

Figura 8: Esquema para montagem da microplaca de 24 orifícios para avaliação da atividade antimicrobiana de RLs em biofilmes. (A) Inóculo e (B) Tratamento com RLs.



Fonte: do autor.

Para avaliar a eficácia antibiofilme dos RLs, utilizou-se as concentrações de 300 mg/L de RLs em meio de cultura TSYEB acrescido de 0 e 5% m/v de NaCl, e de

650 mg/L em 0 e 50% m/v de sacarose, nos valores de pH a serem testados (Figura 8B). As concentrações de RLs escolhidas foram baseadas nos resultados dos testes antimicrobianos em células planctônicas. Após incubação do inóculo bacteriano, os corpos de prova foram lavados duas vezes com solução salina (NaCl 0,86% m/v) e transferidos para uma nova microplaca, seguido da adição de 1 mL das soluções de RLs em meio de cultura TSYEB. Decorridas 24 horas de incubação à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , os corpos de prova foram novamente lavados e transferidos para tubos contendo 2 mL de solução salina. Para desagregação do biofilme utilizou-se um ultrassom (*Unique, UltraCleaner 1400A 50/60 Hz*), por 15 minutos. Realizou-se diluições seriadas como em 4.4, e a quantificação das células viáveis pelo método da gota. (81)

#### **4.5.1 Microscopia confocal em biofilmes**

Amostras controle e tratamentos antibiofilme dos RLs (300 mg/L) e RL-NaCl (300 mg/L- 5%), em meio de cultura TSYEB, ajustado para pH 5,0 e 7,0, foram avaliadas após coloração fluorescente utilizando-se o kit de fluoróforos para viabilidade celular *live/dead*<sup>®</sup> (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*<sup>®</sup>). As imagens foram obtidas em microscópio Leica SP5, pertencente ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal – LMMC da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), FAPESP 2004/08868-0, e processadas pelo *software* (LAS AF).

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

Para observar a arquitetura de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em meio TSYEB contendo 50% de sacarose, em pH 5,0 e 7,0, e na presença dos RLs (650 mg/L) quando combinados com o açúcar, utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os ensaios foram realizados como em 4.5, em corpos de prova de poliestireno de 0,7 cm x 0,7 cm x 0,1 cm. Após os tratamentos, as amostras foram desidratadas gradualmente, por série crescente de álcool etílico (10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% v/v), permanecendo 15 minutos em cada solução. Em seguida, realizou-se recobrimento com ouro e as imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG *Japan Electron Optics Ltd. (JEOL), JSM 7200F*), pertencente a Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos.

#### 4.6 Determinação das concentrações inibitória mínima de biofilme e de erradicação mínima de biofilme (CIMB) e (CEMB)

Para a formação dos biofilmes de *L. monocytogenes* (ATCC 19112), utilizou-se microplacas de 96 orifícios do tipo *peg lid* (*Thermo Scientific*, Nunc-TSP), baseando-se na metodologia descrita por Harrison, *et al.* (83) Preparou-se o inóculo como em 4.2, na concentração de  $10^8$  UFC/mL em meio TSYEB, e inoculou-se a *peg lid* com 160  $\mu$ L, por quatro horas à  $37^\circ\text{C} \pm 1\text{C}^\circ$ . Em seguida, a transferiu para uma nova microplaca contendo 180  $\mu$ L do meio de cultura TSYEB acrescido de 0, 5% m/v de NaCl e 50% m/v de sacarose nos valores de pH ajustados para 5,0 e 7,0 como em 4.3, mantendo-se incubação sob agitação constante à 80 rpm (Tecnal, TE-420 Incubadora), à  $37^\circ\text{C} \pm 1\text{C}^\circ$ , por 24 horas. As condições testadas foram escolhidas baseando-se nos melhores resultados dos testes de atividade antimicrobiana anteriormente realizados.

Após o período de incubação, transferiu-se a *peg lid* para uma microplaca de tratamento, contendo uma diluição seriada dos RLs/pH, RL-5% NaCl/pH e RLs- 50% sacarose/pH, preparada como em 4.3 (200  $\mu$ L), e incubou-se à  $37^\circ\text{C} \pm 1\text{C}^\circ$ , por 24 horas. Para melhor visualização do valor de CIMB, após o período de incubação, adicionou-se 40  $\mu$ L do corante MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* 98%-Sigma<sup>®</sup>) 1 mg/mL na microplaca de tratamento. Lavou-se então a *peg lid* duas vezes (200  $\mu$ L), com solução de NaCl 0,86% m/v, e em seguida, a transferiu para uma microplaca de recuperação contendo meio de cultura TSYEB (200  $\mu$ L). Para desagregação do biofilme utilizou-se uma embalagem do tipo *zip lock*, mantendo-se a *peg lid* em ultrassom (Unique, UltraCleaner 1400A 50/60 Hz), por 10 minutos.

Para determinação de CEMB, inicialmente realizou-se uma diluição seriada, como em 4.4, de todos os poços da placa de recuperação, referentes à todas as concentrações de RLs que não apresentaram crescimento aparente no teste de CIMB, além dos controles positivos, e a quantificação de células viáveis ocorreu por meio do método da gota (81). Posteriormente, a *peg lid* foi mantida na microplaca de recuperação por 72 horas à  $37^\circ\text{C} \pm 1\text{C}^\circ$ , e o valor de CEMB foi designado como a menor concentração de RLs, que após o período de incubação, não apresentou crescimento microbiano. Para melhor visualização do valor de CEMB, utilizou-se o corante MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* 98%-Sigma<sup>®</sup>) 1 mg/mL.

#### 4.7 Concentração Micelar Crítica (CMC)

Trabalhou-se com uma solução aquosa de 300 mg/L de RLs, nas concentrações de 0, 1%, 2% e 5% (m/v) de NaCl e 0, 5%, 10%, 25% e 50% (m/v) de sacarose, em valores de pH ajustados para 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0  $\pm$  0,1, como descrito no item 4.3.

A concentração micelar crítica (CMC) de cada solução foi determinada em tensiômetro Sigma 700 (*Attension*, Finlândia). Foram realizadas medidas da tensão superficial (TS), pelo método do anel de Du Nouy (84), conforme adição do biossurfactante no meio pelo titulador automático, com um desvio padrão máximo entre as medidas menor ou igual a 0,10 mN/m. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da CMC por meio do *software Attension Sigma*.

#### 4.8 Avaliação dos agregados moleculares de RLs

Para a observação das estruturas micelares de RLs (1000 mg/L), baseou-se na metodologia descrita por Rodrigues, *et al.* (20) Utilizou-se o corante Vermelho Nilo (Sigma-Aldrich®) como fluoróforo, na mesma concentração da solução de RLs, sendo ambos preparados em etanol. Misturou-se 700  $\mu$ L da solução de RLs e 1 $\mu$ L de vermelho Nilo, e a amostra foi centrifugada a 800 rpm, por 30 minutos, à temperatura ambiente 25°C, (Centrífuga *mini spin*, *Eppendorf AG*). Posteriormente, todo o etanol foi evaporado, garantindo-se a eliminação de corante em excesso.

##### 4.8.1 Microscopia de fluorescência

As amostras de RLs/vermelho Nilo, foram então dissolvidas em 100  $\mu$ L de solução aquosa contendo 0,5% de NaCl e 0,25% de Fosfato Dipotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) m/v, (componentes presentes na fórmula do meio de cultura TSYEB, adicionados de modo a proporcionar maior similaridade com os testes antimicrobianos), em valores de pH ajustados para 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0  $\pm$  0,1, como em 4.3, acrescidas de 0 e 5% m/v de NaCl, e 0 e 5% m/v de sacarose. A morfologia dos agregados de RLs foi imediatamente analisada por Microscopia de fluorescência (Labomed, iVu 7000, câmera acoplada Lx 500 Jenoptik, *Germany*), utilizando-se lâmina (sem sobreposição com lamínula), filtro de 535 nm, (verde) e objetiva de 40x. As imagens foram

adquiridas por meio do *software* ProgRes® CapturePro 2.10.0.1, Jenoptik *Optical Systems* GmbH.

Do mesmo modo, avaliou-se o comportamento dos agregados de RLs obtidos como em 4.8, na presença de células de *L. monocytogenes* (ATCC 19112). Preparou-se um inóculo como em 4.2, e após 24 horas de incubação a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , a cultura foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente  $25^{\circ}\text{C}$ , (Centrífuga *mini spin*, Eppendorf AG). Descartou-se o sobrenadante, e dissolveu-se a amostra em 1 mL de solução aquosa contendo NaCl e  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , (como descrito acima), em pH 5,0 e 7,0 (ajustado como em 4.3), na presença de 5% m/v de NaCl, e em pH 5,0 contendo 5% de sacarose m/v, (mantendo-se a concentração de  $10^8$  UFC/mL). Misturou-se as soluções, preparadas nas mesmas condições, em uma razão 1:1, e para obtenção das imagens utilizou-se o método da gota pendente, (85,86), em um equipamento (Olympus, BX60, câmera acoplada Olympus, DP74), com aumento de 1250x, e filtro de 535 nm (verde), sendo as imagens processadas pelo *software* (Olympus, *cellSens* 1.17).

#### **4.8.2 Microscopia confocal de agregados micelares**

Avaliou-se também a interação entre as micelas de RLs (como em 4.8), com as células de *L. monocytogenes* (ATCC 19112) por microscopia confocal. As amostras foram preparadas como em 4.8.1, em pH 5,0 e 7,0 na presença de 5% m/v de NaCl, e em seguida foram depositadas em placas para microscopia confocal. As imagens foram obtidas por meio do equipamento Microscópio Confocal Multiusuário do Instituto de Física de São Carlos, FAPESP 2009/54035-4 (Zeiss, LSM 780, invertido) e processadas pelo *software* ZEN v3.4 *blue edition*.

#### **4.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

Preparou-se as soluções de RLs, 300 mg/L, em água mili-Q contendo NaCl e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , como em 4.8.1, nas concentrações de 0 e 5% de NaCl (m/v), e 0 e 50% de sacarose, nos valores de pH 5,0, 6,0, 7,0 e  $8,0 \pm 0,1$ , ajustados como em 4.3. As amostras foram filtradas ( $0,45 \mu\text{m}$ ), e em seguida determinou-se o tamanho e distribuição das estruturas formadas por meio de um equipamento DLS (*Nano*

*Zetasizer, Malvern*) a 25 °C, ângulo de dispersão 173°. Metodologia adaptada de Rodrigues, *et al.* (20)

#### **4.10 Análise estatística**

Os valores de CIM e CBM, CIMB e CEMB, foram expressos como a moda de no mínimo três repetições independentes. Para os demais ensaios antimicrobianos também se realizou ao menos três repetições independentes, e os valores foram reportados como a média e seu respectivo erro padrão obtidos por meio do software *Origin 2020*.

No tocante às medidas de DLS, cada amostra foi realizada com ao menos 10 réplicas, em quatro momentos independentes, e os resultados foram obtidos por análise computacional utilizando-se o *software* do próprio equipamento.



## 5. Resultados e discussões

### 5.1 Concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)

#### 5.1.1 Efeito do NaCl

Em determinadas concentrações, o sal (NaCl) presente no meio é capaz de inibir o crescimento bacteriano de uma variedade de cepas, ademais, o valor de pH também é importante para o crescimento microbiano. (21,87) Como objetivou-se avaliar o efeito antimicrobiano da combinação RL/pH, RL-NaCl/pH, realizou-se previamente uma triagem de microrganismos para escolher linhagens de bactérias adequadas. Desta forma, foram determinadas como modelos de estudo, as cepas que melhor responderam às variações de pH e de concentração de NaCl no meio, levando também em consideração as diferenças entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Apêndice A). Selecionou-se então, as cepas de *E. coli* (ATCC 25923), como modelo de bactéria Gram-negativa (microrganismo se desenvolve em uma faixa de pH entre 4,3 e 9,0) e *L. monocytogenes* (ATCC 19112), como modelo de Gram-positiva (microrganismo se desenvolve em uma faixa de pH entre 4,4 e 9,4) . (6,88)

Analisando-se a Tabela 1, é possível notar uma relação entre o acréscimo de NaCl no meio de cultivo TSYEB e o aumento da atividade antimicrobiana dos RLs frente a *L. monocytogenes*, visível pela redução da CIM e principalmente CBM, sendo este comportamento mais evidente nos valores de pH neutro e alcalino, (7,0 e 8,0). Em pH 7,0, na ausência de sal, não se encontrou valor de CBM, sendo este considerado > 2500 mg/L, tal qual relatado por Magalhães e Nitschke (18), e mais expressivamente, em pH 8,0, foi encontrado valor de CBM (1250 mg/L) somente em meio contendo 5% de NaCl. Segundo Ferreira, *et al.* (15), os RLs tendem a apresentar maior eficácia em valores de pH ácidos, como no caso do pH 5,0, mesmo na ausência de solutos, o que corrobora os resultados obtidos.

Tabela 1: Efeito da variação de pH e concentração de NaCl na atividade antimicrobiana de RLs (mg/L) frente a *L. monocytogenes* (ATCC 19112).

		%NaCl											
		0		1%		2%		3%		4%		5%	
		CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**
pH	5,0	19,5	78,1	9,7	78,1	9,7	78,1	9,7	78,1	9,7	78,1	9,7	78,1
	6,0	39,0	>2500	39,0	>2500	19,5	312,5	19,5	312,5	19,5	312,5	19,5	156,2
	7,0	625,0	>2500	156,2	>2500	78,1	2500,0	78,1	625,0	39,0	312,5	39,0	156,2
	8,0	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	156,2	>2500	78,1	>2500	39,0	1250,0

\*CIM- Concentração Inibitória Mínima \*\*CBM- Concentração Bactericida Mínima.

Com os valores de CIM e CBM obtidos para *E. coli*, notou-se que a presença de NaCl no meio de cultura contribuiu significativamente para promover a inibição do crescimento bacteriano pelos RLs (Tabela 2). Tratamentos realizados sem adição de NaCl, não resultaram em inibição para nenhum dos valores de pH testados, sendo as CIM consideradas > 2500 mg/L nestas condições. Para os tratamentos contendo 5% de NaCl, observou-se inibição em todos os valores de pH. Ademais, em nenhum dos testes realizados encontrou-se valores de CBM, sendo a combinação RL-NaCl considerada bacteriostática para esta linhagem.

Tabela 2: Efeito da variação de pH e concentração de NaCl na atividade antimicrobiana de RLs (mg/L) frente a *E. coli* (ATCC 25922).

		%NaCl											
		0		1%		2%		3%		4%		5%	
		CIM*	CBM**										
pH	5,0	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	19,5	>2500	19,5	>2500
	6,0	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	39,0	>2500
	7,0	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	156,2	>2500
	8,0	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	156,2	>2500

\*CIM- Concentração Inibitória Mínima \*\*CBM- Concentração Bactericida Mínima.

### 5.1.2 Efeito da sacarose

Para os ensaios com sacarose, optou-se por trabalhar com as mesmas linhagens de microrganismos utilizadas nos testes com NaCl, e as concentrações (%m/v) de sacarose foram previamente avaliadas de modo a não interferir na inibição do crescimento dos microrganismos (Apêndice A).

De forma semelhante ao efeito do NaCl, a adição de sacarose ao meio de cultura contribuiu para uma maior eficácia bactericida dos RLs contra *L. monocytogenes* (Tabela 3), especialmente em pH 7,0 e 8,0, nos quais foi possível

encontrar valores de CBM somente na presença de 50% m/v de sacarose (625,0 mg/L e 1250,0 mg/L respectivamente). Em pH 5,0, observou-se o inverso, no qual a adição de 25% e 50% de sacarose ao meio resultou em um aumento no valor de CBM para a combinação RL-sacarose. Como os RLs isoladamente apresentaram maior eficácia bactericida em condições de pH ácido (pH 5,0), acredita-se que a adição de altas concentrações de sacarose altere a viscosidade do meio, e conseqüentemente diminua a mobilidade molecular, o que pode estar relacionado com a atividade antimicrobiana do BS neste valor de pH.

Tabela 3: Efeito da variação de pH e concentração de sacarose na atividade antimicrobiana de RLs (mg/L) frente a *L. monocytogenes* (ATCC 19112).

		%Sacarose									
		0		5%		10%		25%		50%	
		CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**
pH	5,0	19,5	78,1	19,5	78,1	19,5	78,1	19,5	312,5	19,5	625,0
	6,0	39,0	>2500	39,0	>2500	39,0	>2500	39,0	1250,0	39,0	625,0
	7,0	625,0	>2500	312,5	>2500	156,2	>2500	156,2	>2500	39,0	625,0
	8,0	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	78,1	1250,0

\*CIM- Concentração Inibitória Mínima \*\*CBM- Concentração Bactericida Mínima.

Nos testes realizados com *E. coli*, não se encontrou valores de CIM e CBM para os RLs, independentemente das concentrações de sacarose adicionadas (0-50% m/v) e dos valores de pH (5,0-8,0), sendo estas consideradas >2500 mg/L. Desta forma, dentro das condições testadas, para a bactéria Gram-negativa, a combinação RL-sacarose não resultou na inibição do crescimento do microrganismo. *E. coli* é uma espécie capaz de metabolizar glicose e frutose, assim como realizar a hidrólise da molécula de sacarose nos dois monossacarídeos, (89), o que pode ter reduzido a concentração de sacarose no meio, estando assim menos disponível para interagir com as moléculas do BS, conseqüentemente interferido na eficácia antimicrobiana dos RLs.

Ao se avaliar o comportamento dos dois microrganismos frente aos RLs, observou-se menores valores de CIM (RL, RL-NaCl e RL-sacarose) para *L. monocytogenes* comparado a *E. coli*, além de se observar valores de CBM somente para a bactéria Gram-positiva, a qual apresentou maior sensibilidade aos tratamentos com os RLs. Este resultado pode estar relacionado com as diferenças encontradas na composição e estrutura das paredes celulares de bactérias. Alguns trabalhos na literatura, apontam para uma menor influência dos RLs no crescimento de bactérias

Gram-negativas, assim como uma eficácia antimicrobiana mais pronunciada para cepas de bactérias Gram-positivas. (14,15,17,74) A menor sensibilidade aos tratamentos com BS apresentada por bactérias Gram-negativas pode ser atribuída à composição de sua parede celular, contendo apenas uma camada de peptidoglicano, além da membrana externa, a qual possui lipopolissacarídeos (LPS) que podem atuar como uma barreira de proteção para a célula, impedindo a aproximação das moléculas de RLs. Além disso, BS aniônicos podem sofrer repulsão eletrostática causada por moléculas carregadas negativamente presentes na membrana externa de Gram-negativas, o que dificulta a interação entre eles. (18,66)

## **5.2 Curva de crescimento bacteriano**

Para melhor evidenciar o efeito da presença de RLs sobre a população bacteriana, nas diferentes condições testadas, foram construídas curvas de crescimento.

### **5.2.1 Efeito do NaCl**

A Figura 9 representa o perfil de crescimento de *L. monocytogenes*, na presença de RLs nos valores de CIM e quando havia, os valores de CBM, definidos na Tabela 1, em diferentes pHs contendo 0 e 5% m/v de NaCl.

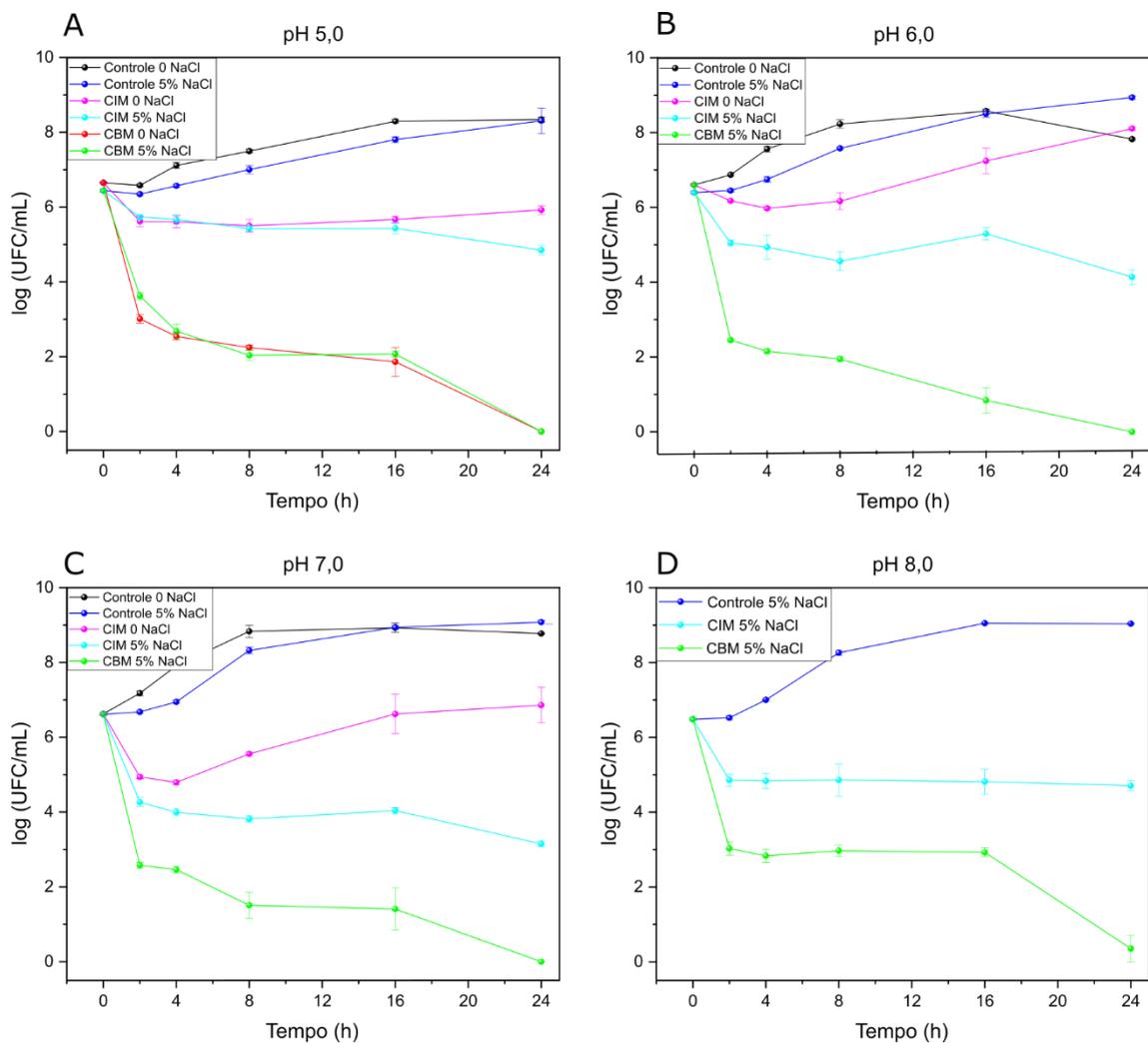
O comportamento dos microrganismos corroborou os resultados obtidos anteriormente, nos quais os valores de CIM acarretaram inibição do crescimento bacteriano, assim como os valores CBM foram responsáveis pela erradicação das células viáveis após 24 horas de tratamento, atingindo-se o limite de detecção da técnica (80 UFC/mL), e caracterizando a ação dos RLs como bactericida nestas condições.

Para o tratamento com os RLs na ausência do sal, encontrou-se valor de CBM apenas em pH 5,0, sendo este, o mesmo valor para a combinação RL-NaCl. Observando-se o perfil de crescimento para a linhagem de *L. monocytogenes* neste pH (Figura 9A), não foi possível notar diferença entre os tratamentos com sal e sem sal, sendo necessárias 24 horas de contato com o BS para eliminação da população bacteriana. Para as demais condições de pH testadas, (pH 6,0, 7,0 e 8,0) determinou-se os valores de CBM somente para a combinação RL- NaCl, os quais resultaram na

eliminação das células viáveis após 24 horas (Figuras 9B, C e D), demonstrando-se o aumento da eficácia antimicrobiana dos RLs quando na presença de 5% de NaCl.

Nos ensaios anteriores, observou-se que, para a *E. coli* não se encontrou valores de CBM dentro das condições testadas (Tabela 2), desta forma, optou-se por não se analisar as curvas de crescimento desta linhagem nesta etapa.

Figura 9: Curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de RLs (CIM-CBM), em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0.



Para melhor ilustrar as diferenças da eficácia antimicrobiana da combinação RL-NaCl nos valores de pH estudados, optou-se por manter uma concentração fixa do BS. Desta forma, seguiu-se com os demais experimentos aplicando-se 300 mg/L de RLs. A concentração de RLs escolhida foi ligeiramente extrapolada, se comparada

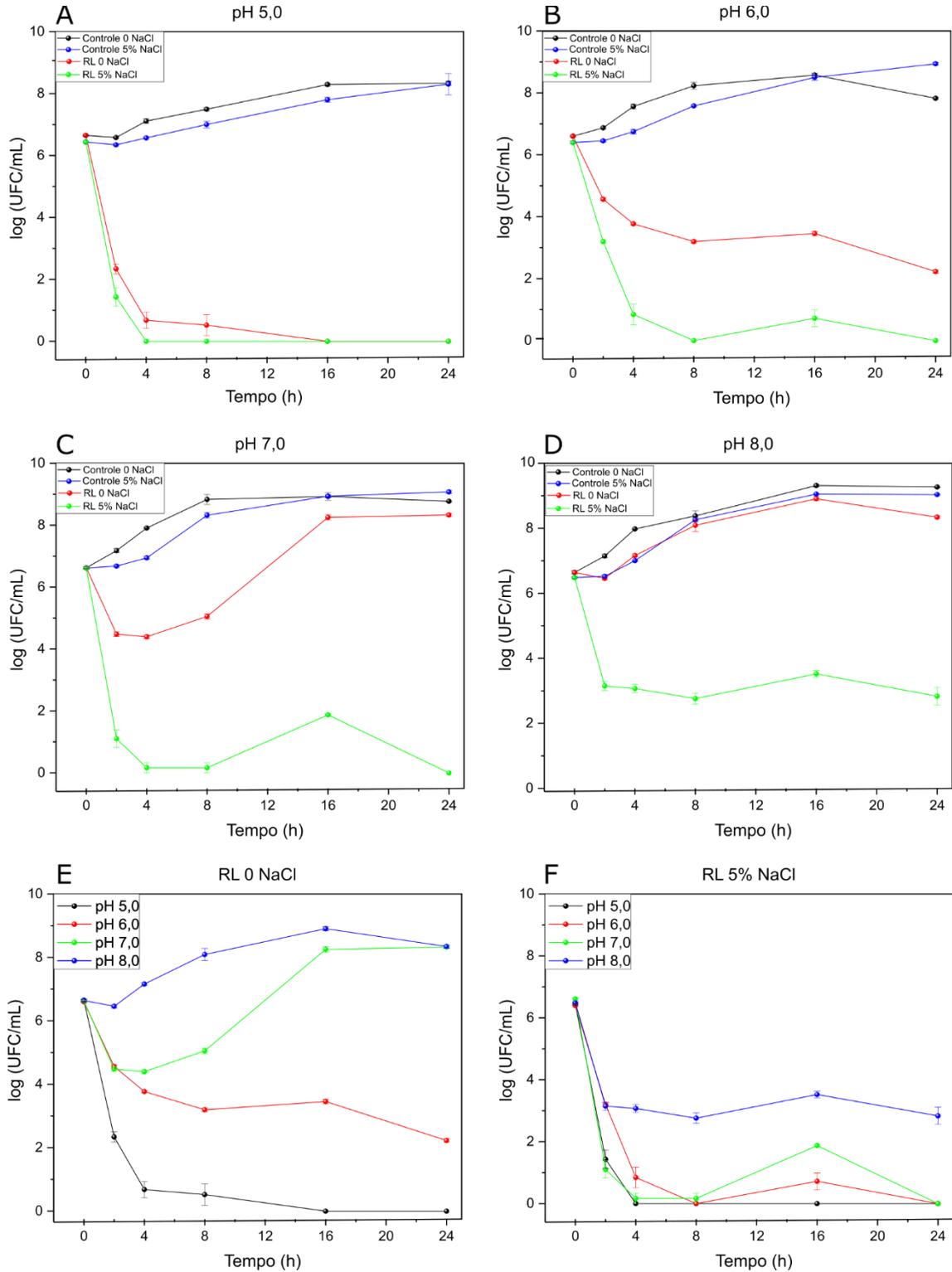
com a maioria dos resultados obtidos nos testes para determinação de CBM, com o intuito de se garantir melhor visualização do comportamento antibacteriano dos RLs. Além disso, analisando-se as Tabelas 1 e 2, observou-se que na presença de 5% de NaCl obteve-se os melhores resultados para a ação antimicrobiana dos RLs, deste modo realizou-se estes ensaios fixando-se esta concentração de sal.

Inicialmente, realizou-se o estudo do perfil de sobrevivência dos microrganismos testados frente aos RLs utilizando-se a concentração fixa de 300 mg/L, avaliando-se os valores de densidade óptica (D.O), pelo tempo (Apêndice B). Sabe-se que esta metodologia apresenta algumas limitações com relação a quantificação de células viáveis remanescentes após a aplicação dos tratamentos. Desta forma, optou-se por trabalhar com curvas de crescimento por meio de contagem do número de colônias (UFC/mL). (80,90)

Para *L. monocytogenes*, foi possível observar com mais clareza a relação da eficácia bactericida dos RLs e o valor de pH, sendo esta favorecida em condições ácidas. De fato, em pH 5,0, o tratamento com os RLs resultou na completa erradicação da população de células viáveis. Apesar de não ter sido observada diferença nos valores de CBM com relação à concentração salina neste valor de pH, utilizando-se 300 mg/L de RLs, reduziu-se o tempo de ação antimicrobiana de 16 para 4 horas na presença de 5% de NaCl (Figura 10A).

Com relação aos demais tratamentos, observou-se de forma mais evidente, a diferença entre as amostras mantidas em contato com RLs na presença de 5% de NaCl e na ausência deste. Em pH 6,0, e 7,0 após 24 horas de incubação, apenas a combinação RL-NaCl foi capaz de eliminar toda a população de células viáveis, (Figuras 10B e C). E para o pH 8,0 apesar de não se observar a erradicação total da população bacteriana, (concentração de RLs inferior ao valor de CBM para a combinação RL-NaCl neste valor de pH, 1250 mg/L), o tratamento com RLs e NaCl 5% resultou em uma redução de aproximadamente 6,4 logs quando comparados com o controle, sendo este valor de redução considerado como efeito bactericida segundo Konaté, *et al.* (91), (Figura 10D). Ainda, após 24 horas, para as amostras sem adição de NaCl, em ambos pH 7,0 e 8,0, observou-se valores de UFC/mL próximos as amostras controle mesmo após a aplicação dos RLs.

Figura 10: Curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs, em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, (D) pH 8,0, (E) RLs em meio TSYEB sem adição de NaCl e (F) RLs em meio TSEYB contendo 5% NaCl.



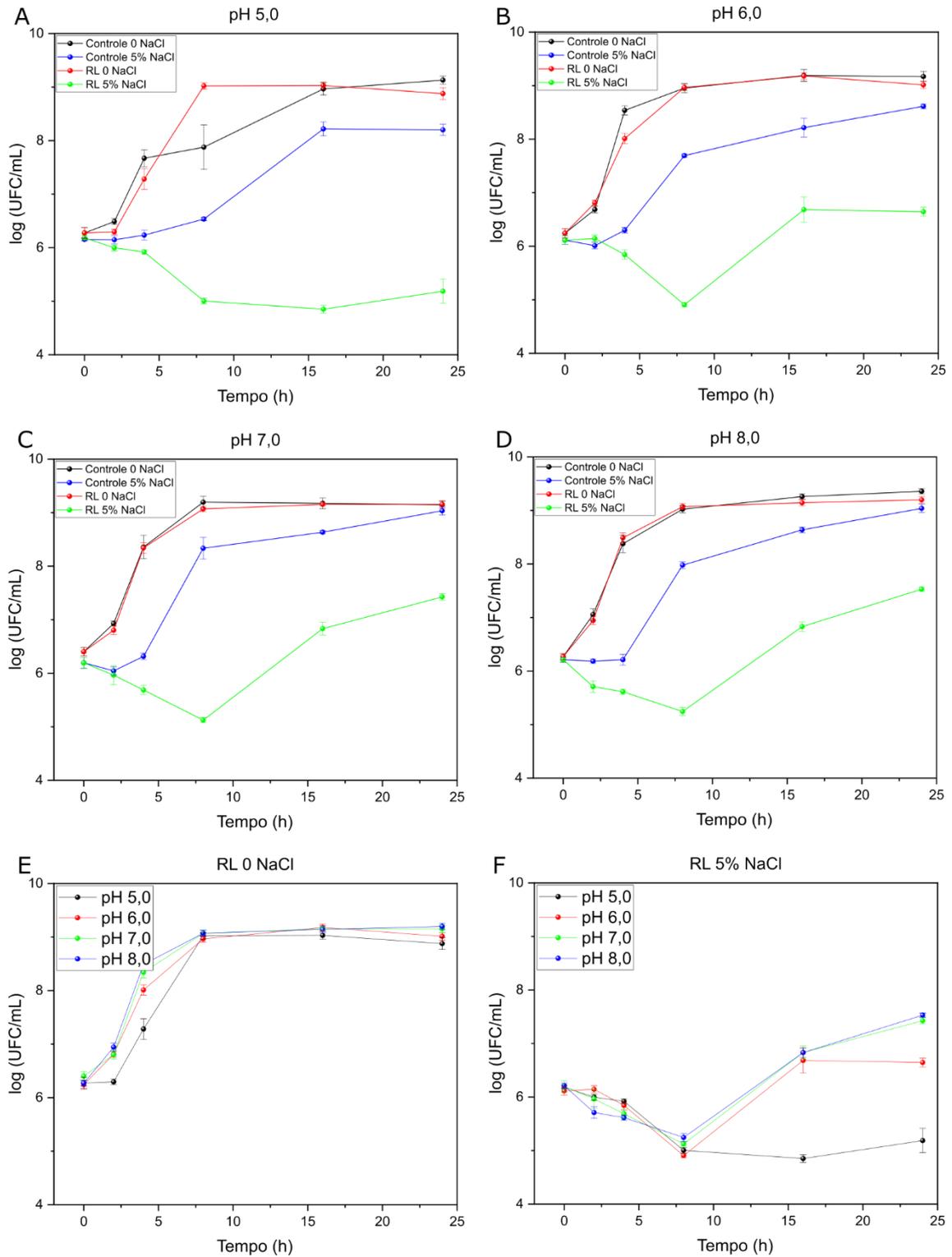
Ao se analisar a Figura 10E, é possível notar a influência do pH na atividade antimicrobiana dos RLs quando na ausência de NaCl, sendo esta favorecida em meios ácidos. A adição de 5% de NaCl ao meio, minimiza esta diferença, acarretando melhora na atividade antimicrobiana dos RLs frente a *L. monocytogenes*, efeito mais pronunciado em valores de pH acima de 6,0, nos quais se observou a eliminação da população de células viáveis somente na presença do sal (Figura 10F).

Com relação aos controles, sem adição do BS, pode-se observar em todos os valores de pH, que não houve diferenças significativas entre os meios contendo 0 e 5% de NaCl, ou seja, a adição de sal ao meio parece não interferir no crescimento microbiano de maneira isolada, o que vai ao encontro com dados reportados na literatura, nos quais a bactéria *L. monocytogenes* vem sendo classificada como tolerante à presença de sal. (21,87) Apesar disso, o aumento da força iônica do meio pode resultar em alterações na composição da membrana plasmática das células, o que pode auxiliar na eficácia antimicrobiana dos RLs na presença do sal. (92)

A Figura 11, ilustra o crescimento de *E. coli* na presença de RLs, (300 mg/L) e RL-NaCl (5% m/v). Independentemente do valor de pH, após 24 horas de incubação as amostras tratadas com os RLs na ausência de sal apresentaram valores de UFC/mL semelhantes aos respectivos controles, ou seja, o BS não levou à inibição do crescimento, corroborando os resultados anteriores, (Tabela 2). Além disso, após os tratamentos, não se observou diferenças significativas no crescimento de *E. coli* em relação ao pH do meio (Figura 11E).

Ao se analisar a Figura 11F, foi possível notar que em todos os valores de pH testados, a combinação RL- NaCl acarretou redução no número de células viáveis de *E. coli* entre 2 e 8 horas de contato com o BS, porém, apenas em pH 5,0 conseguiu-se manter este comportamento por 24 horas, o que pode indicar melhor eficácia na ação antimicrobiana dos RLs em meios ácidos, assim como observado para *L. monocytogenes*. Além disso, a retomada do crescimento microbiano após 8 horas de contato com o BS pode estar relacionada com o desenvolvimento de resistência, como por exemplo, pela expressão de enzimas que permitiriam o uso dos RLs como nutrientes, fontes de carbono, ou até mesmo contribuiriam para a degradação do BS, diminuindo sua atividade antimicrobiana. (17)

Figura 11: Curva de crescimento de *E. coli* ATCC 25922 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs, em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, (D) pH 8,0, (E) RLs em meio TSYEB sem adição de NaCl e (F) RLs em meio TSYEB contendo 5% NaCl.



Apesar de se observar redução na população de *E. coli*, (pH 5,0 – 4,4 logs, pH 6,0 – 2,3 logs, pH 7,0 – 1,38 logs e pH 8,0- 1,5 logs) após 24 horas de contato com o RL-NaCl, em nenhum dos tratamentos a população foi erradicada, o que corrobora a ausência de valores de CBM para estas condições. Deste modo, pode-se sugerir um efeito bacteriostático da combinação RL-NaCl para esta bactéria.

Avaliando-se o comportamento dos microrganismos testados frente as variações de pH do meio, não foi possível notar diferenças significativas no crescimento. Sabe-se que as bactérias dispõem de diversos mecanismos para se adaptar e sobreviver ao estresse causado por alterações no pH no meio extracelular, como reações para consumo ou liberação de prótons, e alterações na composição da membrana lipídica, mantendo sua integridade e fluidez de modo a proteger o pH interno, restaurando assim a homeostase. (93,94)

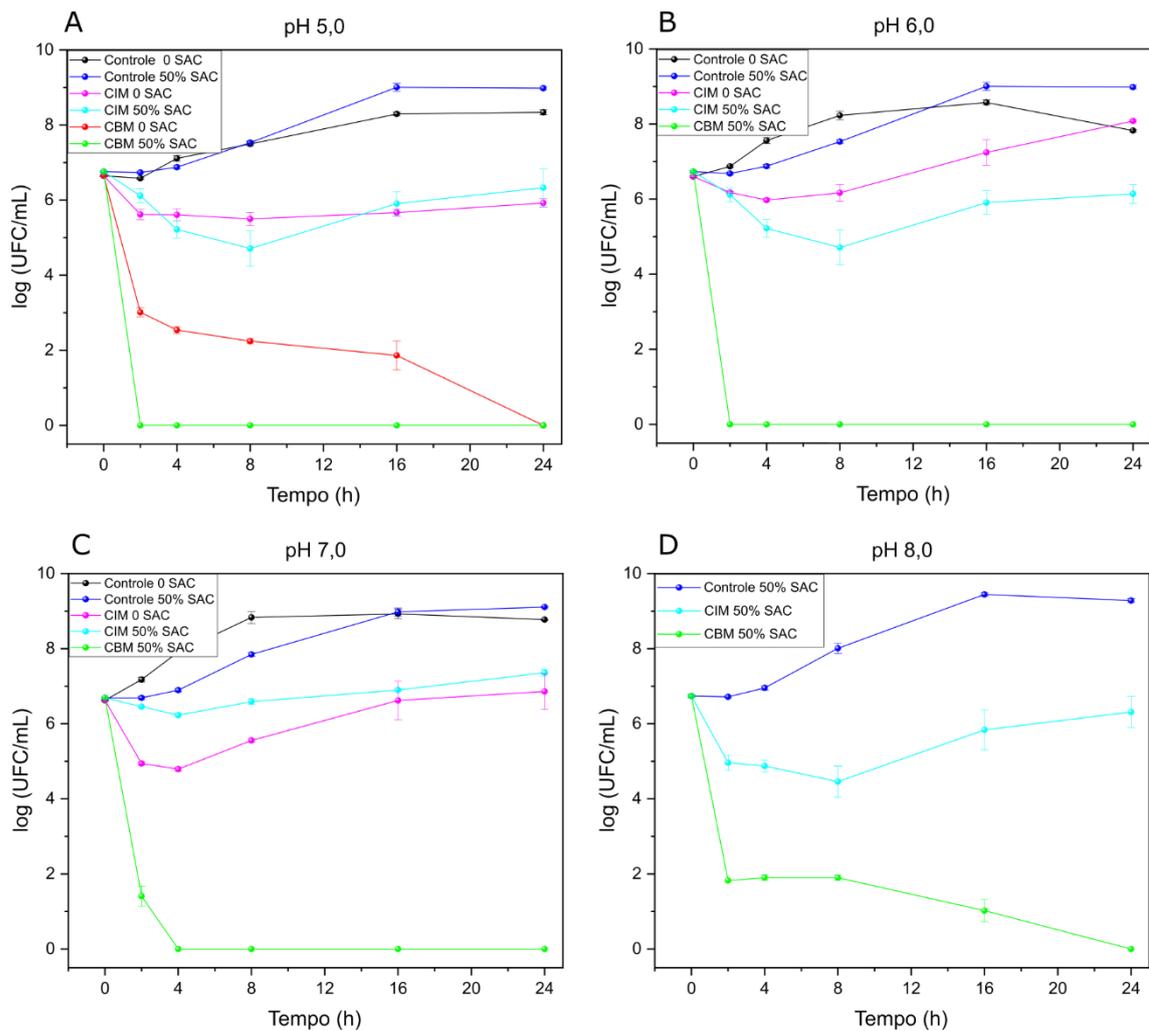
### 5.2.2 Efeito da sacarose

Como para *E. coli* não se obteve valores de CIM e CBM para a combinação RL- sacarose (sendo estas consideradas > 2500 mg/L), optou-se por não dar seguimento ao estudo do efeito da sacarose para esta linhagem. Sendo assim, semelhante aos ensaios com NaCl, construiu-se curvas de crescimento para *L. monocytogenes* nos diferentes valores de pH, utilizando-se os valores de CIM e quando encontrados os valores de CBM, de acordo com a Tabela 3, para os RLs e RL-sacarose (50% m/v), conforme apresentado na Figura 12. Os resultados confirmaram os testes anteriores, nos quais os tratamentos com os valores de CIM levaram a inibição do crescimento do microrganismo e somente os valores de CBM acarretaram a eliminação da população de *L. monocytogenes*.

Comparando-se os diferentes valores de pH, somente em pH 5,0 encontrou-se atividade bactericida para os RLs isolados, enquanto para os demais valores, apenas a combinação RL-sacarose resultou em eficácia antimicrobiana. Ademais, em pH 5,0 apesar do aumento do valor de CBM, a adição de 50% de sacarose ao meio favoreceu a eliminação de células viáveis pelos RLs, sendo necessárias apenas 2 horas de contato com o BS, o que demonstra o aumento da atividade dos RLs promovido pela sacarose, (Figura 12A). Para as amostras em pH 6,0 e 7,0 (Figuras 12B e C), encontrou-se os mesmos valores de CBM, (RL- sacarose), que em pH 5,0 (625 mg/L),

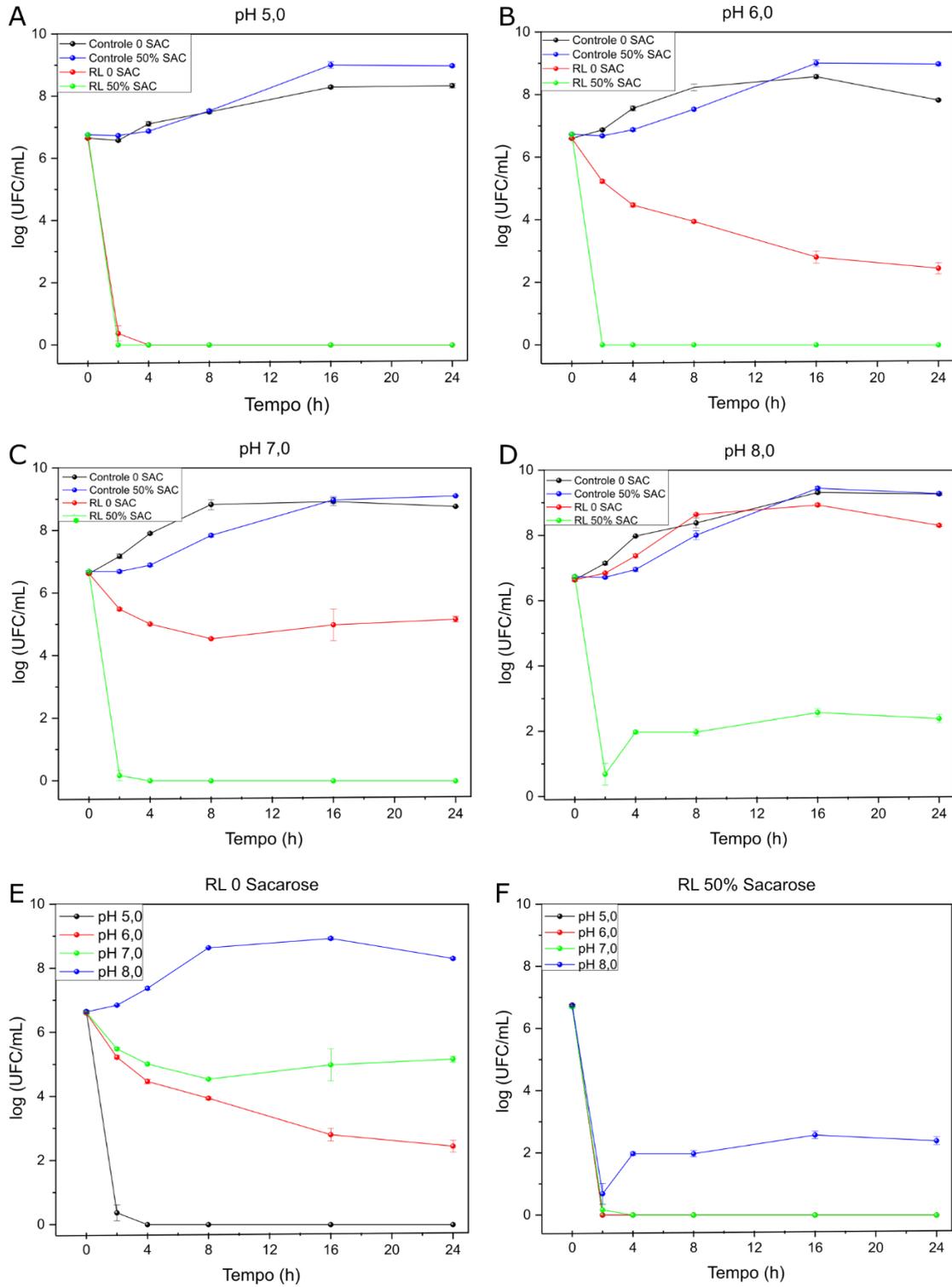
e de modo semelhante, observou-se a erradicação da população de células viáveis entre as primeiras horas de tratamento (2 e 4 horas respectivamente).

Figura 12: Curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de RLs (CIM-CBM), em 0 e 50% (m/v) de sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, e (D) pH 8,0.



De modo a melhor evidenciar a eficácia da combinação RL- sacarose, optou-se por fixar uma concentração de RLs ligeiramente acima dos valores de CBM encontrados para a maioria dos valores de pH (650 mg/L), além de se trabalhar com a maior concentração de açúcar estudada (50% m/v), pois somente nesta determinou-se concentrações bactericidas para os RLs em todos os valores de pH.

Figura 13: Curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de 650 mg/L de RLs, em 0 e 50% (m/v) de sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0, (D) pH 8,0, (E) RLs em meio TSYEB sem adição de sacarose e (F) RLs em meio TSYEB contendo 50% de sacarose.

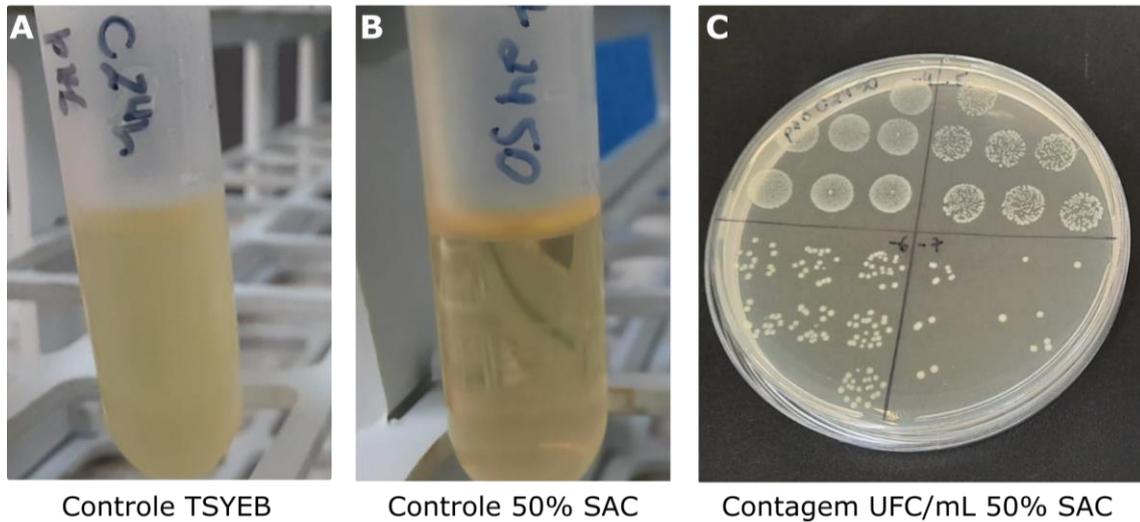


Analisando-se a Figura 13A, ao se aumentar a concentração de RLs utilizada, 650 mg/L, as curvas de crescimento para *L. monocytogenes* em pH 5,0 ficaram praticamente sobrepostas após os tratamentos contendo 0 e 50% de sacarose, erradicando-se a população de células viáveis nas primeiras 4 horas de incubação. Em contrapartida, para os valores de pH 6,0, e 7,0, observou-se de maneira mais efetiva, um aumento na eficácia antimicrobiana dos RLs na presença de 50% de sacarose, nos quais somente na presença do açúcar, observou-se a eliminação da população bacteriana (Figuras 13B e C). Para o pH 8,0 apesar de não ocorrer eliminação total das células viáveis, observou-se redução de 6,9 logs, o que também caracteriza a atividade do RL- sacarose como bactericida para este pH, e o tratamento realizado com os RLs na ausência do açúcar resultou em crescimento semelhante ao controle não havendo sinais de inibição (Figura 13D).

Com relação aos diferentes valores de pH, é possível notar, na ausência do açúcar uma melhor eficácia antimicrobiana dos RLs (650 mg/L) em pH 5,0 (Figura 13E) assim como observado nas curvas realizadas com 300 mg/L de RLs (Figura 10). Porém, ao se adicionar a sacarose, notou-se que a ação bactericida dos RLs se tornou semelhante, especialmente nos valores de pH 5,0, 6,0, e 7,0 (Figura 13F), o que sugere uma ampliação na faixa de pH em que o BS atua quando combinado com o açúcar.

Apesar de não se notar diferenças significativas entre os valores de UFC/mL para os controles de *L. monocytogenes* nas diferentes condições de pH em 0 e 50% de sacarose, durante a realização dos experimentos, observou-se por inspeção visual, que na presença do açúcar mesmo após 24 horas de incubação o meio não apresentou aumento de turbidez. Este dado sugere que a presença de sacarose (50%) pode ter dificultado o desenvolvimento da bactéria, porém não foi responsável pela sua eliminação, uma vez que quando transferida para meio o de cultura TSYEA, voltou a crescer ativamente, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14: Aspecto visual do meio de cultura durante crescimento de *L. monocytogenes*. (A) Controle em meio de cultura TSYEB, (B) Controle em meio de cultura contendo 50% de sacarose e (C) Contagem de UFC/mL em meio de cultura TSYEA em diferentes diluições.



Fonte: Do autor.

A adição de altas concentrações de sacarose ao meio pode ocasionar a redução do valor de atividade de água ( $a_w$ ), além de expor a bactéria à um ambiente de estresse osmótico. (89) A resposta dos microrganismos às mudanças externas de osmolaridade podem ser divididas em três etapas: primeiramente em ambientes de hiper osmolaridade, pode ocorrer também a redução do valor de atividade de água na região citoplasmática, o que pode prejudicar o desenvolvimento de funções celulares essenciais, inibindo uma variedade de processos fisiológicos, como replicação e absorção de nutrientes. Em seguida, ocorrem ajustes bioquímicos, como aumento de lixiviação de íons e compostos orgânicos de baixo peso molecular, de modo a restaurar as condições necessárias para o desenvolvimento microbiano e pôr fim a replicação celular é retomada sob a nova situação. Tais condições exigem uma série de adaptações do microrganismo, as quais envolvem gastos energéticos, o que pode estar relacionado com uma maior suscetibilidade destas células aos tratamentos antimicrobianos, como à aplicação de RLs. (95–97)

Os RLs são classificados como BS de caráter aniônico, porém a existência de cargas negativas efetivas é dependente do valor de pH do meio, além da força iônica da solução. Este comportamento está relacionado com a presença de grupos carboxílicos em sua porção hidrofóbica, os quais apresentam valores de  $pK_a$  5,9 e 5,6

para mono-RL e di-RL respectivamente. Deste modo, em condições de pH abaixo do  $pK_a$ , o grupamento carboxílico se apresentará predominantemente na forma não iônica, ou protonada. Segundo Sánchez, *et al.* (60), em pH 4,0 mais de 98% das moléculas estarão na forma neutra, o que tende a minimizar a repulsão eletrostática com moléculas aniônicas presentes na parede celular bacteriana, facilitando a interação RLs – bactéria. (60–62) Este fato pode estar relacionado com a melhor eficácia antimicrobiana dos RLs observada para *L. monocytogenes* em condições ácidas, pH 5,0, caracterizada pelo maior valor de redução na população de células viáveis, se comparado aos demais pHs (Figura 10E).

Em valores de pH iguais aos valores de  $pK_a$ , estima-se que 50% das moléculas de RLs estejam em sua forma neutra e 50% em sua forma aniônica. Em contrapartida, em meios com condições de pH acima do valor de  $pK_a$ , supõe-se que a maior parte das moléculas esteja desprotonada, apresentando-se em sua forma aniônica, sendo relatado em pH 7,4 a presença de mais de 98% de moléculas de RLs com cargas efetivas negativas. (60,61) Esta condição pode dificultar a interação dos RLs com as células devido a ocorrência de repulsão eletrostática, sendo este efeito crescente de acordo com o aumento do valor de pH, o que pode estar relacionado com os resultados observados principalmente para pH 7,0 e 8,0 nas Figuras 10E, 11E e 13E.

A adição de NaCl ao meio, tende a minimizar a repulsão eletrostática entre grupos ionizados dos RLs ( $-\text{COO}^-$ ) por meio da neutralização das cargas com a formação de uma camada difusa de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) em torno das moléculas do BS, o que pode facilitar a interação com as células bacterianas. (63) Rodrigues, *et al.* (20), demonstraram que o acréscimo de NaCl à uma mistura de RLs resultou em um aumento significativo na atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*, assim como Ferreira, *et al.* (15), observaram uma redução nos valores de CIM para *Staphylococcus aureus* com o aumento da concentração de NaCl presente no meio, dados que corroboram os resultados apresentados para *L. monocytogenes* e *E.coli* e conseqüentemente a hipótese de melhor eficácia antimicrobiana da combinação RL-NaCl frente aos RLs, principalmente em valores de pH neutro e alcalino.

A presença de sacarose no meio, pode resultar em diferentes tipos de interações moleculares com os RLs. O primeiro exemplo, são as interações hidrofílicas-iônicas, ou íon-dipolo, que ocorrem entre os grupos hidroxila ( $-\text{OH}$ ) presentes na molécula do açúcar, uma molécula polar, e o grupo carboxílico do BS

em sua forma ionizada ( $-\text{COO}^-$ ), no qual o ânion pode atrair o polo positivo da molécula de sacarose. Em contrapartida, moléculas de RLs com seu grupo carboxílico protonado ( $-\text{COOH}$ ) podem interagir com as hidroxilas ( $-\text{OH}$ ) presentes nas moléculas de sacarose por meio de ligações de hidrogênio. Também podem ocorrer interações hidrofílicas-hidrofílicas, ou dipolo-dipolo, entre as unidades de ramnose presentes nas moléculas de RLs e as hidroxilas presentes na sacarose, interações hidrofílicas-hidrofóbicas, ou dipolo-dipolo induzido, nas quais as hidroxilas presentes na molécula de sacarose podem induzir a formação de um momento de dipolo no domínio apolar do BS, e interações hidrofóbicas-hidrofóbicas, mais fracas, entre os domínios apolares das moléculas de sacarose e dos RLs, (cadeia de hidrocarbonetos), também conhecidas como interações de dipolo instantâneo. (64)

De maneira semelhante ao efeito do NaCl, quando em solução, estas interações intermoleculares entre a sacarose e os RLs, podem vir a minimizar a repulsão eletrostática entre as cargas negativas presentes nas moléculas do BS ( $-\text{COO}^-$ ), principalmente em valores de pH acima do pka. Ademais, como mencionado anteriormente, as células bacterianas podem estar mais sensíveis à ação do BS, devido ao estresse causado pelas altas concentrações de açúcar no meio, podendo este em conjunto com atenuação da presença de cargas em solução, influenciar na melhora da ação antibacteriana dos RLs quando combinados com sacarose, frente a *L. monocytogenes* (Tabela 3 e Figura 13).

Ao se comparar o efeito da adição de NaCl e sacarose na ação antimicrobiana dos RLs, pode-se observar pelos resultados obtidos, que a adição de NaCl acarretou maior eficácia bactericida, proporcionando a erradicação da população de células viáveis de *L. monocytogenes* em menores concentrações de RLs, além de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa, *E. coli*, efeito observado somente na presença do sal. Este comportamento pode ser atribuído às interações entre as moléculas de RLs e os íons sódio capazes de neutralizar as cargas negativas presentes no grupo carboxílico do BS de maneira mais efetiva, uma vez que as interações de van der Waals ocorridas entre as moléculas de açúcar e os RLs são mais fracas. Ademais, os íons  $\text{Na}^+$  são menores que as moléculas de sacarose o que facilita sua interação com as moléculas de RLs, e a consequente formação da camada difusa de contraíons. Além disso, para se observar a eficácia antimicrobiana dos RLs em combinação com a sacarose, foi preciso utilizar uma concentração 10 vezes maior do açúcar em comparação ao sal, o que pode ter ocasionado uma situação de maior

estresse osmótico para a célula contribuindo para a maior suscetibilidade aos efeitos do BS.

### **5.3 Atividade antimicrobiana em Biofilmes bacterianos**

Após avaliação do comportamento dos RLs frente as bactérias em sua forma livre (planctônica), seguiu-se para a avaliação da atividade antibiofilme do BS. Nesta etapa, optou-se por trabalhar somente com a bactéria *L. monocytogenes*, pois esta linhagem apresentou maior sensibilidade aos tratamentos.

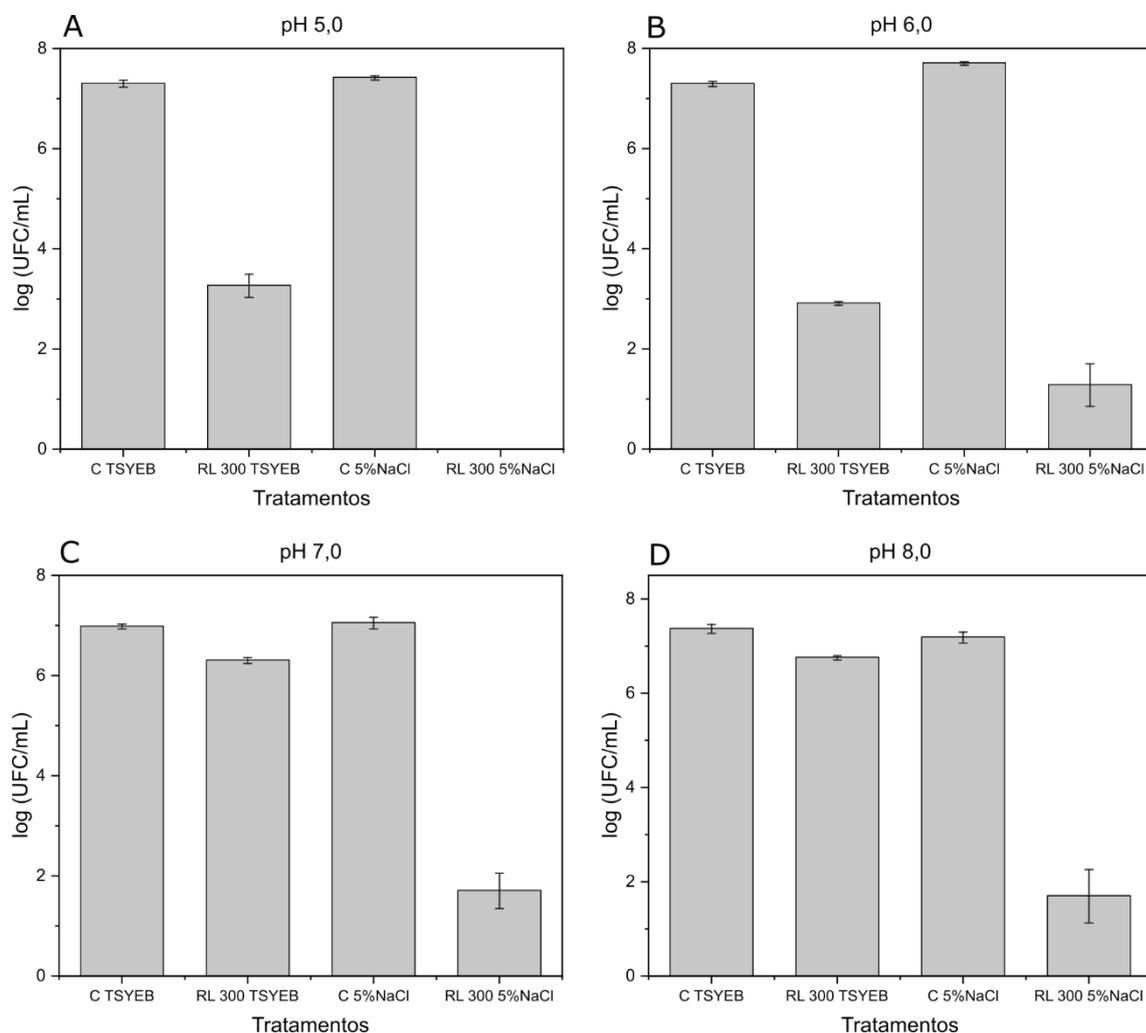
#### **5.3.1 Efeito do NaCl**

Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos RLs frente a biofilmes de *L. monocytogenes* pré-formados, com 24 horas de crescimento, utilizando-se 300 mg/L de RLs em 0 e 5% NaCl.

De maneira semelhante, a adição de sal ao meio resultou em um aumento significativo da atividade antimicrobiana dos RLs, conforme representado na Figura 15, promovendo maior remoção do biofilme após 24 horas de tratamento, se comparados com os RLs isolados, sendo este efeito mais expressivo nos valores de pH 7,0 e 8,0.

Em pH 5,0, a combinação RL-NaCl resultou na erradicação da população de *L. monocytogenes* no biofilme (Figura 15A). Na ausência do sal, os RLs promoveram a redução de 4,03 logs, mas não a total eliminação do microrganismo, apresentando menor eficácia se comparado às células planctônicas, (Figura 10A). Assumir a forma de biofilmes é uma excelente estratégia de sobrevivência por parte dos microrganismos, uma vez que a matriz extracelular pode atuar como uma barreira protetora para as células, interferindo na difusão e penetração dos BS no biofilme, o que corrobora a maior eficácia dos RLs observada frente a forma planctônica neste pH. (98)

Figura 15: Atividade antibiofilme de RLs (300 mg/L) frente a *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, em 0 e 5% (m/v) de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0.



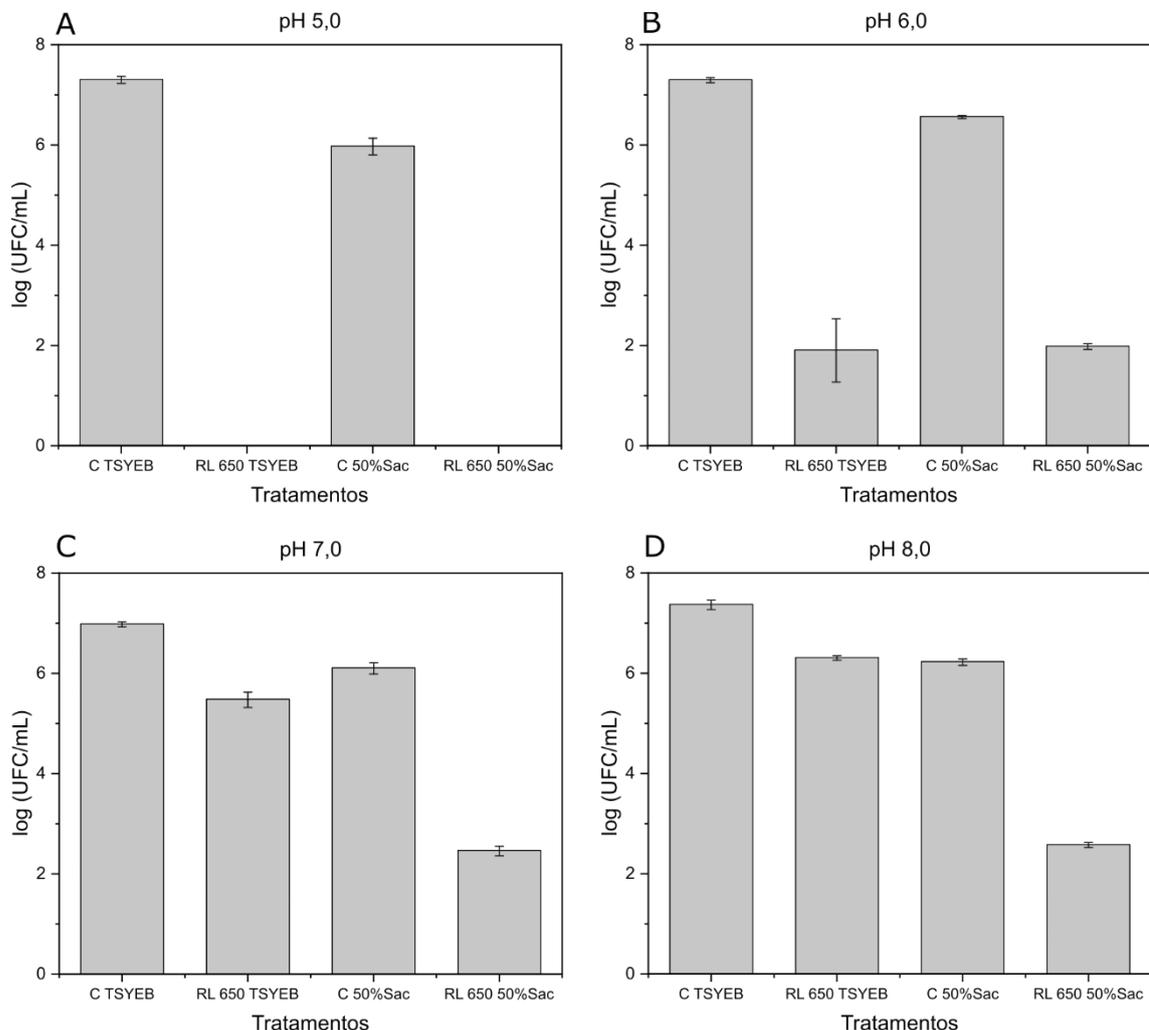
Em pH 6,0 observou-se eficácia semelhante entre os tratamentos com os RLs em 0 e 5% de NaCl (Figura 15B). Em contrapartida, para os valores de pH 7,0 e 8,0, na ausência do sal, observou-se valores de redução na população menor que 1 log, enquanto para a combinação RL-NaCl, obteve-se valores de redução significativos de 5,34 e 5,49 logs respectivamente (Figuras 15C e D).

### 5.3.2 Efeito da sacarose

Para avaliar o efeito da adição de sacarose na atividade antibiofilme dos RLs, utilizou-se a mesma concentração de BS dos testes com células planctônicas, trabalhando-se então com 650 mg/L e 50% de sacarose.

Analisando-se a Figura 16A, é possível notar que em pH 5,0 ambos os tratamentos, RLs (650 mg/L) e RL-sacarose, resultaram na erradicação da população de *L. monocytogenes*. Sendo a eficácia antibiofilme do BS dependente da concentração aplicada, uma vez que 300 mg/L dos RLs na ausência do sal (Figura 15A) não acarretou eliminação total do microrganismo.

Figura 16: Atividade antibiofilme de RLs (650 mg/L) frente a *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, em 0 e 50% (m/v) de sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0.



De maneira semelhante ao efeito do sal, em pH 6,0 não se observou diferenças significativas entre os tratamentos com RLs realizados em 0 e 50% de sacarose (Figura 16B). Para o pH 7,0 e pH 8,0 observou-se maior redução no número de células viáveis com a combinação RL-sacarose (3,65 logs), se comparados aos tratamentos com os RLs isoladamente (1,50 e 1,06 logs respectivamente), sugerindo ao menos para estes valores de pH melhor eficácia antimicrobiana dos RLs na presença do açúcar (Figuras 16C e D).

A formação de biofilmes é um processo complexo e pode estar relacionada com diversos fatores, como disposição de nutrientes, pH e presença de solutos no meio. (78) Além de interferir no desenvolvimento do microrganismo, tais condições também parecem afetar a atividade antimicrobiana dos RLs. Com os resultados obtidos, observou-se maior ação antibiofilme dos RLs frente a *L. monocytogenes* em meio ácido, pH 5,0, e em combinação com NaCl, e sacarose principalmente nos valores de pH neutro e alcalino (pH 7,0 e 8,0), mantendo-se a tendência observada para as células planctônicas.

A remoção de biofilmes pelos RLs pode envolver o enfraquecimento das interações entre as células bacterianas e a superfície, e de interações bactéria-bactéria devido à redução da tensão superficial e interfacial, o que pode favorecer a dispersão de células do biofilme para o meio. Ademais, pode ocorrer a ligação do RL com moléculas no *quorum sensing* de biofilmes maduros, o que também está relacionado com a dissipação do biofilme. (16,99)

Os RLs também podem solubilizar a matriz polimérica pela inserção de sua porção hidrofóbica na matriz, enquanto a porção hidrofílica aponta para a fase aquosa, favorecendo o desprendimento de exopolissacarídeos (EPS) presentes na superfície, facilitando a penetração do BS com conseqüente remoção das células para a solução aquosa, resultando no retorno destas células para a forma planctônica, o que pode facilitar a ação antimicrobiana dos RLs. (41,99)

A composição da matriz extracelular também pode interferir na atividade antibiofilme de RLs. Segundo Silva, *et al.* (16) biofilmes formados em leite apresentaram maior caráter hidrofílico após tratamento com os RLs, provavelmente devido à solubilização de carboidratos pelo BS, o que facilitou a interação com a água e conseqüente desagregação do biofilme (88,9%) de *S. aureus*. O que pode estar relacionado com a maior eficácia na remoção dos biofilmes de *L. monocytogenes* com a combinação RL-sacarose (Figura 16).

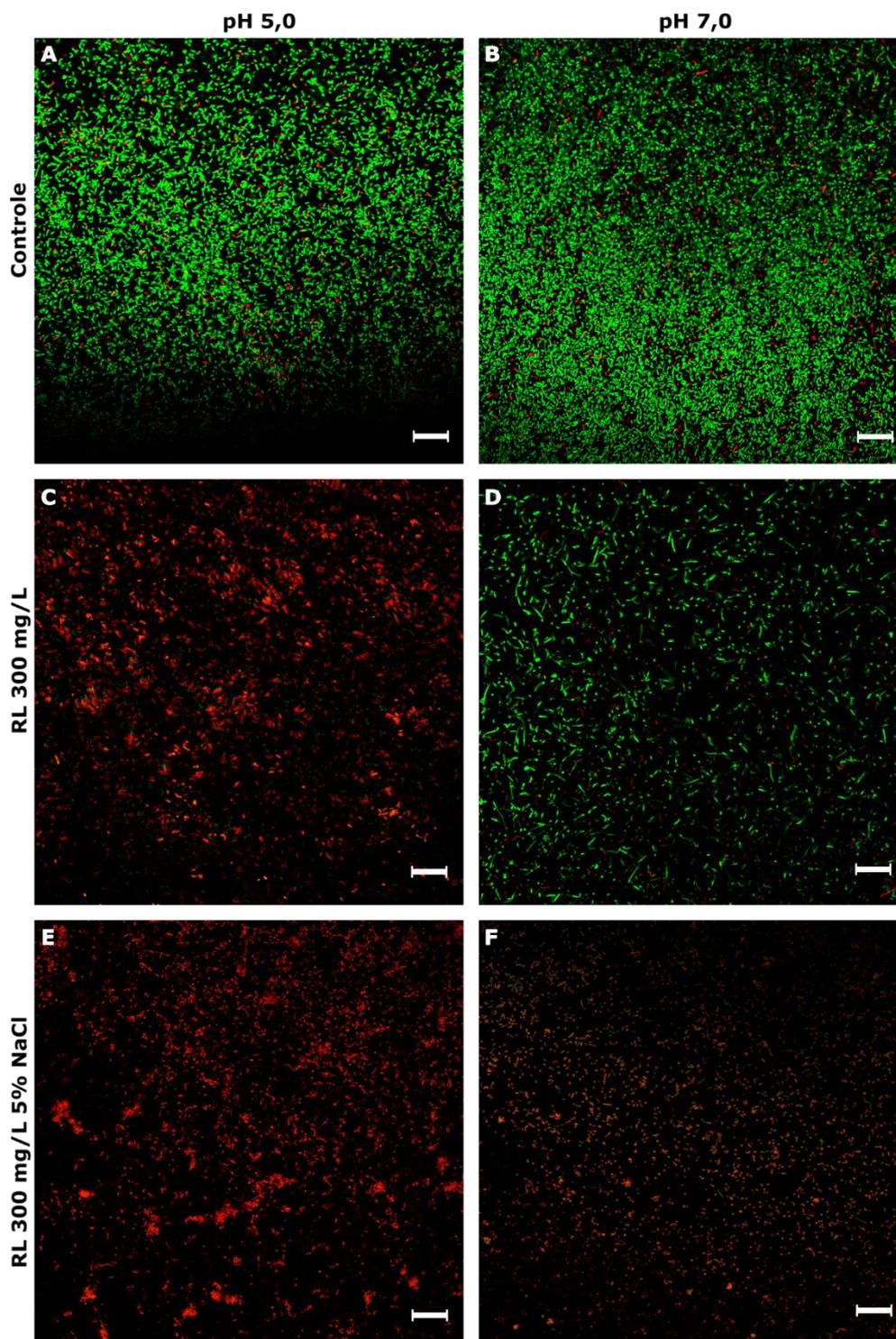
### 5.3.3 Microscopia confocal em biofilmes

Imagens dos biofilmes de *L. monocytogenes*, nas diferentes condições testadas, foram obtidas por microscopia confocal, utilizando-se o kit de fluoróforos *live/dead*<sup>®</sup>, uma mistura de dois corantes fluorescentes que diferenciam células viáveis, e células mortas. O corante SYTO<sup>™</sup> 9 cora as células intactas de verde, e o corante iodeto de propídeo marca células danificadas de vermelho.

Com as imagens obtidas da superfície dos biofilmes bacterianos, é possível notar diferenças entre os controles e as amostras tratadas com o BS. Os biofilmes controle foram formados em meio de cultura TSYEB e após 24 horas, a maioria das células se encontravam vivas (Figuras 17A e B), além de representarem biofilmes robustos, com espessuras de 17,7  $\mu\text{m}$  e 16,1  $\mu\text{m}$  respectivamente. Após o tratamento com os RLs (300 mg/L), apenas em pH 5,0 observou-se a presença majoritária de células mortas (Figura 17C), enquanto em pH 7,0 as células viáveis ainda persistiam, conforme visualizado na Figura 17D, o que corrobora os resultados anteriores (Figuras 15A e C).

Após a adição de RL combinado com 5% de NaCl, para o pH 5,0 observou-se que a maioria das células estavam coradas de vermelho (Figura 17E), e em pH 7,0 apesar de não se eliminar por completo a população de *L. monocytogenes*, verificou-se que as células aparentam estar parcialmente marcadas com o corante iodeto de propídeo, vermelho (Figura 17F), o que pode sugerir que os RLs atuam danificando a membrana celular, permitindo-se assim a entrada do corante.

Figura 17: Microscopia confocal de biofilmes de *L. monocytogenes* após coração com o kit de fluoróforos *live/dead*<sup>®</sup>. (A) pH 5,0 controle, (B) pH 7,0 controle, (C) pH 5,0 RL 300 mg/L, (D) pH 7,0 RL 300 mg/L, (E) pH 5,0 5% NaCl RL 300 mg/L e (F) pH 7,0 5% NaCl RL 300 mg/L. Escalas de tamanho correspondem à 20  $\mu$ m.



A aplicação de RLs pode ocasionar alterações físico-químicas em determinados tipos de superfícies. Araujo, *et al.* (100), reportaram que superfícies de

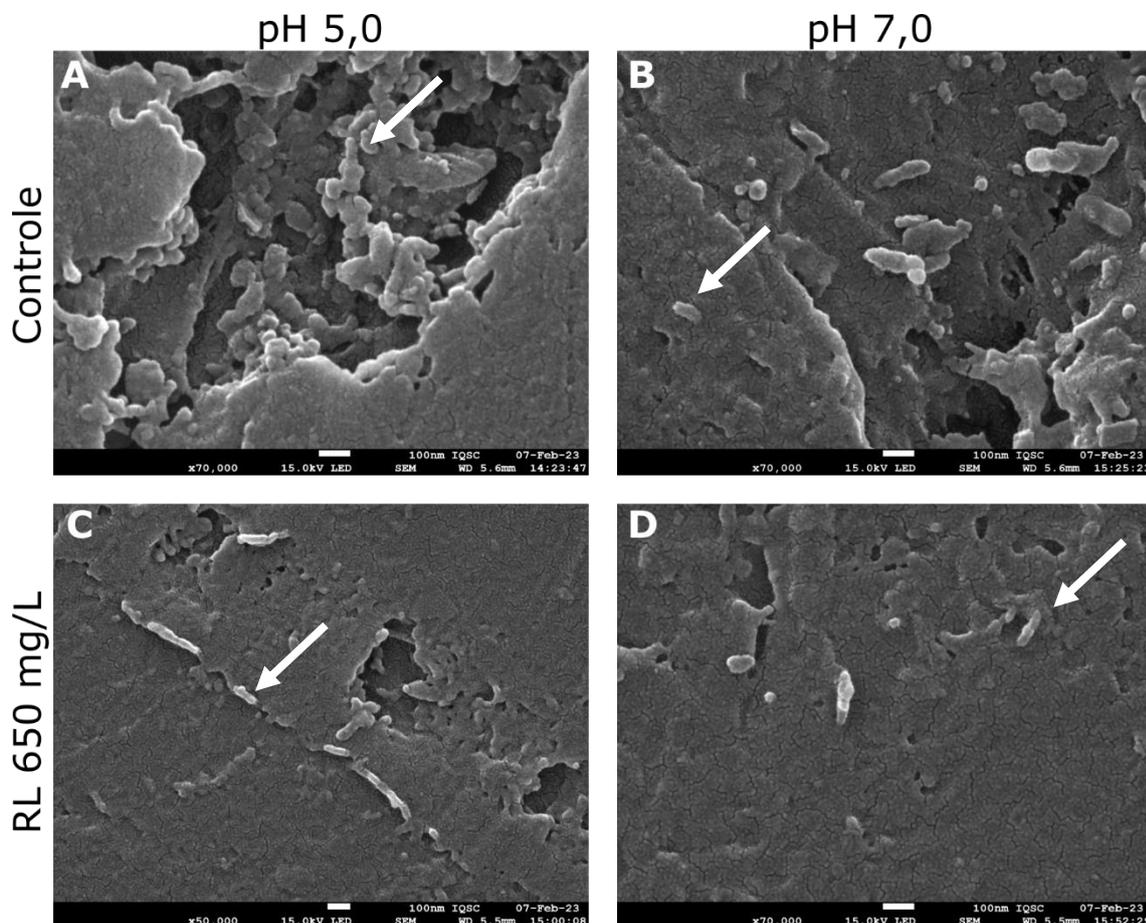
poliestireno na presença de RLs apresentaram uma redução no caráter hidrofóbico, diminuindo a ocorrência de interações hidrofóbicas com a membrana celular dos microrganismos, além de aumento no caráter ácido, sugerindo que grupos carregados (-COO<sup>-</sup>) estão apontados para a fase aquosa, características que podem estar relacionadas com a atividade antiadesiva do BS conseqüentemente impedindo a manutenção de biofilmes. Além disso, BS podem induzir alterações hidrofóbicas características na membrana de células bacterianas, ocasionando modificações nas propriedades de adesão e ligação em superfícies, impedindo a formação de biofilmes bacterianos mais robustos. (7) De fato, analisando-se as imagens (Figuras 17C, D, E e F), observou-se uma menor quantidade de células nas superfícies dos corpos de prova após 24 horas de tratamentos com os RLs, e RL-NaCl, se comparados aos controles, o que pode estar relacionado com atividade antiadesiva e a remoção de células do biofilme. (17,100)

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

Realizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para observar a arquitetura de biofilmes de *L. monocytogenes* formados em meio TSYEB contendo 50% de sacarose, uma vez que não foi possível a sua visualização por microscopia confocal.

Analisando-se a Figura 18, é possível notar a presença de uma camada espessa em torno das células, possivelmente composta pela matriz extracelular do biofilme, principalmente nas amostras controle (Figuras 18A e B), o que pode ter dificultado a penetração dos fluoróforos. Polissacarídeos são os componentes majoritários e de maior importância da matriz extracelular, e a presença de sacarose pode ter aumentado o conteúdo de carboidratos da matriz, alterando funções como adesão, e formação de micro colônias (101), interferindo na morfologia dos biofilmes formados, sendo relatado para *L. monocytogenes* a formação de *clusters* (102) assim como visualizado neste trabalho.

Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes de *L. monocytogenes* em TSYEB contendo 50% de sacarose. (A) pH 5,0 Controle, (B) pH 7,0 Controle, (C) pH 5,0 RL 650 mg/L e (D) pH 7,0 RL 650 mg/L. Setas apontam células.



Após os tratamentos com 650 mg/L dos RLs, as células ficaram mais aparentes, provavelmente devido à solubilização da matriz pelo BS (16), setas brancas apontam para as células, conforme as Figuras 18C e D.

#### 5.4 Determinação das concentrações inibitória mínima de biofilme e de erradicação mínima de biofilme (CIMB) e (CEMB)

De modo a complementar o estudo da atividade antibiofilme dos RLs, optou-se por trabalhar com placas de poliestireno do tipo *peg lid*. Apesar de ser uma técnica mais onerosa, esta abordagem elimina questões como a agregação das células bacterianas apenas por sedimentação. (83)

Analisando-se os resultados de CIMB e CEMB obtidos para os RLs frente a biofilmes de *L. monocytogenes* após 24 horas de tratamento (Tabela 4), observou-se

uma maior influência da adição dos solutos na atividade antibiofilme dos RLs em pH 7,0, no qual a aplicação dos RLs isoladamente não resultou em valores de CIMB e CEMB, sendo estes considerados > 2500 mg/L. Em contrapartida, na presença de 5% de NaCl a aplicação de 39,0 mg/L dos RLs promoveu a inibição do biofilme, e a combinação RL-sacarose (50%), resultou em atividade bactericida na concentração de 156,25 mg/L dos RLs. Em pH 5,0, apesar de menos expressivo, observou-se redução nos valores de CIMB e principalmente CEMB dos RLs na presença do sal e do açúcar.

Assim como nos testes com células planctônicas e de atividade antibiofilme em corpos de prova de poliestireno, observou-se melhor eficácia antimicrobiana dos RLs isolados em pH 5,0, e maior influência da adição de NaCl e sacarose em pH 7,0, sendo estes comportamentos possivelmente relacionados com a neutralização de cargas negativas presentes nas moléculas de RLs em condições de pH acima dos valores de pka.

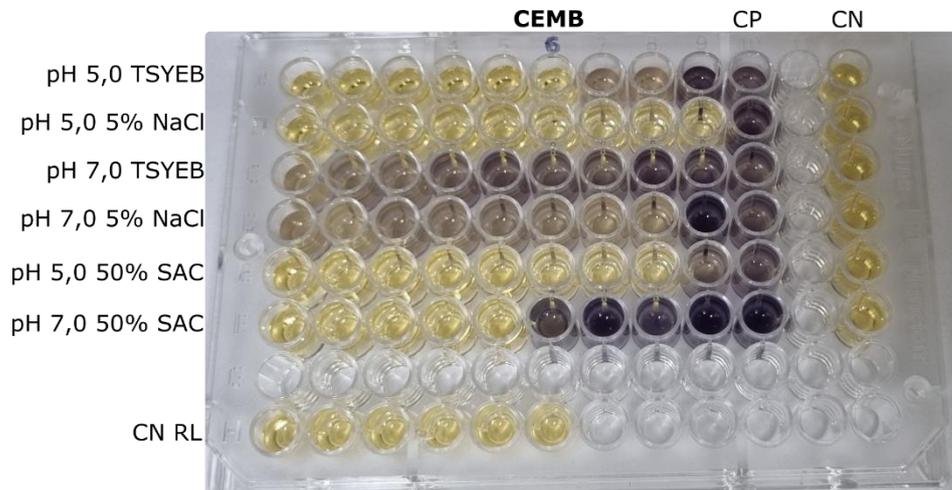
Tabela 4: Atividade antimicrobiana de RLs (mg/L), em biofilmes de *L. monocytogenes*.

		<b>CIMB</b>	<b>CEMB</b>
<b>pH 5,0</b>	<b>TSYEB</b>	19,5	78,1
	<b>5% NaCl</b>	9,7	9,7
	<b>50% Sacarose</b>	19,5	19,5
<b>pH 7,0</b>	<b>TSYEB</b>	>2500	>2500
	<b>5% NaCl</b>	39,0	>2500
	<b>50% Sacarose</b>	39,0	156,2

\*CIMB- Concentração Inibitória Mínima de Biofilme \*\*CEMB- Concentração de Erradicação Mínima de Biofilme.

A Figura 19, ilustra a microplaca após a realização do ensaio para determinação dos valores de CEMB dos RLs com 72 horas de incubação, a qual corrobora os resultados apresentados (Tabela 4).

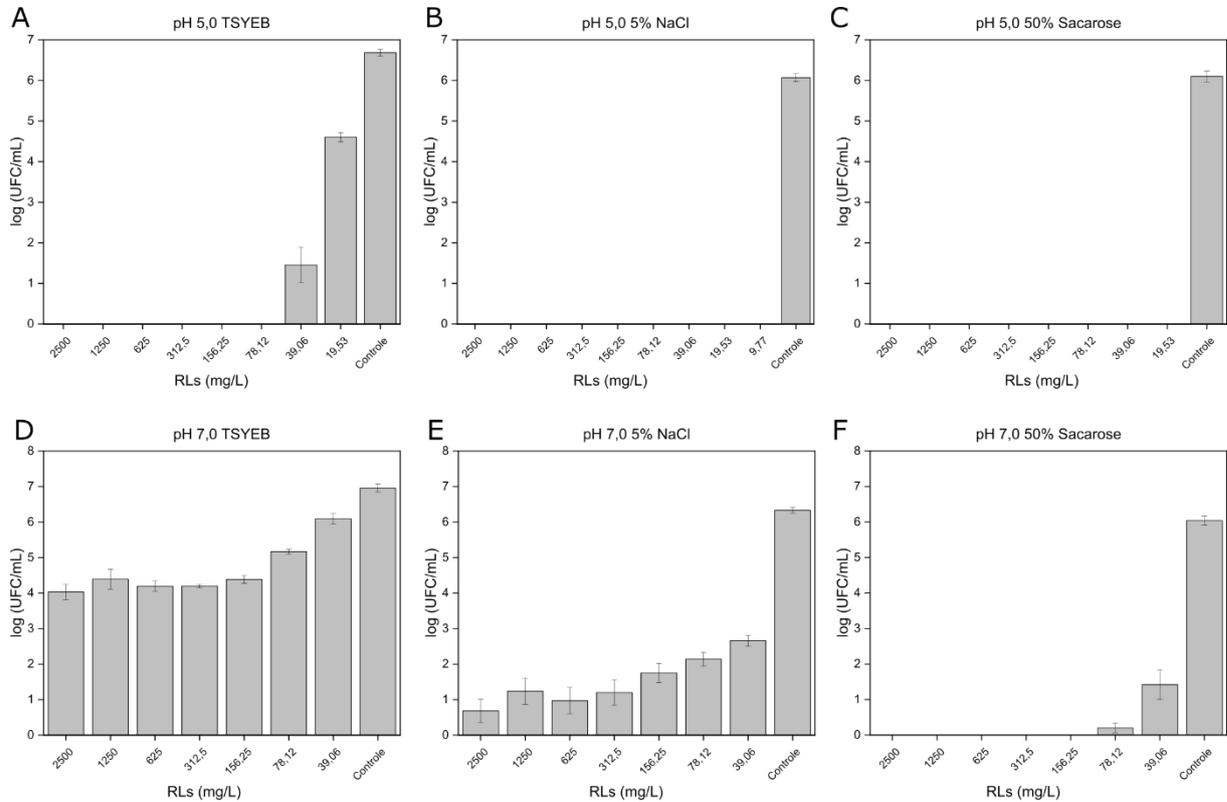
Figura 19: Fotografia ilustrando o ensaio para determinação dos valores de CEMB dos RLs frente a biofilmes de *L. monocytogenes*, em pH 5,0 e 7,0, no meio TSYEB contendo 0, 5% NaCl e 50% de sacarose (m/v).



De fato, observando-se a Figura 20, é possível notar que os valores de CEMB obtidos acarretaram total remoção dos biofilmes de *L. monocytogenes* em ambos os valores de pH, após 24 horas de tratamento. Além disso, a aplicação dos valores de CIMB levaram a inibição do crescimento do microrganismo, mas não à total eliminação da população.

Em pH 7,0, apesar de não se observar CEMB para os RLs e RL-NaCl, verificou-se que a maior concentração de RLs utilizada, 2500 mg/L resultou na redução de 2,92 logs para os RLs, e 5,65 logs para a combinação com sal, se comparados aos controles (Figuras 20D e E). Gomes e Nitschke (17), também relataram que os RLs não foram capazes de remover completamente biofilmes de *L. monocytogenes* estabelecidos em superfícies de poliestireno. Ademais, se comparados os efeitos da adição de NaCl e sacarose na ação antibacteriana dos RLs neste valor de pH, a combinação com o açúcar apresentou melhor resultado, o que pode estar relacionado com diferenças na natureza química da matriz polimérica, assim como possíveis alterações na organização molecular dos RLs na presença de sacarose, as quais podem favorecer a interação e solubilização da matriz e consequente eliminação das células.

Figura 20: Atividade antimicrobiana de RLs contra biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de NaCl (0 e 5% (m/v)) e sacarose (50% (m/v)). (A) pH 5,0 0NaCl, (B) pH 5,0 5% NaCl, (C) pH 5,0 50% Sacarose (D) pH 7,0 0 NaCl, (E) pH 7,0 5% NaCl, (F) pH 5,0 50% Sacarose.



Foi possível observar diferenças nas concentrações de RLs com relação aos testes realizados com os corpos de prova e as placas do tipo *peg lid*. Sabe-se que o desenvolvimento do biofilme depende da superfície à qual os microrganismos são aderidos, e apesar de ambos serem do mesmo material, as metodologias utilizadas foram diferentes, o que pode ter influenciado o modo de agregação e estrutura adotada pelas células quando na forma sésil, conseqüentemente afetando a interação do BS com as bactérias.

## 5.5 Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para avaliar o efeito do pH, presença de NaCl e sacarose na formação de micelas, determinou-se os valores de CMC para as soluções aquosas de RLs 300 mg/L (Tabelas 5 e 6) nas diferentes condições.

### 5.5.1 Efeito do NaCl

Analisando-se os tratamentos realizados em um mesmo valor de pH, pode-se observar como efeito da adição de NaCl a redução no valor de CMC correspondente, efeito este crescente com o aumento da concentração de sal (Tabela 5), sendo mais evidente nos valores de pH maior que 5,0. Em contrapartida, quando avaliados os diferentes valores de pH, observou-se um aumento na CMC juntamente com o aumento do valor de pH da solução. A redução nos valores de CMC de RLs pela adição de NaCl ao meio também foi observada em estudos semelhantes, como por Rodrigues, *et al.* (20), Abbasi, *et al.* (61), e Helvac, Peker e Özdemir. (63)

Tabela 5: Valores de CMC (mg/L) de soluções aquosas de ramnolipídeos (300 mg/L) em diferentes valores de pH e concentração de NaCl.

		%NaCl			
		0	1%	2%	5%
pH	5,0	19,6	11,5	10,4	11,9
	6,0	93,2	31,9	17,4	14,2
	7,0	94,2	35,8	26,3	16,0
	8,0	121,4	39,1	25,6	15,5

O aumento do valor do pH está relacionado com a presença majoritária de moléculas de RLs carregadas negativamente, as quais tendem a se repelir, dificultando a formação de agregados, o que pode estar relacionado com o aumento do valor da CMC observado. De fato, em pH 5,0, onde existe a prevalência de moléculas de RLs em sua forma neutra mesmo na ausência do sal, observou-se valor de CMC menor, (19,6 mg/L), do que para os demais pH testados, nos quais os RLs se encontram em sua forma ionizada.

Conforme se aumentou a concentração de sal observou-se uma redução nos valores de CMC, principalmente em valores de pH neutro e alcalino, possivelmente devido ao aumento da força iônica do meio e potencial neutralização das cargas dos

grupos carboxílicos desprotonados pela formação de uma camada difusa de íons  $\text{Na}^+$ , com conseqüente redução na repulsão eletrostática, o que tende a favorecer a agregação e formação de micelas. (60,61,63) Ademais, as moléculas de RLs tendem a se rearranjar de modo que as unidades de ramnose interajam com o grupamento carboxílico por meio de ligações de hidrogênio, deste modo, ocorre a formação de uma camada mais compacta. A presença de íons  $\text{Na}^+$  ligados ao grupo carboxílico pode ter resultado em um aumento do tamanho do domínio polar do BS, com concomitante redução nos valores de CMC. (61,63)

### 5.5.2 Efeito da sacarose

Com relação ao efeito da adição de sacarose, em um mesmo valor de pH, a presença de menores concentrações do açúcar resultou em uma tendência de redução dos valores de CMC obtidos. Porém, ao se aumentar a concentração de sacarose para 50%, observou-se um comportamento oposto, sendo os valores de CMC maiores nestas condições se comparados aos RLs isoladamente. De maneira semelhante ao efeito do NaCl, conforme o aumento dos valores de pH das soluções, observou-se valores maiores de CMC, conforme a Tabela 6.

Tabela 6: Valores de CMC (mg/L) de soluções aquosas de ramnolípídeos (300 mg/L) em diferentes valores de pH e concentração de sacarose.

		%Sacarose				
		0	5%	10%	25%	50%
pH	5,0	19,6	12,4	24,8	39,7	25,6
	6,0	93,2	39,7	41,2	82,9	112,6
	7,0	94,2	41,9	96,6	87,7	117,1
	8,0	121,4	119,7	117,3	94,5	119,1

A presença do açúcar no meio tende a atenuar a carga negativa das moléculas de RLs quando na forma iônica, o que pode estar relacionado com a redução dos valores de CMC para a combinação RL-sacarose em 5% e 10%, nos diferentes valores de pH. (64) No entanto, em concentrações mais elevadas, a adição do açúcar pode levar ao aumento da viscosidade do meio, reduzindo a mobilidade molecular do BS. (89) Além disso, pode ocorrer a formação de camadas difusas do açúcar em torno das moléculas de RLs, o que pode dificultar sua aproximação para a formação de agregados, acarretando o aumento dos valores de CMC observados. (103)

Acima dos valores de CMC, os BS tendem a se apresentar na forma de agregados como micelas, vesículas e lamelas. Segundo Raza, *et al.* (59), mudanças no pH e na concentração de eletrólitos podem afetar o tipo e morfologia desses agregados, o que pode estar diretamente relacionado com a atividade antimicrobiana dos RLs, assim como observado por Otzen. (67) Abaixo da CMC, monômeros de RL podem se inserir na membrana celular por meio de interações hidrofóbicas entre o domínio apolar dos fosfolipídeos e do BS, porém a formação de agregados acelera este processo, facilitando a interação com a célula e levando à saturação da bicamada lipídeo-biossurfactante, o que por sua vez pode induzir a solubilização da membrana. (104,105)

De fato, neste trabalho, observou-se uma melhora na eficácia antimicrobiana dos RLs tanto para *L.monocytogenes* quanto para *E.coli*, conforme adição de NaCl ao meio, sendo este efeito mais pronunciado em pH 7,0 e 8,0, o que pode estar relacionado com a redução no valor da CMC nestas condições. Contudo, como para a combinação RL-sacarose, na presença de 50% do açúcar não se observou este efeito, sugere-se que mais fatores estejam influenciando a atividade antimicrobiana do BS. Segundo Helvac, Peker e Özdemir (63), o aumento da rigidez da monocamada de BS pelo aumento da força iônica da solução, pode resultar em maior estabilidade dos agregados formados pelo empacotamento molecular, facilitando a interação de micelas dos RLs com as células bacterianas o que também pode estar relacionado com aumento da eficácia dos RLs na presença dos solutos.

Ademais, observou-se que na presença de 5% de NaCl e 50% de sacarose, (exceto pH 5,0), os valores de CMC encontrados foram semelhantes para todos os valores de pH, o que corrobora os resultados de curva de crescimento (Figuras 10F e 13F), nos quais também se observou ação bactericida dos RLs semelhante na presença dos solutos.

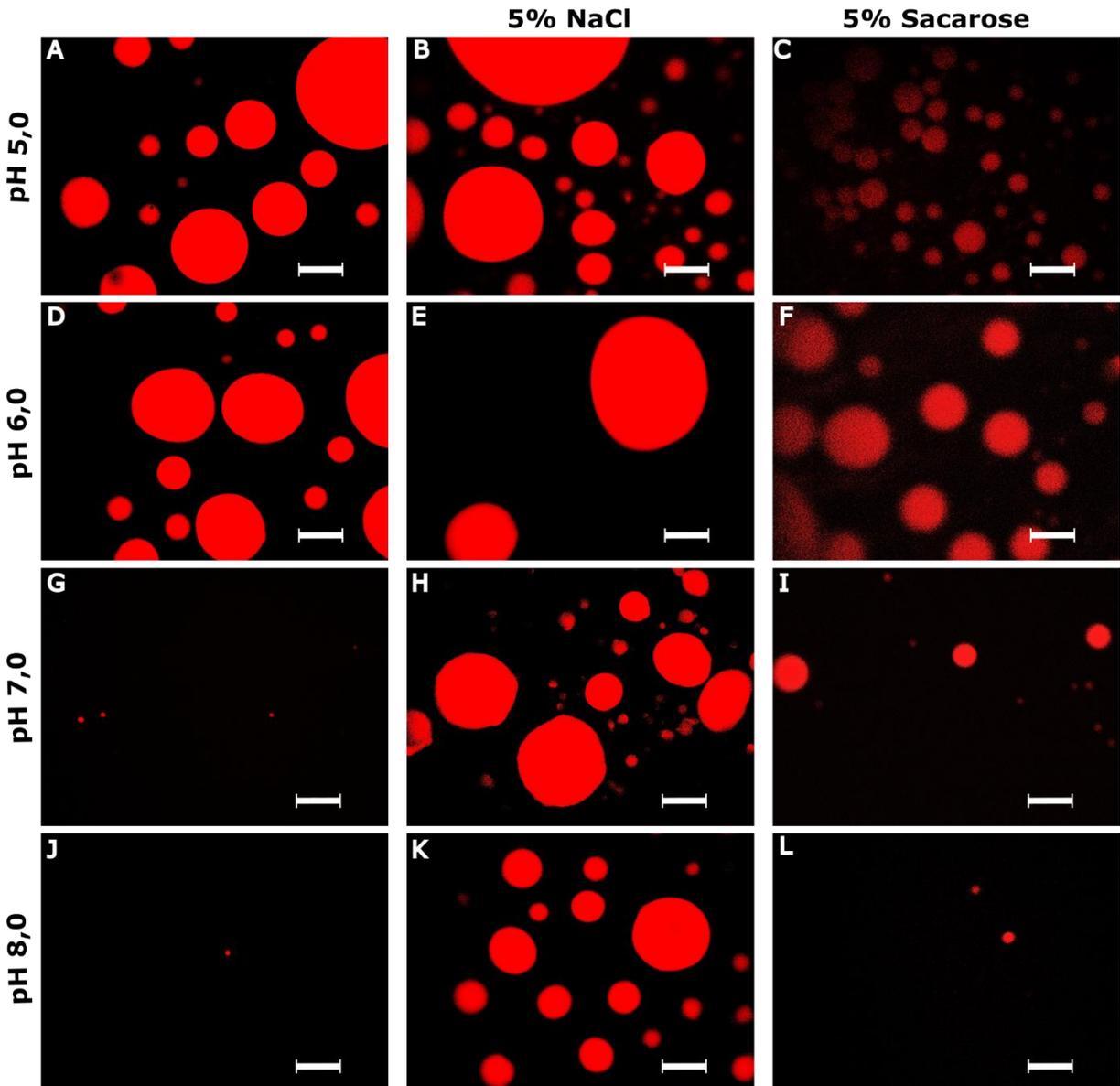
## **5.6 Avaliação dos agregados moleculares de RLs**

De modo a investigar a presença e estrutura dos agregados de RLs, formados em diferentes condições de pH/solutos, foi realizada a microscopia de fluorescência.

Analisando-se as imagens obtidas (Figura 21), observou-se a formação de micelas possivelmente esféricas em todas as condições testadas. Kondo, *et al.* (106), observaram a formação de estruturas esféricas de BS em solução, nas quais o corante

vermelho Nilo, que apresenta caráter hidrofóbico, se encontrava dissolvido no interior da estrutura, semelhante aos resultados obtidos para os RLs.

Figura 21: Microscopia de fluorescência de estruturas micelares de ramnolípídeos (1000 mg/L) formados em solução aquosa. (A) pH 5,0, (B) pH 5,0 5% NaCl, (C) pH 5,0 5% Sacarose, (D) pH 6,0, (E) pH 6,0 5% NaCl, (F) pH 6,0 5% Sacarose, (G) pH 7,0, (H) pH 7,0 5% NaCl, (I) pH 7,0 5% Sacarose, (J) pH 8,0, (K) pH 8,0 5% NaCl e (L) pH 8,0 5% Sacarose. Concentrações de solutos em (m/v). Escalas de tamanho correspondem à 20  $\mu\text{m}$ .



A adição de 5% de NaCl ao meio, acarretou o aumento de tamanho nos agregados de RLs (1000 mg/L), mais significativamente em pH 7,0 e 8,0 (Figuras 21H e K), se comparadas com as amostras sem adição dos solutos, (Figuras 21G e J). Foi possível notar que a adição de 5% de sacarose também resultou em alterações de

tamanho, porém de maneira menos expressiva do que para o sal (Figuras 21C, F, I e L). E em pH 5,0 e 6,0 observou-se menor influência dos solutos na agregação e tamanho das micelas de RLs formadas. Estes resultados sugerem que a atividade antimicrobiana do BS possa estar relacionada com a formação de micelas maiores em solução.

Em pH 5,0, as imagens obtidas apontam para a presença de micelas com tamanhos em torno de 50  $\mu\text{m}$  mesmo sem adição dos solutos (Figura 21A), além disso, não se observou diferenças significativas no formato e tamanho destas micelas e os agregados formados na presença de sal (Figuras 21A e B), sugerindo correlação com os resultados de atividade antimicrobiana para *L. monocytogenes*, que foram similares para este valor de pH (Tabela 1 e Figura 10A).

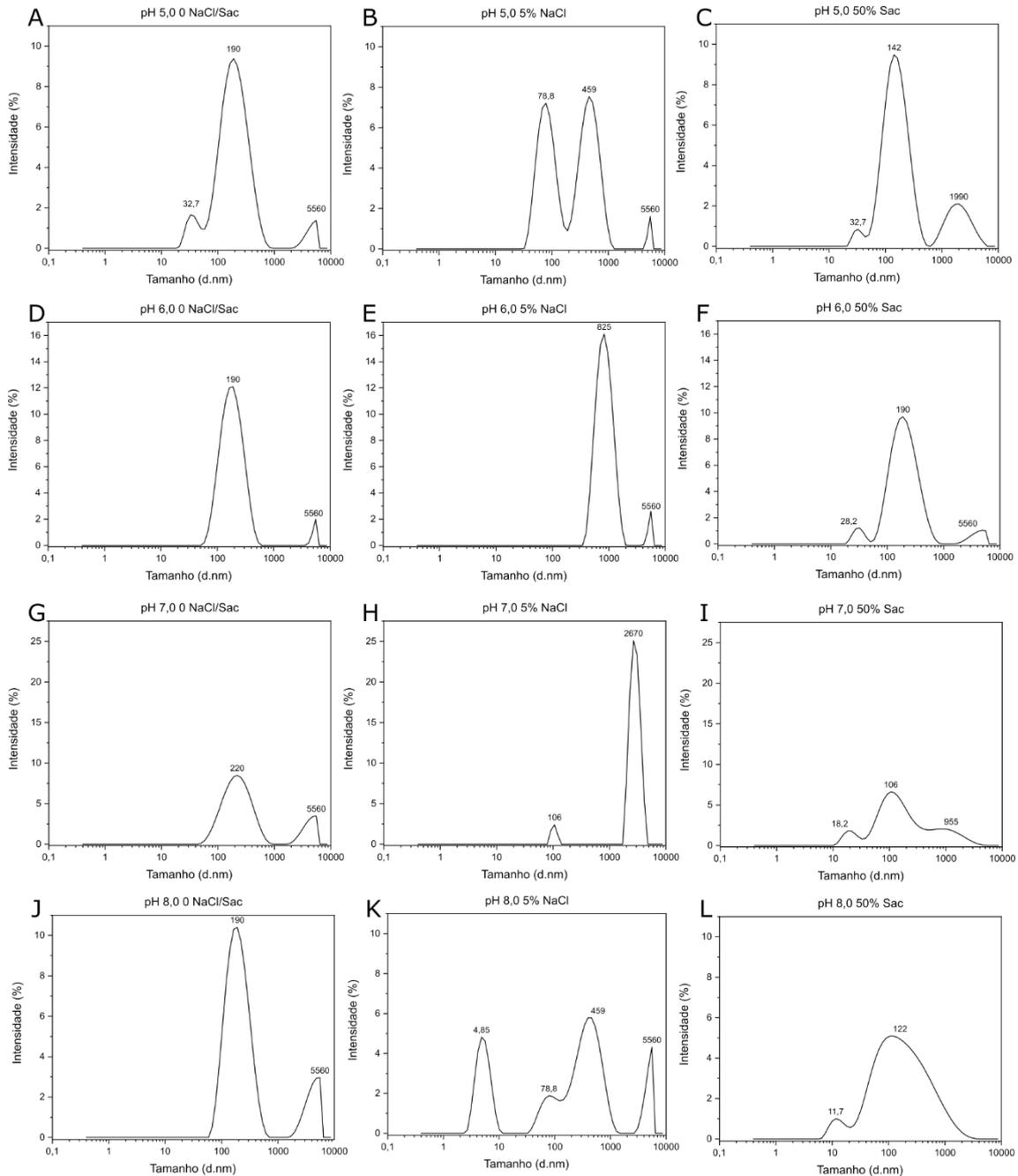
Para o pH 6,0 observou-se atividade bactericida semelhante para os RLs e RLs combinados com os solutos, e o mesmo se observou para o tamanho das micelas formadas (Figuras 21D, E e F). Em contrapartida, a presença do sal e do açúcar nos valores de pH 7,0 e 8,0, nos quais existe o predomínio de moléculas desprotonadas, resultou em maior alteração nos tamanhos das micelas de RLs formadas com conseqüente melhora na ação antimicrobiana do BS.

Ainda, comparando-se os diferentes valores de pH na presença de 5% de NaCl (Figuras 21B, E, H e K), foi possível notar que a adição de sal resultou na formação de agregados micelares com tamanhos semelhantes, o que também pode estar relacionado com eficácia similar dos RLs observada nestas condições.

Com relação à presença de 5% de sacarose, observou-se um aumento de tamanho dos agregados formados se comparadas às micelas de RLs isoladamente, principalmente em pH 7,0 e 8,0, (Figuras 21I e L), o que corrobora os ensaios de atividade antimicrobiana, nos quais se observou redução dos valores de CIM e CBM para *L. monocytogenes* com a combinação RL-sacarose (Tabela 3).

De modo a melhor caracterizar as soluções de RLs quanto ao tamanho e distribuição de agregados moleculares, realizou-se medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). As curvas de intensidade de espalhamento por tamanho obtidas, nas diferentes condições, estão representadas na Figura 22. Foi possível notar tendências de comportamento para os agregados de RLs formados (300 mg/L) em relação à concentração de NaCl e sacarose presente no meio e os valores de pH.

Figura 22: Curva de distribuição de intensidade de espalhamento de luz por tamanho para ramnolípídeos em solução aquosa (300 mg/L) em diferentes valores de pH contendo 5% (m/v) NaCl e 50% (m/v) sacarose. (A) pH 5,0, (B) pH 5,0 NaCl, (C) pH 5,0 Sac, (D) pH 6,0, (E) pH 6,0 NaCl, (F) pH 6,0 Sac, (G) pH 7,0, (H) pH 7,0 NaCl, (I) pH 7,0 Sac, (J) pH 8,0, (K) pH 8,0 NaCl e (L) pH 8,0 Sac.



Em pH 5,0, e pH 6,0 observou-se que a adição de 5% de NaCl ao meio resultou no deslocamento dos picos de intensidade por tamanho para a direita, indicando a presença de agregados maiores (Figuras 22A, B, D e E). Já na presença de 50% de sacarose (Figuras 22C e F) os agregados de RLs formados aparentam ter tamanhos semelhantes aos das amostras sem aditivos.

Para o pH 7,0, apesar de não se observar um deslocamento, a adição do sal acarretou aumento de intensidade no pico de maior tamanho, 2670 nm, o que indica o predomínio de estruturas maiores em solução (Figuras 22G e H). E para o pH 8,0, observou-se para os RLs isolados um pico de maior intensidade em torno de 190 nm, (Figura 22J), enquanto em 5% de NaCl, o pico foi deslocado para a direita, apresentando-se em torno de 459 nm (Figura 22K).

Os resultados de DLS corroboraram as imagens de microscopia de fluorescência (Figura 21), indicando uma tendência de aumento de tamanho das micelas de RLs formadas na presença dos solutos. Além disso, pode-se observar que mesmo em altas concentrações de sacarose (50%), este efeito ainda foi mais expressivo para a combinação dos RLs com o sal, o que pode estar relacionado com a melhor eficácia antimicrobiana dos RL-NaCl se comparados com a combinação com o açúcar.

Rodrigues, *et al.* (20), também atribuíram, por meio de microscopia de fluorescência e DLS, o favorecimento de micelas de RLs maiores pela adição de NaCl, as quais provavelmente conferem a atividade antimicrobiana ao BS. Fato que pode estar relacionado com a maior solubilização da bicamada de fosfolípidos presentes na membrana celular das bactérias pelas micelas. (105)

Com os valores de índice de polidispersão (PDI), tem-se informações sobre a homogeneidade de distribuição de tamanhos dos agregados de RLs formados em solução, eles variam entre 0, que indica uma amostra monodispersa, e 1, para amostras totalmente heterodispersas. (20)

Analisando-se os resultados obtidos, notou-se uma tendência de pequeno aumento nos valores de PDI com a adição de NaCl e sacarose no meio (Tabela 7), o que pode estar relacionado com maior heterogeneidade nos tamanhos moleculares dos agregados de RLs formados, efeito que também pode ser visualizado pela presença de mais picos nas curvas de intensidade por tamanho. Perker, *et al.* (63), também observaram a heterogeneidade no tamanho de agregados de RLs, e o aumento da polidispersão de acordo com a adição de eletrólitos no meio. De fato, devido aos altos valores de PDI, mesmo sem a adição de solutos, as soluções de RLs (300 mg/L) são caracterizadas como polidispersas e heterogêneas, o que corrobora a presença de diferentes tamanhos de agregados observados nas imagens de microscopia de fluorescência. Rodrigues, *et al.* (20), relataram valores de PDI em torno

de 0,5 para misturas de RLs em pH 7,0, assim como Silva, *et al.* (16), confirmando os resultados deste trabalho.

Tabela 7: Índice de polidispersão (PDI) para soluções aquosas de ramnolípídeos (300 mg/L) em diferentes valores de pH e concentração de NaCl e sacarose.

		pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0
%NaCl/Sacarose	0	0,421±0,007	0,316±0,009	0,428±0,054	0,427±0,012
	5% NaCl	0,585±0,022	0,279±0,005	0,426±0,194	0,465±0,037
	50% Sac	0,533±0,018	0,604±0,009	0,573±0,030	0,991±0,009

Como observado, a adição de NaCl e sacarose à solução resultou em alterações nos valores de CMC dos RLs. Além disso, por meio das imagens de microscopia de fluorescência, pôde-se notar uma tendência de aumento no tamanho dos agregados de RLs formados, mais expressivo para a combinação RL-NaCl, corroborado pela análise de DLS. Concomitantemente, observou-se um ligeiro aumento do valor de PDI, o que sugere uma maior heterogeneidade de tamanhos de agregados presentes em solução, sendo que estes efeitos aparentam ser dependentes do valor de pH do meio.

Para o pH 5,0, no qual a molécula de RL se encontra majoritariamente na forma protonada, observou-se pouca influência da adição de solutos no comportamento dos RLs. O valor de CMC para os RLs isolados neste pH foi o menor encontrado, e a adição de NaCl, e sacarose resultou em pequena variação, assim como observado para os valores de CIM e CBM para *L. monocytogenes* (Tabelas 1 e 3) e para as micelas formadas em solução (Figuras 21A, B e C), as quais já apresentavam maior tamanho mesmo na ausência dos solutos. Tais condições podem estar relacionadas com a melhor eficácia antimicrobiana dos RLs frente as células planctônicas e biofilmes em condições de meio ácido.

Para os valores de pH igual ou maiores a 6,0, observou-se maior variação nos valores de CMC dos RLs, bem como para CIM e CBM frente a *L. monocytogenes*, com a adição do sal e do açúcar, provavelmente devido a atenuação das cargas nas moléculas de RLs pelos íons Na<sup>+</sup> e pelas moléculas de sacarose. Além disso, em combinação com os solutos observou-se uma tendência no aumento de tamanho dos

agregados do BS formados, o que pode estar relacionado com o aumento da eficácia bactericida dos RLs observada. O sal apresentou maior influência sobre o comportamento do BS, provavelmente devido à maior capacidade de neutralização de cargas negativas. Desta forma, sugere-se que o tamanho das micelas de RLs e a presença de cargas nas moléculas podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana do BS.

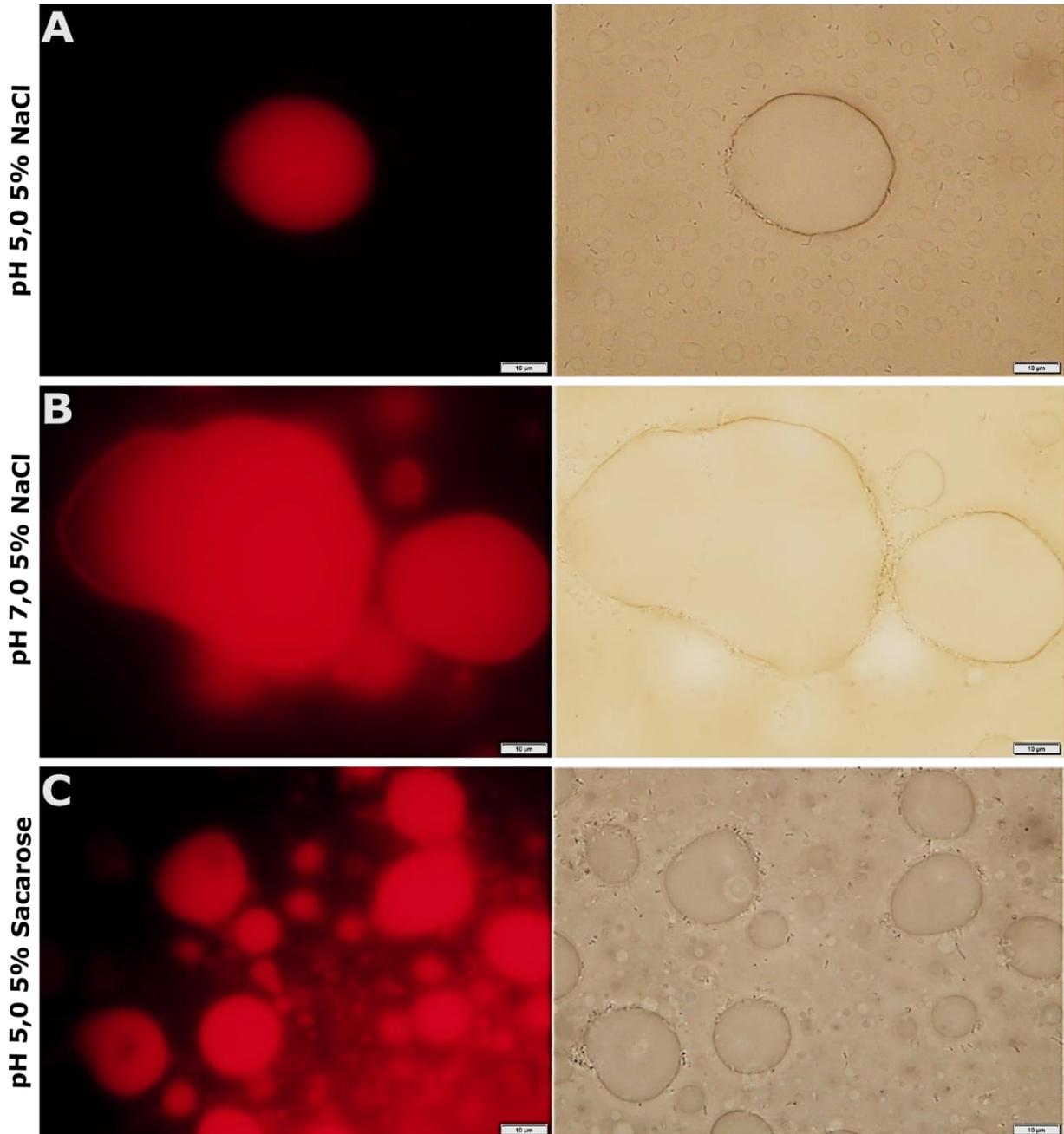
### **5.6.1 Interação das células bacterianas com micelas de RLs.**

Visando observar uma possível interação entre os agregados de RLs e as células de *L. monocytogenes*, foram obtidas imagens de microscopia de fluorescência e microscopia confocal. Trabalhou-se com os valores de pH 5,0 e 7,0, na presença de 5% NaCl e 5% de sacarose.

Observando-se a Figura 23, é possível notar que mesmo sob os diferentes valores de pH e presença dos solutos, as células bacterianas apresentaram a mesma tendência de comportamento, permanecendo próximas às micelas de RLs. Além disso, foi possível diferenciar as células das micelas, uma vez que apenas as moléculas de RLs foram coradas pelo fluoróforo vermelho Nilo.

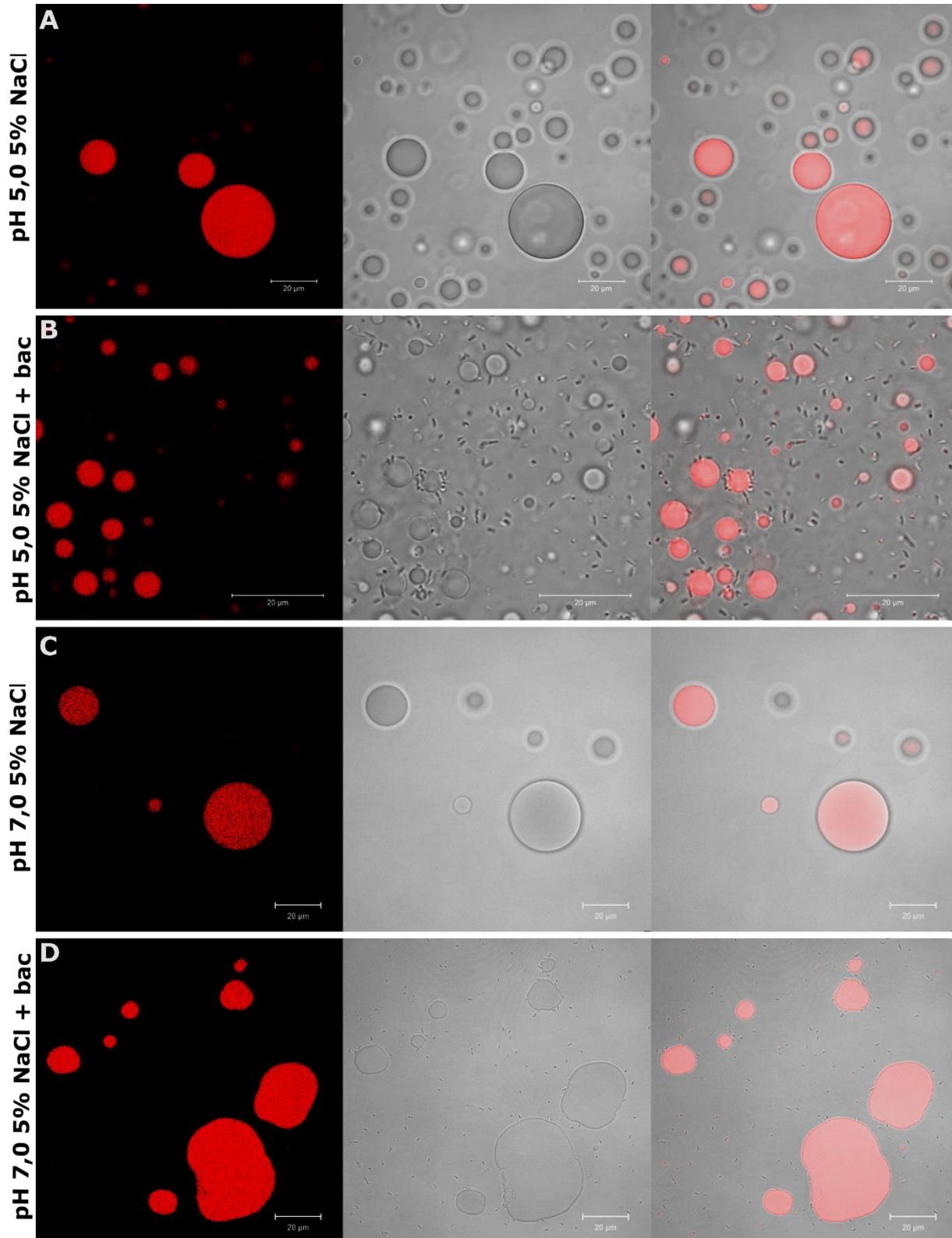
Realizou-se então a microscopia confocal, de modo a verificar com maior resolução, o arranjo de células na presença de micelas de RLs em solução. Optou-se por trabalhar apenas com a combinação RL-NaCl, pois estes apresentaram maior eficácia bactericida nos testes anteriores.

Figura 23: Microscopia de fluorescência de agregados micelares de ramnolipídeos (1000 mg/L) e células de *L. monocytogenes* (ATCC 19112). Imagens obtidas com auxílio de filtro verde (535 nm) e em campo claro. (A) pH 5,0 5% NaCl, (B), pH 7,0 5% NaCl e (C) pH5,0 5% de sacarose. Concentrações de solutos em (m/v).



Analisando-se a Figura 24, é possível notar a mesma tendência de comportamento observada com as imagens de microscopia de fluorescência. Ademais, a presença do microrganismo no meio não afetou a formação de micelas do BS.

Figura 24: Microscopia confocal de agregados micelares de ramnolipídeos (1000 mg/L), e células de *L. monocytogenes* (ATCC 19112). Imagens obtidas com fluorescência, em campo claro e com a sobreposição de ambas. (A) pH 5,0 5% NaCl, (B), pH 5,0 5% NaCl com *L. monocytogenes*, (C) pH 7,0 5% NaCl, (D) pH 7,0 5% NaCl com *L. monocytogenes*.



Comparando-se o sal e o açúcar, não foi possível notar diferenças de comportamento para o microrganismo, de modo que as bactérias tendem a ser atraídas para as proximidades das micelas de RLs quando combinados com ambos.

O mecanismo de ação dos RLs ainda não é completamente elucidado, porém sugere-se que o BS tenha a membrana celular como alvo primário devido à semelhança entre as moléculas, o que pode estar relacionado com a afinidade entre as células de *L. monocytogenes* e as micelas de RLs observada nas imagens de microscopia. (66)

Segundo Sotirova, *et al.* (66), os RLs podem se inserir nas membranas das células bacterianas alterando sua permeabilidade, podendo levar a formação de poros transmembrana que facilitam a entrada de agentes antimicrobianos, chegando a promover eventuais rupturas e conseqüentemente morte celular. Além disso, os BS podem alterar a hidrofobicidade das células, pela redução do conteúdo de lipopolissacarídeos presentes nas membranas. Tais mudanças podem levar a alterações na morfologia das células. (107) Ferreira, *et al.* (15), compararam células controle e células tratadas com RLs por meio de imagens de MEV, nas quais pôde-se observar que algumas das células tratadas com RLs tiveram sua morfologia alterada, apresentando cavidades e aumento da rugosidade, o que corrobora a formação de poros transmembrana e o mecanismo de ação proposto. Estes estudos indicam que a eficácia bactericida dos RLs pode estar relacionada com a alta afinidade das micelas com as membranas bacterianas, o que suporta os resultados obtidos neste trabalho.



## 6. Conclusões

A adição de NaCl e sacarose ao meio resultou em um aumento significativo da eficácia antimicrobiana e antibiofilme dos ramnolipídeos. A linhagem Gram-positiva, *L. monocytogenes*, apresentou maior sensibilidade aos tratamentos, observando-se redução nos valores de CIM e CBM dos RLs com a adição dos solutos, especialmente nos valores de pH 7,0 e 8,0, nos quais se obteve valores de CBM somente para as combinações RL-NaCl e RL-sacarose, além disso, o sal e o açúcar contribuíram para a eliminação da população de células planctônicas viáveis, bem como para a redução e erradicação de biofilmes após 24 horas de tratamento com o BS. A adição de NaCl também contribuiu para a inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa, *E. coli*, pelos RLs, resultando em efeito bacteriostático em células planctônicas. A atividade antimicrobiana dos RLs se mostrou dependente do valor de pH, sendo mais efetiva em pH 5,0, o qual apresenta o predomínio da forma molecular não-iônica.

A presença dos solutos também resultou em aparente aumento de tamanho dos agregados de RLs formados, principalmente em pH 7,0 e 8,0, nos quais as moléculas do BS se encontram majoritariamente na forma aniônica, sendo este efeito mais expressivo para a adição do sal, além disso, observou-se uma redução nos valores de CMC com o aumento da concentração de NaCl e em menores concentrações de sacarose, o que sugere uma relação entre a agregação micelar e a eficácia da atividade bactericida dos RLs. A adição de NaCl ao meio resultou em maior influência sobre o comportamento do BS, principalmente nos valores de pH neutro e alcalino, provavelmente devido à neutralização das cargas negativas presentes nas moléculas dos RLs, o que pode facilitar a interação de micelas do BS com as membranas das células bacterianas, com consequente ação bactericida.

As combinações RL-NaCl e RL- sacarose apresentaram ação antimicrobiana contra as bactérias testadas, em uma ampla faixa de pH, o que torna promissora sua exploração no desenvolvimento de estratégias inovadoras para o controle de patógenos na indústria de alimentos.



## **7. Sugestões para trabalhos futuros**

- Avaliar atividade dos RLs e suas combinações com os solutos sobre biofilmes formados por maior período, além de biofilmes multiespécies;
- Avaliar atividade antimicrobiana de homólogos de RLs puros, mono-RL e di-RL;
- Realizar testes antimicrobianos em modelos alimentares contendo NaCl e sacarose;
- Verificar a morfologia dos agregados moleculares de RLs por meio de Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-EM);
- Verificar eficácia antimicrobiana frente a menores populações de microrganismos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, Cary, v. 68, n. 5, p. 257–269, Apr. 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2010.00286.x>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 2 BRYAN, F. L. Diseases transmitted by foods ( a classification and summary). Atlanta: U.S. Department of Health And Human Services, 1982. p. 101.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne diseases. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_2). Acesso em: 7 dez. 2022.
- 4 VIEIRA, K. C. O.; SILVA, H. R. A.; ROCHA, I. P. M.; BARBOZA, E.; ELLER, L. K. W. Foodborne pathogens in the omics era. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 62, n. 24, p. 6726-6741, Aug. 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2021.1905603>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 5 MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Journal of Environmental Health**, Denver, v. 62, n. 7, p. 9–18, 2000.
- 6 BINTSIS, T. Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology**, Springfield, v. 3, n. 3, p. 529–563, 2017. Disponível em: <http://www.aimspress.com/article/id/1494>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 7 GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1–18, May 2018. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00898/full>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 8 APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 95, p. 23–29, Jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.043>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 9 LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 301–305, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.001>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 10 SANTANA-FILHO, A. P.; CAMILIOS-NETO, D.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Evaluation of the structural composition and surface properties of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in different cultivation periods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 175, n. 2, p. 988–995, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-014-1343-y>. Acesso em: 19 fev. 2023.

- 11 JOHANN, S.; SEILER, T.B.; TISO, T.; BLUHM, K.; BLANK, L. M.; HOLLERT, H. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 548–549, p. 155–163, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.066>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 12 JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 275, p. 102061, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 13 GAUR, V. K.; TRIPATHI, V.; GUPTA, P.; DHIMAN, N.; REGAR, R. K.; GAUTAM, K.; SRIVASTAVA, J. K.; PATNAIK, S.; PATEL, D. K.; MANICKAM, N. Rhamnolipids from *Planococcus spp.* and their mechanism of action against pathogenic bacteria. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 307, p. 123206, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123206>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 14 MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; LING, M. H.; MELO, C. C.; PLEPIS, A. M. G.; MEYER, R. L.; NITSCHKE, M. Combination of rhamnolipid and chitosan in nanoparticles boosts their antimicrobial efficacy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 12, n. 5, p. 5488–5499, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmi.9b19253>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 15 FERREIRA, J. F.; VIEIRA, E. A.; NITSCHKE, M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. **Food Research International**, Amsterdam, v. 116, p. 737–744, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.005>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 16 SILVA, S. S.; CARVALHO, J. W. P.; AIRES, C. P.; NITSCHKE, M. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 100, n. 10, p. 7864–7873, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13012>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 17 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**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 441–447, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 18 MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 138–142, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.009>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 19 BACCILE, N.; SEYRIG, C.; POIRIER, A.; ALONSO- CASTRO, S.; ROELANTS, S. L. K. W.; ABEL, S. Self-assembly, interfacial properties, interactions with macromolecules and molecular modelling and simulation of microbial bio-based amphiphiles (biosurfactants). A tutorial review. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 23, n. 11, p. 3842–3944, 2021. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D1GC00097G>. Acesso em: 19 fev. 2023.

- 20 RODRIGUES, A. I.; GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 12907, Dec. 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13424-x>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 21 TAORMINA, P. J. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 50, n. 3, p. 209–227, Mar. 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408391003626207>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 22 DONNENBERG, M. S.; NARAYANAN, S. How to diagnose a foodborne illness. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 535–554, Sept. 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552013000408>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 23 KIRK, M. D.; PIRES, S. M.; BLACK, R. E.; CAIPO, M.; CRUMP, J. A.; DEVLEESSCHAUWER, B.; DÖPFER, D.; FAZIL, A.; FISCHER-WALKER, C. L.; HALD, T.; HALL, A. J.; KEDDY, K. H.; LAKE, R. J.; LANATA, C. F.; TORGERSON, P. R.; HAVELAAR, A. H.; ANGULO, F. J. World Health Organization estimates of the global and regional disease Burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLOS Medicine**, San Francisco, v. 12, n. 12, p. 1–21, Dec. 2015. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001921>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 24 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico 32**. Rio de Janeiro: AGRJ 2020. Disponível em: <https://socgastro.org.br/novo/2020/08/ao-ano-brasil-tem-mais-de-600-surtos-de-doencas-transmitidas-por-agua-e-comida/>. Acesso em: 8 dez. 2022.
- 25 AIJUKA, M.; BUYS, E. M. Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: Implications for food safety and public health. **Food Microbiology**, London, v. 82, p. 363–370, Mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.018>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 26 CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 26, n. 4, p. 822–880, Oct. 2013. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00022-13>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- 27 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa N°60**, de 23 de dezembro de 2019. Brasília: 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356#wrapper>. Acesso em: 9 dez. 2022.
- 28 SANTOS, J. S.; BIDUSKI, B.; SANTOS, L. R. *Listeria monocytogenes*: health risk and a challenge for food processing establishments. **Archives of Microbiology**,

New York, v. 203, n. 10, p. 5907–5919, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02590-2>. Acesso em: 19 fev. 2023.

29 BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G. M.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C.; WHITING, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, Oxford, v. 75, p. 1–13, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>. Acesso em: 19 fev. 2023.

30 RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 32–46, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>. Acesso em: 19 fev. 2023.

31 RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, New York, v. 52, p. 1701-1718, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>. Acesso em: 19 fev. 2023.

32 MAGANA, M.; SERETI, C.; IOANNIDIS, A.; MITCHELL, C. A.; BALL, A. R.; MAGIORKINIS, E.; CHATZIPANAGIOTOU, S.; HAMBLIN, M. R.; HADJIFRANGISKOU, M.; TEGOS, G. P. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 31, n. 3, p. 1–49, Jul. 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00084-16>. Acesso em: 19 fev. 2023.

33 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **EFSA Journal**, Hoboken, v. 10, n. 3, Mar. 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2012.2597>. Acesso em: 19 fev. 2023.

34 MIYAZAWA, T.; ITAYA, M.; BURDEOS, G. C.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. A Critical review of the use of surfactant-coated nanoparticles in nanomedicine and food nanotechnology. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 16, p. 3937–3999, Jun. 2021. Disponível em: <https://www.dovepress.com/a-critical-review-of-the-use-of-surfactant-coated-nanoparticles-in-nan-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 19 fev. 2023.

35 MISHRA, M.; MUTHUPRASANNA, P.; PRABHA, K. S.; RANI, P. S.; BABU, I. A. S.; CHANDIRAN, I. S.; ARUNACHALAM, G.; SHALINI, S. Basics and potential applications of surfactants - a review. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 1, n. 4, p. 1354–1365, 2009.

36 SCHRAMM, L. L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G. 2 Surfactants and their applications. **Royal Society of Chemistry. Annual Reports on the Progress of Chemistry. Section C: physical chemistry**, London, v. 99, n. 2, p. 3–48, 2003. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B208499F>. Acesso em: 19 fev. 2023.

37 SCHRAMM, L. L.; KUTAY, S. M. Emulsions and foams in the petroleum industry.

*In: SURFACTANTS: fundamentals and applications in the petroleum industry.* Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 79–118.

38 DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, n. 1, p. 47–64, Mar. 1997. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/membr.61.1.47-64.1997>. Acesso em: 19 fev. 2023.

39 KAUR SEKHON, K. Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, London, v. 03, n. 07, 2012. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/biosurfactant-production-and-potential-correlation-with-esterase-activity-2157-7463.1000133.php?aid=10016>. Acesso em: 19 fev. 2023.

40 NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONCALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 21, n. 5, p. 1562–1566, Oct. 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050198x>. Acesso em: 19 fev. 2023.

41 NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 58, n. 4, p. 631–638, Mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635>. Acesso em: 19 fev. 2023.

42 MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids-next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 162, n. 4, p. 366–380, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>. Acesso em: 19 fev. 2023.

43 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**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 604–20, Nov. 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975006000966>. Acesso em: 19 fev. 2023.

44 NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in the food industry. *In: BIOSURFACTANTS research trends and applications.* New York: CRC Press, 2014. p. 177–196.

45 MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A.; MAKHIJANI, K. Green chemistry and biosurfactant research. *In: BIOSURFACTANTS research trends and applications.* New York: CRC Press, 2014. p. 1–30.

46 NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772–776, set. 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000500013&lng=pt&nrm=iso&tling=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500013&lng=pt&nrm=iso&tling=pt). Acesso em: 19 fev. 2023.

47 NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 18, n. 5, p. 252-259, May 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000362>. Acesso em: 19 fev. 2023.

48 THAKUR, P.; SAINI, N. K.; THAKUR, V. K.; GUPTA, V. K.; SAINI, R. V.; SAINI, A. K. Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microbial Cell Factories**, New York, v. 20, n. 1, p. 1, Dec. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01497-9>. Acesso em: 19 fev. 2023.

49 RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: production and application prospects in the food industry. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 36, n. 5, p. 1–16, Sept. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btpr.3030>. Acesso em: 19 fev. 2023.

50 ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, May 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2498-2>. Acesso em: 19 fev. 2023.

51 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**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 621–630, Mar. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.012>. Acesso em: 19 fev. 2023.

52 CHEN, J.; WU, Q.; HUA, Y.; CHEN, J.; ZHANG, H.; WANG, H. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 101, n. 23–24, p. 8309–8319, Oct. 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8554-4>. Acesso em: 19 fev. 2023.

53 PORNUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 6–15, Aug. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509001076>. Acesso em: 19 fev. 2023.

54 BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 1–8, Jan 2004. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>. Acesso em: 19 fev. 2023.

55 PIRÔLLO, M. P. S.; MARIANO, A. P.; LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G. V. A. O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site.

**Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 105, n. 5, p. 1484–1490, Nov. 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2008.03893.x>. Acesso em: 19 fev. 2023.

56 UNITED STATES. Environmental Protection Agency. Rhamnolipid biosurfactant fact sheet. n. 110029. Washington: 2004. Disponível em: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-110029\\_01-May-04.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-110029_01-May-04.pdf). Acesso em: 10 dez.2022.

57 SINUMVAYO, J. P. Agriculture and food applications of rhamnolipids and its production by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, Brussels, v. 06, n. 02, p. 2–9, 2015. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/agriculture-and-food-applications-of-rhamnolipids-and-its-production-bypseudomonas-aeruginosa-2157-7048-1000223.php?aid=52509>. Acesso em: 19 fev. 2023.

58 FARN, R. J. **Chemistry and technology of surfactants**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. p. 1–315.

59 RAZA, Z. A.; KHALID, Z. M.; KHAN, M. S.; BANAT, I. M.; REHMAN, A.; NAEEM, A.; SADDIQUE, M. T. Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 6, p. 811–816, Jun. 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-010-0216-x>. Acesso em: 19 fev. 2023.

60 SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J. A.; MANRESA, Á.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 307, n. 1, p. 246–253, Mar. 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706011088>. Acesso em: 19 fev. 2023.

61 ABBASI, H.; NOGHABI, K. A.; HAMED, M. M.; ZAHIRI, H. S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; AMANLOU, M.; TERUEL, J. A.; ORTIZ, A. Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 101, p. 256–265, Jan. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.035>. Acesso em: 19 fev. 2023.

62 ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAHORA, H.; YAMAGUCHI, M.; NAKAHARA, H.; TOSHIO KAMATA. The pH-Sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. **Chemistry Letters**, Osaka, p. 763–766, 1987.

63 HELVAC, S. S.; PEKER, S.; ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 35, n. 3–4, p. 225–233, Jun. 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776504000104>. Acesso em: 19 fev. 2023.

64 CHAUHAN, S.; JYOTI, J.; PATHANIA, L.; UMAR, A.; CHAUHAN, M. S.

Carbohydrate-surfactant interactions in aqueous and mixed organic solvents at various temperatures: volumetric, compressibility and acoustical studies. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 218, p. 637–648, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.078>. Acesso em: 19 fev. 2023.

65 ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). **The Journal of Antibiotics**, New York, v. 24, n. 12, p. 855–859, 1971. Disponível em: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/24.855?from=CrossRef>. Acesso em: 19 fev. 2023.

66 SOTIROVA, A. V.; SPASOVA, D. I.; GALABOVA, D. N.; KARPENKO, E.; SHULGA, A. Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 6, p. 639–644, Jun. 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-008-9139-3>. Acesso em: 19 fev. 2023.

67 OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: same but different? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, Amsterdam, v. 1859, n. 4, p. 639-649, Apr. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273616303261>. Acesso em: 19 fev. 2023.

68 MIRELES, J. R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. M. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 20, p. 5848–5854, Oct. 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>. Acesso em: 19 fev. 2023.

69 HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 81, n. 3, p. 316-22, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12474254/>. Acesso em: 19 fev. 2023.

70 COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1511–1516, Sept. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951131000214X>. Acesso em: 19 fev. 2023.

71 DASHTBOZORG, S. S.; MIAO, S.; LU-KWANG, J. Rhamnolipids as environmentally friendly biopesticide against plant pathogen *Phytophthora sojae*. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, Hoboken, v. 35, n. 1, p. 169–173, Jan. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ep.12187>. Acesso em: 19 fev. 2023.

72 KIM, L. H.; JUNG, Y.; YU, H-W.; CHAE, K-J.; KIM, I. S. Physicochemical Interactions between Rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. **Environmental Science & Technology**, Washington v. 49, n. 6, p. 3718–3726, Mar. 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es505803c>. Acesso em: 19 fev. 2023.

73 ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 36, p. 26–36, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>. Acesso em: 19 fev. 2023.

74 MOUAFO, H. T.; MBAWALA, A.; SOMASHEKAR, D.; TCHOUGANG, H. M.; HAROHALLY, N. V.; NDJOUENKEU, R. Biological properties and structural characterization of a novel rhamnolipid like-biosurfactants produced by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* TM1B. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Hoboken, v. 68, n. 3, p. 585–596, Jun. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bab.1966>. Acesso em: 19 fev. 2023.

75 SABARINATHAN, D.; VANARAJ, S.; SATHISKUMAR, S.; POORNA CHANDRIKA, S.; SIVARASAN, G.; ARUMUGAM, S. S.; PREETHI, K.; LI, H.; CHEN, Q. Characterization and application of rhamnolipid from *Pseudomonas plecoglossicida* BP03. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 72, n. 3, p. 251–262, mar. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13403>. Acesso em: 19 fev. 2023.

76 CHLUMSKY, O.; SMITH, H. J.; PARKER, A. E.; BRILEYA, K.; WILKING, J. N.; PURKRTOVA, S.; MICHOVA, H.; ULBRICH, P.; VIKTOROVA, J.; DEMNEROVA, K. Evaluation of the antimicrobial efficacy of n-acetyl-l-cysteine, rhamnolipids, and usnic acid—novel approaches to fight food-borne pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 21, 2021.

77 BERTUSO, P. C.; MARANGON, C. A.; NITSCHKE, M. Susceptibility of vegetative cells and endospores of *Bacillus cereus* to rhamnolipid biosurfactants and their potential application in dairy. **Microorganisms**, Basel, v. 10, n. 9, p. 1860, Sept. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/9/1860>. Acesso em: 19 fev. 2023.

78 CARVALHO, D.; MENEZES, R.; CHITOLINA, G. Z.; KUNERT-FILHO, H. C.; WILSMANN, D. E.; BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; DO NASCIMENTO, V. P. Antibiofilm activity of the biosurfactant and organic acids against foodborne pathogens at different temperatures, times of contact, and concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology**, New York, v. 53, n. 2, p. 1051–1064, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00714-4>. Acesso em: 19 fev. 2023.

79 CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; approved standard**. 9. ed. Pittsburgh: Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 32, n. 2, Jan. 2012.

80 BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>. Acesso em: 19 fev. 2023.

81 MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Epidemiology and Infection**, New York, v. 38, n. 6, p. 732–749, Nov. 1938. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S002217240001158X/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S002217240001158X/type/journal_article). Acesso em: 19 fev. 2023.

82 PASSOS, T. F.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; SOUZA, C. W. O. Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against *Staphylococcus aureus*. **Materials Science and Engineering C- Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 118, p. 111475, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111475>. Acesso em: 19 fev. 2023.

83 HARRISON, J. J.; STREMICK, C. A.; TURNER, R. J.; ALLAN, N. D.; OLSON, M. E.; CERI, H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. **Nature Protocols**, Berlin, v. 5, n. 7, p. 1236–1254, Jul. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.71>. Acesso em: 19 fev. 2023.

84 DU NOUY, L. P. A new apparatus for measuring surface tension. **The Journal of General Physiology**, New York, p. 521–524, Mar. 1919.

85 AYGAN, A.; ARIKAN, B. Mini review an overview on bacterial motility detection. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 9, n. 1, p. 193–196, 2007.

86 JAIN, A.; JAIN, R.; JAIN, S. Motility testing – hanging drop method and stab. *In*: BASIC techniques molecular biology microbiology and in biochemistry principles and techniques. New York: Humana Press, p. 121–122.

87 SHAMLOO, E.; ABDIMOGHADAM, Z.; NAZARI, K.; HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; ALEBOUYEH, M. Long term survival of *Listeria monocytogenes* in stress conditions: high pH and salt concentrations. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, Jamnagar, v. 6, n. 6, p. 96–100, 2018.

88 FOOD STANDARDS. **Listeria monocytogenes**. [S. l.], 2007. p. 1–17. Disponível em: [https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Listeria\\_monocytogenes.pdf](https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Listeria_monocytogenes.pdf). Acesso em: 15 jan. 2023.

89 MIZZI, L.; MANISCALCO, D.; GASPARI, S.; CHATZITZIKA, C.; GATT, R.; VALDRAMIDIS, V. P. Assessing the individual microbial inhibitory capacity of different sugars against pathogens commonly found in food systems. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 251–258, Sept. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13306>. Acesso em: 19 fev. 2023.

90 SJOLLEMA, J.; ZAAT, S. A. J.; FONTAINE, V.; RAMSTEDT, M.; LUGINBUEHL,

R.; THEVISSSEN, K.; LI, J.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. In *vitro* methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 70, p. 12–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.001>. Acesso em: 19 fev. 2023.

91 KONATÉ, K.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGUÉ, A. N.; AWORET-SAMSENY, R. R.; HILOU, A.; SOUZA, A.; DICKO, M. H.; M'BATCHI, B. Antibacterial activity against  $\beta$ -lactamase producing methicillin and ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, London, v. 11, n. 1, p. 18, Jun. 2012. Disponível em: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-11-18>. Acesso em: 19 fev. 2023.

92 GALINSKI, E. A.; TRÜPER, H. G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 15, n. 2–3, p. 95–108, Oct. 1994. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x>. Acesso em: 19 fev. 2023.

93 PADAN, E.; BIBI, E.; ITO, M.; KRULWICH, T. A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, Amsterdam, v. 1717, n. 2, p. 67–88, Nov. 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273605002865>. Acesso em: 19 fev. 2023.

94 ARCARI, T.; FEGER, M-L.; GUERREIRO, D. N.; WU, J.; O'BYRNE, C. P. Comparative review of the responses of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* to low pH stress. **Genes**, Basel, v. 11, n. 11, p. 1330, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/11/1330>. Acesso em: 19 fev. 2023.

95 CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 1, p. 121–147, 1989. Disponível em: <https://mmbr.asm.org/content/53/1/121>. Acesso em: 19 fev. 2023.

96 GRANT, W. D. Life at low water activity. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: biological sciences**, London, v. 359, n. 1448, p. 1249–1267, Aug. 2004. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2004.1502>. Acesso em: 19 fev. 2023.

97 GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMENITAŠ, A.; OREN, A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 353–375, May 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/42/3/353/4909803>. Acesso em: 19 fev. 2023.

98 CARRASCOSA, C.; RAHEEM, D.; RAMOS, F.; SARAIVA, A.; RAPOSO, A. Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 18, n. 4, p. 2014, Feb. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7922197/>. Acesso em: 19 fev. 2023.

99 SIDRIM, J. J. C.; OCADAQUE, C. J.; AMANDO, B. R.; GUEDES, G. M.; COSTA, C. L.; BRILHANTE, R. S. N.; A CORDEIRO, R. De; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors. **Future Microbiology**, London, v. 15, n. 12, p. 1109–1121, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2020-0010>. Acesso em: 19 fev. 2023.

100 ARAUJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V. M. J.; SOUZA, M. P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, Oxford, v. 63, p. 171–178, May 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515303078>. Acesso em: 19 fev. 2023.

101 FLEMMING, H.C.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; NEU, T. R.; NIELSEN, P. H.; SEVIOUR, T.; STOODLEY, P.; WINGENDER, J.; WUERTZ, S. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews Microbiology**, Berlin, v. 21, n. 2, p. 70–86, Feb. 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00791-0>. Acesso em: 19 fev. 2023.

102 RIEU, A.; BRIANDET, R.; HABIMANA, O.; GARMYN, D.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 14, p. 4491–4497, Jul. 2008. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00255-08>. Acesso em: 19 fev. 2023.

103 ARGUDO, A.; ZHOU, L.; ROUSSEAU, D. Sugar-sugar interactions in oil suspensions containing surfactants and effects on macroscopic phenomena. **Food Research International**, Amsterdam, v. 157, p. 111217, Apr. 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996922002745>. Acesso em: 19 fev. 2023.

104 ZHOU, C.; WANG, F.; CHEN, H.; LI, M.; QIAO, F.; LIU, Z.; HOU, Y.; WU, C.; FAN, Y.; LIU, L.; WANG, S.; WANG, Y. Selective antimicrobial activities and action mechanism of micelles self-assembled by cationic oligomeric surfactants. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 8, n. 6, p. 4242–4249, Feb. 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.5b12688>. Acesso em: 19 fev. 2023.

105 BAKKAR, M. R.; FARAAG, A. H. I.; SOLIMAN, E. R. S.; FOUUDA, M. S.; SARGUOS, A. M. M.; MCLEAN, G. R.; HEBISHY, A. M. S.; ELKHOULY, G. E.; RAYA, N. R.; ABO-ZEID, Y. Rhamnolipids nano-micelles as a potential hand sanitizer. **Antibiotics**, Basel, v. 10, n. 7, p. 751, Jun. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/7/751>. Acesso em: 19 fev. 2023.

106 KONDO, T.; YASUI, C.; BANNO, T.; ASAKURA, K.; FUKUOKA, T.; USHIMARU, K.; KOGA, M.; MINAMIKAWA, H.; SAIKA, A.; MORITA, T.; TAKAHASHI, D.; TOSHIMA, K. Self-assembling properties and recovery effects on damaged skin cells

of chemically synthesized mannosylerythritol lipids. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 23, n. 2, p. 6–11, Jan. 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.202100631>. Acesso em: 19 fev. 2023.

107 HERZOG, M.; TISO, T.; BLANK, L. M.; WINTER, R. Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, Amsterdam, v. 1862, n. 11, p. 183431, Nov. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273620302741>. Acesso em: 19 fev. 2023.



## APÊNDICE

### APÊNDICE A- Triagem de microrganismos

#### Efeito do NaCl

Ao se avaliar o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com relação à sua tolerância à concentração (%m/v) de NaCl presente no meio de cultura TSYEB (Tabelas 8, 9 e 10), pode-se destacar que para a maioria das linhagens testadas a quantidade limitante foi a de 5% de NaCl.

Tabela 8: Sensibilidade de linhagens de *L. monocytogenes* às concentrações crescentes de NaCl.

%NaCl	Linhagens			
	ATCC 7644	ATCC 15313	ATCC 19112	ATCC 19117
	0	+++	+++	+++
1%	+++	+++	+++	+++
2%	+++	+++	+++	+++
5%	+++	+++	+++	+++
7,5%	+	+	+	+
10%	-	-	-	-

+  -

Tabela 9: Sensibilidade de linhagens de *B. cereus* às concentrações crescentes de NaCl.

%NaCl	Linhagens				
	ATCC 10876	ATCC 11778	ATCC 33018	ATCC 33019	CCGB 0426
	0	+++	++	++	+++
1%	+++	++	++	+++	+++
2%	+++	++	++	+++	+++
5%	++	++	1/2+	+++	+++
7,5%	+	1/2+	1/6+	1/2+	1/2+
10%	-	-	-	-	-

+  -

Tabela 10: Sensibilidade de linhagens de *E.coli* e *S.enterica* às concentrações crescentes de NaCl.

	Linhagens			
	<i>E. coli</i>		<i>S. enterica</i>	
	ATCC 43895	ATCC 25922	ATCC 13076	ATCC 14028
0	+++	+++	+++	+++
1%	+++	+++	+++	+++
2%	+++	+++	+++	+++
5%	++	++	++	++
7,5%	-	1/2+	1/4+	+
10%	-	-	1/6+	1/6+

+  -

Combinando-se as variáveis, concentração de NaCl e pH, pode-se observar como representado nas Tabelas 11, 12, 13, e 14, uma redução no crescimento bacteriano em meio TSYEB em pH 5,0 quando comparados com pH 6,0, 7,0 e 8,0, principalmente para as linhagens de bactérias Gram-positivas, e a concentração limitante de NaCl manteve-se em 5% (m/v).

Tabela 11: Crescimento microbiano das linhagens de *L. monocytogenes* de acordo com variações de NaCl e pH.

ATCC 7644					ATCC 15313					
	%NaCl	pH				%NaCl	pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0		5,0	6,0	7,0	8,0
0		++	+++	+++	+++	1/2+	+++	+++	+++	
1%		1/2+	+++	+++	+++	1/2+	+++	+++	+++	
2%		1/2+	+++	+++	++	1/2+	+++	+++	+++	
5%		1/2+	++	+++	++	1/2+	+++	+++	+++	
7,5%		1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	
10%		-	1/2+	1/2+	1/2+	-	1/2+	1/2+	1/2+	

ATCC 19112					ATCC 19117					
	%NaCl	pH				%NaCl	pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0		5,0	6,0	7,0	8,0
0		1/2+	+++	+++	+++	1/2+	+++	+++	+++	
1%		1/2+	+++	+++	+++	1/2+	+++	+++	+++	
2%		1/2+	+++	+++	+++	1/2+	+++	+++	+++	
5%		1/2+	+++	+++	+++	1/2+	+++	+++	+++	
7,5%		1/4+	1/2+	1/2+	++	1/2+	++	++	++	
10%		-	1/4+	1/4+	1/4+	-	1/2+	1/2+	1/2+	

+  -

Tabela 12: Crescimento microbiano das linhagens de *E. coli* de acordo com variações de NaCl e pH.

ATCC 43895					ATCC 25922						
	%NaCl	pH					%NaCl	pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0			5,0	6,0	7,0	8,0
	0	+++	+++	+++	+++		0	+++	+++	+++	+++
	1%	+++	+++	+++	+++		1%	+++	+++	+++	+++
	2%	+++	+++	+++	+++		2%	+++	+++	+++	+++
	5%	++	++	++	+		5%	++	++	++	++
	7,5%	1/6+	1/6+	-	-		7,5%	-	1/4+	1/4+	1/4+
	10%	-	-	-	-		10%	-	-	-	-

+ -

Tabela 13: Crescimento microbiano das linhagens de *S. enterica* de acordo com variações de NaCl e pH.

ATCC 14028					ATCC 13076						
	%NaCl	pH					%NaCl	pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0			5,0	6,0	7,0	8,0
	0	++	+++	+++	+++		0	++	+++	+++	+++
	1%	++	+++	+++	+++		1%	++	+++	+++	+++
	2%	++	+++	+++	+++		2%	++	+++	+++	+++
	5%	+	++	++	++		5%	+	++	++	++
	7,5%	+	+	+	+		7,5%	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+
	10%	1/8+	1/8+	1/8+	1/8+		10%	-	1/8+	1/8+	1/8+

+ -

Tabela 14: Crescimento microbiano das linhagens de *B. cereus* de acordo com variações de NaCl e pH.

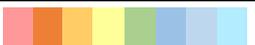
ATCC 10876					ATCC 11778				
%NaCl	pH				%NaCl	pH			
	5,0	6,0	7,0	8,0		5,0	6,0	7,0	8,0
0	+	++	+++	+++	0	+	++	+++	+++
1%	1/2+	++	+++	+++	1%	1/2+	+	+++	+++
2%	1/4+	++	+++	+++	2%	1/4+	+	+++	+++
5%	1/8+	+	++	++	5%	1/6+	1/4+	+	+
7,5%	-	1/8+	+	+	7,5%	1/8+	1/6+	1/6+	1/6+
10%	-	-	1/8+	1/8+	10%	-	-	-	-

ATCC 33018					ATCC 33019				
%NaCl	pH				%NaCl	pH			
	5,0	6,0	7,0	8,0		5,0	6,0	7,0	8,0
0	+++	+++	+++	+++	0	++	+++	+++	+++
1%	++	+++	+++	+++	1%	++	+++	+++	+++
2%	+	++	++	++	2%	+	+++	+++	+++
5%	-	1/8+	+	+	5%	-	+	+	+
7,5%	-	-	1/6+	1/6+	7,5%	-	1/8+	1/6+	1/6+
10%	-	-	-	-	10%	-	-	-	-

CCGB 0426				
%NaCl	pH			
	5,0	6,0	7,0	8,0
0	++	+++	+++	+++
1%	++	+++	+++	+++
2%	+	+++	+++	+++
5%	-	+	++	++
7,5%	-	1/8+	1/6+	1/6+
10%	-	-	-	-

+  -

A partir desta triagem inicial, definiu-se para os próximos ensaios, a concentração máxima de 5% (m/v) de NaCl em meio de cultura TSYEB, além de se variar o pH das soluções em uma faixa de 5,0, a 8,0. Selecionou-se então as linhagens, *L. monocytogenes* (ATCC 19112), *E. coli* (ATCC 25922), *S. enterica* (14028) e *B. cereus* (33018).

Nos testes de determinação de CIM e CBM, para a linhagem de *B. cereus* (ATCC 33018), também pôde-se observar uma ligeira melhora na ação bactericida dos RLs conforme adição de NaCl no meio de cultivo (Tabela 15). Porém como em pH 5,0 o aumento da concentração de NaCl no meio inibe o crescimento do microrganismo, optou-se por não dar seguimento ao trabalho com esta bactéria.

Tabela 15: Efeito da variação de pH e concentração de NaCl na atividade antimicrobiana de RLs frente a *B. cereus* (ATCC 33018).

	%NaCl												
	0		1%		2%		3%		4%		5%		
	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	CIM*	CBM**	
pH	5,0	4,8	4,8	4,8	9,7	4,8	9,7	-	-	-	-	-	-
	6,0	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	4,8	4,8
	7,0	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
	8,0	78,1	78,1	39,0	39,0	39,0	39,0	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5

\*CIM- Concentração Inibitória Mínima \*\*CBM- Concentração Bactericida Mínima. Concentrações de ramnolípídeos utilizadas estão em mg/L.

Ademais, foram testadas linhagens de *S. enterica* (ATCC 13076), (ATCC 14028) e (ATCC 19430), *S. choleraesuis* (INCQS 00238), *E. coli* (ATCC 43895) e *C. sakasaki* (ATCC 29004), porém estas não apresentaram valores de CIM para os RLs, RL-NaCl dentro das condições testadas (CIM >2500 mg/L).

### Efeito da sacarose

A adição das diferentes concentrações de sacarose ao meio TSYEB (0-50% m/v), apresentaram pouca influência no crescimento bacteriano de *L. monocytogenes* e *E.coli* (Tabela 16), sendo possível a utilização de até 50% de sacarose para realização dos ensaios com os RLs.

Neste experimento, foi necessário o uso do corante MTT, (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* 98%- Sigma®), para melhor visualização do crescimento microbiano, pois para as maiores concentrações de açúcar testadas, 30%, 40% e 50%, não foi possível notar aumento de turbidez dos meios após incubação com os microrganismos.

Tabela 16: Crescimento microbiano\* das linhagens de *L. monocytogenes* e *E.coli* de acordo com variações de sacarose e pH.

<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112					<i>E. coli</i> ATCC 25922						
		pH						pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0			5,0	6,0	7,0	8,0
%SAC	0	+++	+++	+++	+++	%SAC	0	+++	+++	+++	+++
	5%	+++	+++	+++	+++		5%	+++	+++	+++	+++
	10%	+++	+++	+++	+++		10%	+++	+++	+++	+++
	20%	+++	+++	+++	+++		20%	+++	+++	+++	+++
	25%	++	++	++	++		25%	+++	+++	+++	+++
	30%	++	++	++	++		30%	+++	+++	+++	+++
	40%	++	++	++	++		40%	+++	+++	+++	+++
50%	++	++	++	++	50%	+++	+++	+++	+++		

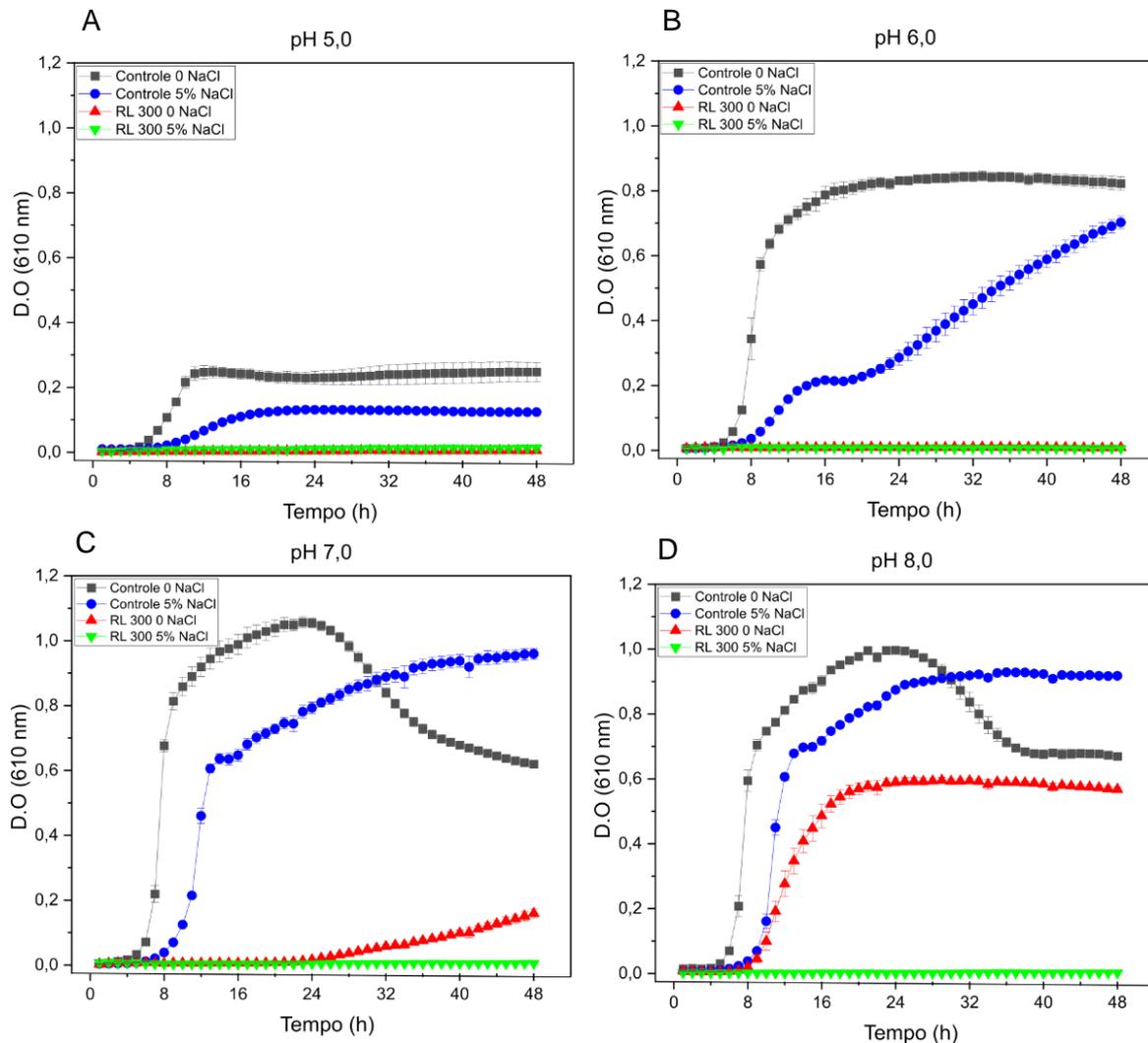
+  - 

\*Classificação de crescimento feita com base na intensidade da coloração após aplicação do corante MTT.

### **APÊNDICE B- Perfil de crescimento microbiano, valores de densidade óptica pelo tempo, na presença de RLs-NaCl**

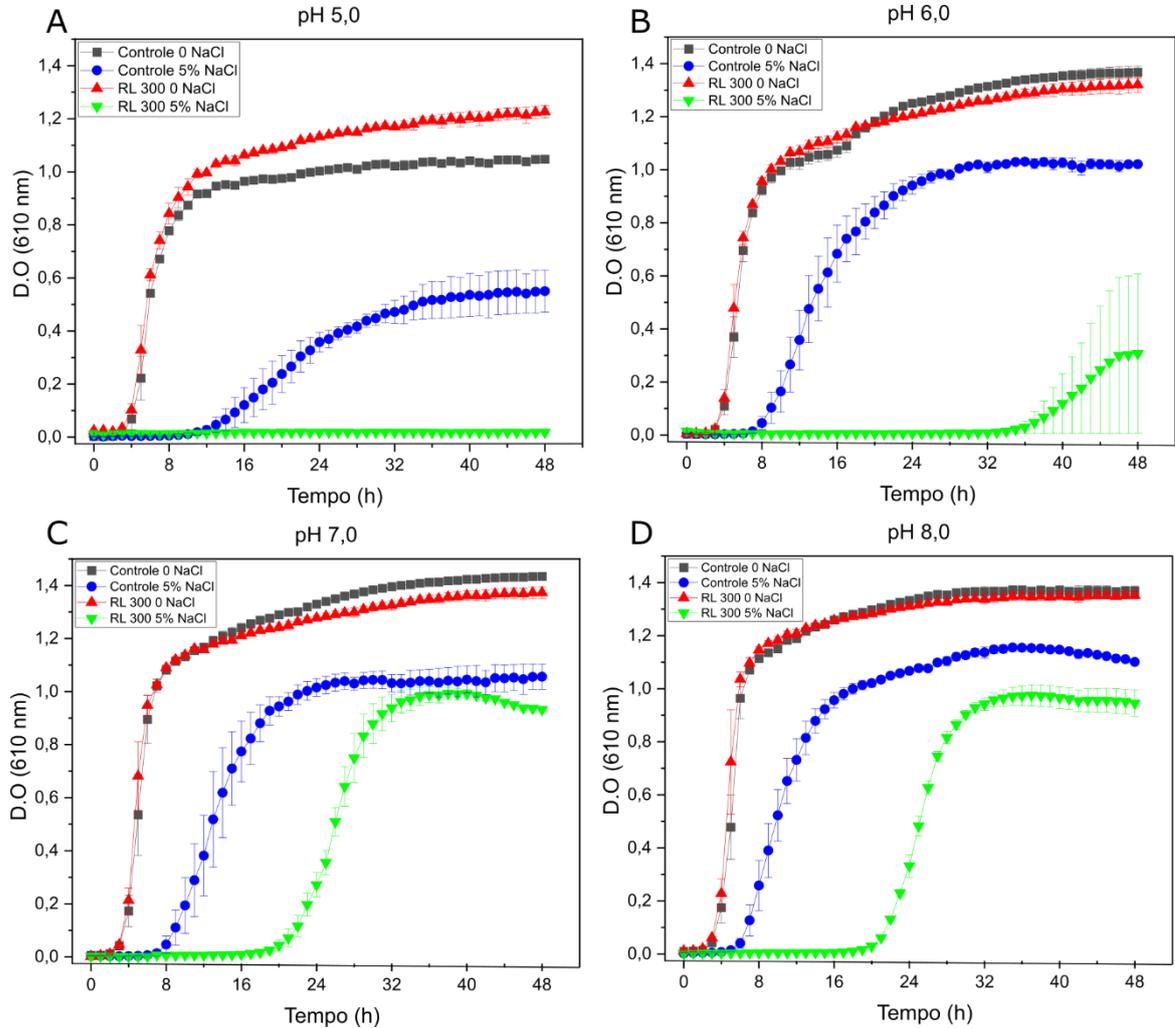
A Figura 25 representa o perfil de crescimento para *L. monocytogenes* após 48 horas de incubação em contato com 300 mg/L de RLs. Comparando-se os diferentes valores de pH, é possível notar que em pH 5,0 e 6,0, não se observou diferença significativa entre os tratamentos com RLs sem adição de NaCl e contendo 5% (m/v), sendo os RLs e a combinação RL-NaCl responsáveis pela redução dos valores de D.O a praticamente 0, (Figuras 25A e B). Em contrapartida, para o pH 7,0, constatou-se para os RLs na ausência de NaCl, um aumento nos valores de D.O após 24 horas de incubação, (Figura 25C) e para o pH 8,0 a diferença entre os tratamentos com RLs se tornou mais evidente, observando-se valores de D.O próximos de 0 somente em meio contendo 5% de NaCl, (Figura 25D).

Figura 25: Perfil de crescimento *L. monocytogenes* ATCC 19112 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs em 0 e 5% de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0.



Realizou-se o mesmo ensaio para *E.coli*, (Figura 26). É possível observar que independentemente do valor de pH, as amostras tratadas com 300 mg/L de RLs na ausência de NaCl apresentaram valores de D.O. semelhantes às amostras controle, sem adição do BS. Ademais, quando na presença de 5% de NaCl, observou-se a redução no crescimento microbiológico pelos RLs, principalmente nas primeiras 24 horas de incubação.

Figura 26: Perfil de crescimento *E.coli* ATCC 25922 em diferentes valores de pH, na presença de 300 mg/L de RLs em 0 e 5% de NaCl. (A) pH 5,0, (B) pH 6,0, (C) pH 7,0 e (D) pH 8,0.



Assim como nos ensaios para determinação das curvas de crescimento, para ambas as bactérias testadas, foi possível notar uma diferença significativa entre os tratamentos realizados sem adição e em meios contendo 5% (m/v) de NaCl. O que confirma a hipótese da melhora na eficácia antimicrobiana dos RLs quando na presença do sal.