

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

Amanda Mezete Gouveia

**Efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos
frente à *Staphylococcus aureus***

São Carlos

2023

Amanda Mezete Gouveia

**Efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos
frente à *Staphylococcus aureus***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Bioengenharia da Escola de Engenharia de São
Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto e Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Márcia Nitschke

VERSÃO CORRIGIDA

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

G719E Gouveia, Amanda Mezete
Efeito do Ph e força iônica na atividade antimicrobiana e ramnolipídeos frente à *Staphylococcus aureus* / Amanda Mezete Gouveia ; orientadora Márcia Nitschke. -- São Carlos, 2023.

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Força iônica. 2. Biossurfatante. 3. Biofilmes.
4. Ramnolipídeos. 5. *S. aureus*. I. Título.

Elena Luzia Palloni Gonçalves – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Amanda Mezete Gouveia

Título: "Efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana de ramnolípídeos frente à *Staphylococcus aureus*"

Data da defesa: 30/03/2023

| Comissão Julgadora | Resultado |
|---|--------------------|
| Prof(a). Dr(a). Marcia Nitschke IQSC/USP - Orientadora | <u>Não Votante</u> |
| Prof(a). Dr(a). Léa Chapaval Andri Embrapa Agropecuária Sudeste | <u>Aprovado</u> |
| Prof(a). Dr(a). Fernanda Canduri Instituto de Química de São Carlos - IQSC/USP | <u>Aprovado</u> |
| Prof(a). Dr(a). Nelma Regina Segnini Bossolan Instituto de Física de São Carlos - IFSC/USP | <u>Aprovado</u> |


Prof(a). Dr(a). Marcia Nitschke – Orientadora

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Adair Roberto Aguiar

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Flávio Oliveira Gouveia e Vô Lucidório Rodrigues de Gouveia e às minhas mães Renata Mezete Gouveia e Vó Jane Oliveira Gouveia por todo incentivo e por me ensinarem que a educação é sempre a nossa melhor herança.

À toda minha família que sempre me ajudou, me apoiou e fez tudo que foi possível pela minha formação.

Aos meus colegas de laboratório que sempre foram solícitos e se puseram a disposição – Paulinha, Cris, Tathi e Marcos que são profissionais incríveis com quem pude dividir essa jornada.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana por sempre estarem presentes, principalmente à Marília por ser sempre um anjo e não medir esforços para que tudo dê certo.

À Profa. Dra. Marcia Nitschke, pela confiança, pelo aprendizado e pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC. Ao Instituto de Química de São Carlos, pelo uso de suas instalações e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Agradeço a todos que se fizeram presentes nessa jornada que me permitiu crescer, amadurecer como ser humano, pesquisadora, profissional, biotecnologista e agora, como mestre. Todo apoio foi de grande importância nessa caminhada. Obrigada.

RESUMO

GOUVEIA, M. A. **Efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente ao *Staphylococcus aureus***. 2023. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) causam significativa mortalidade nos países em desenvolvimento, sendo as bactérias os principais agentes responsáveis por estas patologias. As doenças envolvendo *Staphylococcus aureus* podem ser causadas tanto pela infecção quanto pela intoxicação do organismo hospedeiro, devido a ingestão de alimentos contaminados. A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, junto ao interesse por antimicrobianos mais sustentáveis, demanda a busca por métodos alternativos de controle. Neste contexto, a utilização de biossurfactantes (BS), como os ramnolipídeos (RL), se mostra promissora uma vez que apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e sintetizados a partir de fontes renováveis. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH e da força iônica na atividade antimicrobiana dos RL frente a formas planctônicas e sésseis de *S. aureus*. Os resultados revelaram que o aumento do pH de 5 para 8 resultou no aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de 78,12 mg/L para >2500 mg/L. Da mesma forma, a presença de NaCl favoreceu a atividade antimicrobiana dos RL em todos os pH testados, reduzindo os valores de CIM. As células livres de *S. aureus* se mostraram mais sensíveis ao tratamento com RL comparativamente aos biofilmes. Apesar da maior resistência dos biofilmes, a presença de RL foi capaz de reduzir a quantidade de células viáveis em até 3,8 unidades logarítmicas. A força iônica e o pH influenciam de forma significativa a atividade antimicrobiana do RL frente a *Staphylococcus aureus*, sugerindo potencial para aplicação em alimentos ácidos e salgados.

Palavras-chave: Força iônica. Biossurfactante. Biofilmes. Ramnolipídeo. *S. aureus*.

ABSTRACT

GOUVEIA, M. A. **Effect of pH and ionic strength on antimicrobial activity of rhamnolipids against *Staphylococcus aureus***. 2023. Dissertação (Mestrado) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, 2023.

Foodborne diseases (FBD) are important causes of mortality in developing countries and bacteria one of the main agents responsible for such pathologies. *Staphylococcus aureus* are harmful by both infection and intoxication of the host organism caused by the ingestion of contaminated food. Bacterial resistance to conventional antibiotics, together with the interest in more sustainable antimicrobials, demands the search for alternative methods of control. In this context, the use of biosurfactants (BS), such as rhamnolipids (RL), is promising since they have low toxicity, are biodegradable and synthesized from renewable sources. The main objective of this study was to evaluate the effect of pH and ionic strength on antimicrobial activity of RL against planktonic and sessile forms of *S. aureus*. The results show that increasing pH from 5 to 8 also increased the minimal inhibitory concentration (MIC) from 78.12 mg/L to > 2500 mg/L. In the same way, the presence of NaCl improved the antimicrobial activity of RL in all pH tested, reducing the MIC values. Free *S. aureus* cells were more sensitive to RL treatment compared to biofilms. Despite the higher resistance of biofilms, the presence of RL was able to reduce the amount of viable cells in 3.8 log units. Ionic strength and pH has a significant effect on the antimicrobial activity of RL against *Staphylococcus aureus* cells, suggesting potential for application in acidic and salty foods.

Keywords: Ionic strength. Biosurfactant. Biofilm. Rhamnolipid. *S.aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Células de <i>S. aureus</i> capturada por microscopia eletrônica..... | 20 |
| Figura 2: Esquemática das fases de formação de biofilme..... | 24 |
| Figura 3: Representação da estrutura química dos principais homólogos de RL..... | 29 |
| Figura 4: Aplicação de ramnolípídeo no controle de microrganismos..... | 31 |
| Figura 5: Esquema da placa utilizada para construção das curvas de crescimento..... | 37 |
| Figura 6: Esquema da placa utilizada para a pré-formação de biofilmes..... | 38 |
| Figura 7: Esquema demonstrando o inóculo com seus tratamentos após 24h de crescimento..... | 40 |
| Figura 8: Biofilmes de <i>S. aureus</i> formados em cupons de poliestireno..... | 40 |
| Figura 9: Esquema das diluições seriadas seguido da contagem por gotas em placa de Petri..... | 41 |
| Figura 10: Curva do controle de crescimento do <i>S. aureus</i> em diferentes pHs..... | 45 |
| Figura 11: Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> na presença de RL em diferentes valores de pH..... | 46 |
| Figura 12: Efeito da combinação de RL e NaCl (2%) no crescimento de <i>S. aureus</i> em diferentes pHs..... | 47 |
| Figura 13: Efeito da combinação de RL e NaCl (5%) no crescimento de <i>S. aureus</i> em diferentes pHs..... | 47 |
| Figura 14: Remoção de biofilmes de <i>S. aureus</i> pelo tratamento com RL (300 ppm) e NaCl (5%) em diferentes valores de pH..... | 49 |
| Figura 15: Quantificação de células viáveis em biofilmes de <i>S. aureus</i> submetidos a tratamento com RL (300 ppm) e NaCl (5%) sob diferentes valores de pH..... | 51 |
| Figura 16: Quantificação de células viáveis em biofilmes de <i>S. aureus</i> submetidos a tratamento com RL (600 ppm) e NaCl (5%) sob diferentes valores de pH..... | 52 |
| Figura 17: Imagens de microscopia confocal mostrando a ação do RL na ausência e na presença do NaCl em pH 5..... | 55 |
| Figura 18: Imagens de microscopia confocal mostrando a ação do RL na ausência e na presença do NaCl em pH 6..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Principais classes de biossurfatantes e seus microrganismos produtores..... | 28 |
| Tabela 2: Exemplos de diferentes usos do RL no controle de agentes patogênicos..... | 31 |
| Tabela 3: Efeito da concentração de NaCl e pH na atividade antimicrobiana do RL frente a <i>S. aureus</i> | 43 |

LISTA DE ABREVIACOES

°C – graus Celsius

µl – microlitro

µm – micrometro

AIs – autoindutores

ANOVA – Análise de Variância

ATCC – *American Type Culture Collection*, em Inglês

BS Biossurfatante

c-di-GMP - nucleotídeo diguanilato monofosfato cíclico

CBM – Concentrao Bactericida Mínima

CIM – Concentrao Inibitória Mínima

CMC – Concentrao Micelar Crítica

cm² - centímetros quadrados

DO - Densidade ptica

DTA Doenças Transmitidas por Alimentos

DNA - cido desoxirribonucleico

eDNA - ácido desoxirribonucleico extracelular

EPS – Exopolissacarídeos

g/L – Gramas por litro

h – Horas

HCl – cido Clorídrico

KDa – Kilodalton

kHz – Kiloherz MTT - brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio

MPE – Matriz Polimérica Extracelular

nm – nanômetro

NaCl Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

pH Potencial Hidrogeniônico

pKa – constante de dissociação

ppm – parte por milhão

RL Ramnolipídeo

RNA – Ácido Ribonucleico

SARS-CoV-2 – coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave

TSEYA - Agar triptona de soja suplementado com extrato de levedura

TSEYB - Caldo triptona de soja suplementado com extrato de levedura

UFC/ml - Unidades formadoras de colônia por mililitro

UTIs Unidade Tratamento Intensivo

W – Watts

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 19 |
| 2.1. Doenças transmitidas por alimentos (DTA)..... | 19 |
| 2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| 2.3. Biofilmes..... | 23 |
| 2.4. Resistência dos biofilmes aos antimicrobianos..... | 25 |
| 2.5. Biossurfatantes: Ramnolipídeos..... | 26 |
| 2.6. Ramnolipídeos no controle de patógenos de importância alimentar..... | 29 |
| 2.7. Efeito da força iônica na atividade antimicrobiana dos RL..... | 32 |
| 3. OBJETIVOS..... | 33 |
| 3.1. Objetivos específicos..... | 32 |
| 4. METODOLOGIA..... | 35 |
| 4.1. Microrganismos e meios de cultura..... | 35 |
| 4.2. Padronização do inóculo..... | 35 |
| 4.3. Preparo do ramnolipídeo..... | 36 |
| 4.4. Avaliação da atividade dos surfatantes em células planctônicas..... | 36 |
| 4.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)..... | 36 |
| 4.4.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)..... | 36 |
| 4.4.3. Curva de crescimento..... | 37 |
| 4.5. Avaliação da atividade dos RL na remoção de biofilmes pré-formados..... | 38 |
| 4.6. Quantificação das células viáveis em biofilmes..... | 39 |
| 4.6.1. Esterilização dos cupons de poliestireno..... | 39 |
| 4.6.2. Crescimento dos biofilmes em superfície..... | 39 |
| 4.6.3. Quantificação das células viáveis no biofilme..... | 40 |
| 4.7 Microscopia Confocal..... | 41 |
| 4.8. Análise estatística..... | 42 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 43 |
| 5.1. Atividade antibacteriana em células planctônicas..... | 43 |
| 5.2. Curva de crescimento do <i>S. aureus</i> | 45 |
| 5.3. Remoção de biofilmes pré-formados..... | 48 |

| | |
|--|----|
| 5.4. Quantificação de células viáveis em biofilmes pré-formados em cupons de poliestireno..... | 50 |
| 5.5 Microscopia confocal..... | 54 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 59 |
| 7. PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 61 |
| REFERENCIAS..... | 62 |

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) têm crescido significativamente a nível mundial. De acordo com o Ministério da Saúde, esse crescimento está relacionado com o aumento populacional e a existência de grupos mais vulneráveis ou expostos, ao processo de urbanização desordenado, além da necessidade de produção alimentícia em larga escala (BRASIL, 2010). Estima-se que 600 milhões - quase uma em cada dez pessoas no mundo - adoeçam após a ingestão de alimentos contaminados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OPAS/OMS, 2019).

Alimentos inseguros representam uma ameaça à saúde pública global, colocando em risco diversos grupos de pessoas, desde recém-nascidos, crianças, mulheres grávidas e idosos até portadores de doenças subjacentes. Dados mostram que em média 220 milhões de crianças contraíam diarreias, causando 96.000 óbitos por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO/OMS, 2019) além disso, alimentos contaminados podem provocar mais de 200 tipos de doenças, desde diarreias até câncer (LABOISSIÈRE, 2015). A segurança alimentar é de grande importância, uma vez que a inocuidade dos alimentos contribui não só para a saúde humana, mas também para prosperidade econômica, agricultura, acesso ao mercado, turismo e desenvolvimento sustentável (OPAS/OMS, 2019).

As DTA tornam-se, cada vez mais, um fator preocupante nas indústrias do setor alimentício, que devem dedicar-se à segurança e qualidade dos seus produtos uma vez que a veiculação de alimentos contaminados pode gerar, além de perdas econômicas, danos à saúde dos consumidores. A quantidade de infecções causadas por bactérias resistentes tem tornado a maioria dos antibióticos de amplo espectro disponíveis inválidos. Estudos estimam que até 2050, a progressão da resistência antimicrobiana será responsável por até 10 milhões de mortes anuais, atingindo um retrocesso semelhante ao que foi vivenciado na era pré-antibiótica (BAKER, 2015; MARAGON, 2019; O'NEILL, 2016).

Devido a preferência dos consumidores por aditivos naturais, além da preocupação com a saúde e consciência ambiental é crescente a demanda por aditivos "verdes", aqueles que não agredem o meio ambiente e proporcionam ao consumidor produtos isentos de conservantes artificiais (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; VOON; BHAT; RUSUL, 2012). Uma alternativa para estes aditivos, são os

biossurfatantes (BS), moléculas tensoativas produzidas por microrganismos que apresentam baixa citotoxicidade e biodegradabilidade, ampliando a vertente de aplicações em relação aos surfatantes sintéticos por serem compatíveis com o meio ambiente e produzidos a partir de substratos renováveis (ARAB; MULLIGAN, 2014; SINGH *et al.*, 2017). Assim, os BS representam uma importante ferramenta de inovação além de uma alternativa mais sustentável, preenchendo as atuais demandas do mercado.

Os ramnolipídeos (RL) são biossurfatantes da classe dos glicolipídeos sintetizados especialmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Estes BS além de atividade tensoativa e emulsificante, também apresentam ação antimicrobiana e antibiofilme frente aos patógenos alimentares, incluindo bactérias, fungos e leveduras e, devido a sua versatilidade, são considerados ingredientes multipropósito no processamento dos alimentos (ABALOS *et al.*, 2001; HABA *et al.*, 2003; NITSCHKE; SILVA, 2018). Em trabalho recente foi demonstrado que os RL são mais efetivos na inibição de patógenos alimentares Gram-positivos quando o pH está entre 5-6. Além do aspecto sensorial, a adição de cloreto de sódio ajuda a preservar a qualidade dos alimentos, inibindo o desenvolvimento dos microrganismos. Por outro lado, alguns patógenos alimentares como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* são capazes de sobreviver na presença de altos níveis de NaCl, causando sérios riscos de contaminação. Estudos preliminares mostraram também, que o aumento da força iônica influenciou a ação antimicrobiana de RL frente ao *S. aureus* (DÖTSCH *et al.*, 2009; DOYLE; GLASS, 2010; FERREIRA *et al.*, 2017; VIEIRA, 2018).

Considerando que a maioria dos alimentos apresenta pH na faixa ácida e muitos são acrescidos de sal, é importante avaliar o efeito destes parâmetros visando futura aplicação dos RL no controle de patógenos de importância alimentar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

O termo Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) é genérico, utilizado para síndromes, geralmente acompanhadas por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia. São decorrentes da ingestão de alimentos ou água contaminados, podendo a contaminação ser de origem microbiana ou de toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. Essa contaminação pode ocorrer tanto em domicílios, quanto pelo ambiente e procedimentos de higiene ineficazes. Assim, a ingestão de alimentos sem padrões sanitários constitui um grande risco à segurança alimentar (FREITAS, 2005; SORAGNI; BARNABE; MELLO, 2019; TONDO; BARTZ, 2014;).

Nos últimos anos, as DTAs se tornaram uma causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo um dos maiores problemas de saúde pública, atingindo toda a população, principalmente crianças, idosos e as classes menos favorecidas. Estima-se que o problema irá aumentar durante o século 21, principalmente devido as várias mudanças globais, que incluem crescimento populacional, pobreza, exportação de alimentos e rações animais, dentre outros fatores que influenciam a segurança alimentar internacional (DIRETORIA DE ABASTECIMENTO, 2017; WELKER *et al.*, 2010). A prevenção das DTAs evita que ocorram contaminações e surtos na população, para isso, é necessário que a distribuição de água e alimentos tenham condições adequadas de saneamento. As contaminações bacterianas estão ligadas a maioria dos casos de intoxicações alimentares e, durante o período de 2000 e 2015, os agentes causadores de DTAs mais comuns foram *Salmonella spp.*; *Staphylococcus aureus.*; *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2015, 2019; KARRAS, 2000).

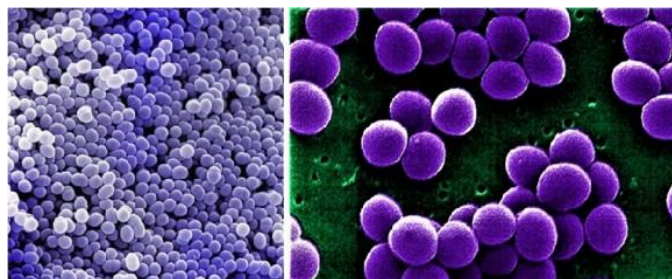
As DTA podem se manifestar de várias formas, como por exemplo, infecções, intoxicações e toxinfecções alimentares. As infecções alimentares resultam da ingestão de alimentos contaminados com os microrganismos. As intoxicações alimentares ocorrem na presença das toxinas dos microrganismos no alimento ingerido. Enquanto as toxinfecções alimentares se dão pela ingestão de alimentos com certa quantidade de microrganismos patogênicos, capazes de produzir e ou liberar toxinas após ingeridos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS, 2001). Os alimentos contaminados, normalmente incluem ovos, massas, leite, carnes processadas e peixes.

2.2. *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos foram observados pela primeira vez por Kock, em 1878, isolado de um ferimento purulento e, em 1881, a primeira publicação citando a forma de cocos e a presença desses microorganismos em abscessos agudos e crônicos. *S. aureus* constitui um dos principais grupos bacterianos presentes na microbiota humana, sendo encontrado na pele, cavidades nasais, intestinos e no trato urinário em menor proporção. Pelo menos 60 espécies e subespécies de *Staphylococcus* são descritos na literatura, além dos 15 subgrupos filogeneticamente relacionados (DONG *et al.*, 2011; FRANK *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2010; LAMERS *et al.*, 2012; RUPP; SOPER; ARCHER, 1992; SANNASIDDAPPA *et al.*, 2011;).

Os *Staphylococcus aureus* são células Gram-positivas na forma de cocos (0,5-1,5 µm de diâmetro), são imóveis, não formam endósporos, não capsulados ou com uma formação limitada de cápsula, estão organizados em arranjos individuais, aos pares, em tétrades, em cadeias curtas (3-4 células) e em agrupamentos irregulares característicos semelhantes a cachos de uva (Figura 1). São aeróbios ou anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo, tendo o crescimento mais rápido e abundante em condições aeróbicas. Normalmente são catalase-positivos e oxidase-negativos. As colônias são geralmente opacas, podendo variar sua coloração do branco ao laranja. Geralmente são halotolerantes, crescendo em meios que contenham até 10% de sal (NaCl), e a temperatura ótima de crescimento entre 30-37°C, podendo resistir ao congelamento até -20°C. Podem crescer na faixa de pH entre 4 a 9,8 com pH ótimo entre 6 e 7 (FRANCO, 2008; GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006; HOLT *et al.*, 1994; WHITMAN *et al.*, 2012).

Figura 1 – Células de *S. aureus* capturada por microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (2018).

Embora esteja presente na microbiota humana, o *S. aureus* é considerado um dos principais agentes infecciosos hospitalares; além de intoxicações, também podem causar infecções relacionadas à sua capacidade de multiplicação e disseminação nos tecidos do hospedeiro; seu período de incubação é de 1 até 6 horas, podendo causar desde uma simples espinha, até pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia. A intoxicação alimentar se deve a presença de uma toxina resistente a fervura e pasteurização. O risco de um surto de infecção é mais alto quando manipuladores dos alimentos apresentam infecções cutâneas, que ao entrar em contato com os alimentos mal acondicionados, pode gerar contaminação (BOYCE, 2019; LIMA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2007; TONDO; BARTZ, 2014).

É um microrganismo único quando comparado a outros clinicamente relevantes, por apresentar três características: fatores de virulência, capacidade de desenvolver resistência a antibióticos, além de ser responsável por infecções nosocomiais e comunitárias (JACOBSSON, 2009). A capacidade de colonização e patogenicidade do *S. aureus* se deve a fatores de virulência, que permitem aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, proporcionando invasão celular, penetração tecidual ou adesão à superfícies como catéteres e próteses. Os diferentes mecanismos de sobrevivência, conferem proteção e permitem a disseminação do microrganismo. Além de produzirem exoproteínas contribuintes para sua capacidade de colonização e infecções em hospedeiros mamíferos, quase todas as cepas do *S. aureus* secretam enzimas e citotoxinas, estas toxinas são produzidas principalmente quando certas cepas crescem em alimentos que contenham carboidratos e proteínas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; FRAZIER; WESTHOFF, 1988; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Quando o microrganismo infecta a pele, gera uma resposta inflamatória que atrai macrófagos e neutrófilos para o local infectado, entretanto o *S. aureus* secreta proteínas capazes de bloquear a quimiotaxia dos neutrófilos e liberar toxinas que destroem as células fagocíticas (TORTORA, 2017).

Nas unidades de saúde, o risco de infecção pelo *S. aureus* é maior, uma vez que grande parte dos pacientes está com o sistema imunológico debilitado ou passaram por procedimentos invasivos, sendo a predominância para pacientes em UTIs, pacientes submetidos a cirurgias e pacientes com dispositivos. O *S. aureus* é um problema de saúde pública, uma vez que, já colonizou cerca de um terço da população mundial, sendo residente permanente das passagens nasais e pele de 30% da população. Este microrganismo, quando exposto a superfícies, consegue sobreviver por meses e pode

formar biofilmes. Apresenta resistência aos antibióticos tradicionais, pois seu genoma possui uma série de fatores de virulência e meios de evadir as defesas do hospedeiro, limitando a eficácia terapêutica e, conseqüentemente, torna-se um problema no tratamento de infecções crônicas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2013; HOLT *et al.*, 1994; MARAGON, 2019; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A relação desses microrganismos com surtos de intoxicação alimentar ocorreu em 1884, em Michigan, EUA, quando foi possível associar os casos ao consumo de queijo tipo cheddar contaminado com o estafilococos. A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais faz com que o *S. aureus* se desenvolva facilmente em diversos alimentos (CARVALHO *et al.*, 2002; GUERREIRO, 1984; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; PEREIRA *et al.*, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo proteico de baixo peso molecular, cadeia única, pirogênicas, possuem característica emética e efeitos nas células do sistema imunológico. A ingestão destas toxinas pré-formadas em alimentos pode causar diarreia e vômito após 2-8 h, sendo a concentração de enterotoxinas e intensidade dos sintomas dependente da susceptibilidade, peso e saúde da pessoa. A toxina estafilocócica está no segundo grupo de toxinas mais estudadas em intoxicações alimentares; as principais produzidas pelo *S. aureus* são do tipo A, B, C1, C3, D e E, a enterotoxina A é a mais relacionada às intoxicações alimentares, sendo *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva o principal agente de intoxicação alimentar (CHAVES, 2012; FRANKER, 1990; FREITAS, 2005).

Estas toxinas são polipeptídeos de cadeia curta (28 a 35 KDa) e única, compostas por lisina, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico; contém ainda, uma ponte dissulfeto ligada próximo ao centro da molécula, lhes conferindo termoestabilidade e estabilidade em pH extremos e radiação; assim, uma vez que o alimento foi contaminado, dificilmente estará seguro para o consumo novamente. Ao contrário das células bacterianas termolábeis e facilmente eliminadas em processos de cozimento, as enterotoxinas estafilocócicas resistem ao aquecimento à 100°C durante 30 minutos assim, não são inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos comumente utilizados em alimentos (ACHESON, 2000; JAY, 1994).

2.3. Biofilmes

Os microrganismos são estruturas simples, presentes em diversos tipos de habitats, mas embora apresentem estrutura simples, são capazes de desenvolver comportamentos complexos. Quando ocorre o crescimento bacteriano em superfícies, a adesão das células seguida da colonização constitui os biofilmes (BOSCARIOL; OUCHI; PEREIRA, 2018; MENOITA *et al.*, 2012). Assim, o termo biofilme se refere a forma de vida microbiana sésil, caracterizada pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células.

A formação destes agregados microbianos provoca alterações fenotípicas nas células planctônicas, podendo ser entendidas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos em ambientes de condições adversas. Podem ser formados por uma (homogêneos) ou mais (heterogêneos) espécies microbianas que se formam pela aderência de células planctônicas (livres) às superfícies e/ou interfaces sólido-líquido, sendo elas abióticas ou bióticas, compondo uma complexa comunidade microbiana envolvida numa matriz polimérica extracelular (MPE) (COSTERTON; STEART; GREENBERG, 1999; COSTERTON *et al.*, 1995; FLEMMING *et al.*, 2016; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

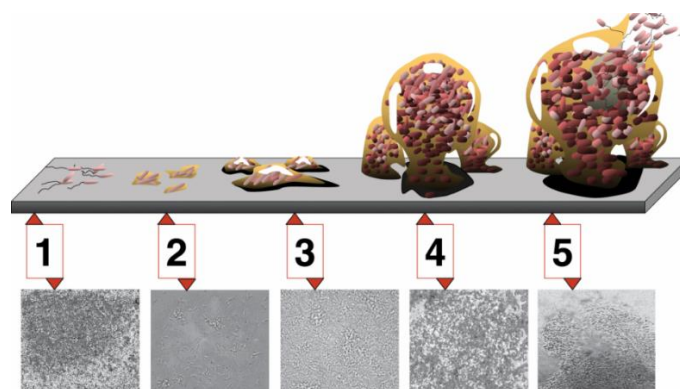
Microrganismos em biofilme apresentam maior resistência. No caso de antibióticos, a resistência pode ser de 100 até 1.000 vezes mais alta em relação às células em estado planctônico. O biofilme pode persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando fonte potencial de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de infecções alimentares. A resistência dos biofilmes microbianos depende da (ou das) espécies que o compõem (CHAVANT *et al.*, 2007; DUFOUR; LEUNG; L-VESQUE, 2012).

Na área clínica, a formação destas comunidades em hospedeiros pode favorecer o surgimento de inflamações e resistência a fármacos, que culminam em infecções persistentes. Estima-se que 80% de todas as infecções microbianas são ocasionadas por microrganismos presentes em biofilmes, abrangendo desde as mais comuns como infecções do trato urinário, até as mais graves como endocardites. Na indústria alimentícia, os biofilmes podem ser formados a partir de resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície dos equipamentos e utensílios higienizados inadequadamente. Além de serem mais resistentes aos processos de desinfecção, as células sésseis que estão nos biofilmes, reduzem a eficiência e a vida útil dos

equipamentos devido à corrosão microbiológica, causando prejuízos econômicos neste setor (CHEN; WEN, 2011; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

De acordo com Lister e Horswill (2014) os estágios de desenvolvimento de biofilmes podem ser divididos em pelo menos três eventos principais: adesão inicial, maturação e dispersão (Figura 2). A primeira fase se dá a partir da adesão inicial das células planctônicas à uma superfície. Esta etapa é reversível, uma vez que, caso o ambiente não apresente condições favoráveis, as células podem se desprender. A adesão é mediada por forças atrativas e repulsivas, como interações eletrostáticas, e ligações de van der Waals e, por vários fatores como: motilidade, quimiotaxia, apêndices extracelulares de adesão como fímbrias e pili, além de secreção de adesinas. A transição dos estilos de vida livre para a forma de biofilme também é orquestrada por sinais extra e intracelulares, como o nucleotídeo diguanilato monofosfato cíclico (c-di-GMP), que regula o controle da expressão gênica a partir de estímulos externos – o aumento no nível do c-di-GMP promove formação de biofilmes, enquanto a diminuição leva a dispersão destes (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; BJARNSHOLT *et al.*, 2013; SINGH, S. *et al.*, 2017).

Figura 2 – Esquemática das fases de formação de biofilmes: (1) adesão, (2) transição da fase reversível para irreversível, (3 e 4) maturação, (5) dispersão



Fonte: Adaptado de Monroe (2007).

Após aderidas, as células do biofilme começam a se dividir e crescer, é nesta etapa em que inicia a secreção dos componentes extracelulares responsáveis por compor a matriz polimérica. Entre os componentes extracelulares que formam a matriz estão proteínas, lipídeos, lipopolissacarídeos, DNA e polissacarídeos. Essa matriz sustenta e estabiliza as células agrupadas, mantendo a estrutura e função do biofilme. A adesão celular passa de reversível para irreversível, apresentando interações químicas mais

fortes do tipo iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016). A maturação do biofilme ocorre com o aumento da população microbiana e produção de EPS. A fase de dispersão é iniciada por meio de um mecanismo de sinalização interna (*quorum sensing*) que permite com que as células retomem seu estado de crescimento planctônico, se desprendam da matriz e reiniciem o processo em outros locais.

O aumento da densidade populacional bacteriana, faz com que as células formem estruturas dispostas em pilares, compostas por uma camada de cerca de 10 µm de espessura, podendo elevar-se até 200 µm. Essa forma de crescimento facilita o acesso nutricional, e evita o acúmulo de resíduos tóxicos. O aumento da densidade populacional desencadeia a indução dos genes responsáveis pela regulação do comportamento bacteriano, que é denominado *quorum sensing*. Quando se atinge uma quantidade crítica dos compostos autoindutores (AIs), a população detecta presença de um número suficiente de bactérias que respondem por meio da ativação ou repressão de genes. São esses sinais os responsáveis por uma variedade de processos no desenvolvimento e maturação do biofilme (MENOITA *et al.*, 2012; SINGH, S. *et al.*, 2017), como a produção de exopolissacarídeos, enzimas, além de alteração da motilidade.

A matriz de biofilmes de *S. aureus* é uma estrutura de composição complexa que depende das condições ambientais e da individualidade de cada linhagem, entretanto, é conhecido que pode ser composta por proteínas secretadas e derivadas de lise, polissacarídeos e DNA extracelular (eDNA) (ABRAHAM; JEFFERSON, 2012; FITZPATRICK, HUMPHREYS, OGARA, 2005).

2.4. Resistência dos biofilmes aos antimicrobianos

A resistência dos biofilmes é multifatorial, isto é, se dá através de vários fatores, podendo ser relacionada tanto a mecanismos físicos, fisiológicos e adaptativos, quanto a resistência convencional – aquela que não depende da formação de biofilmes (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016). Dessa forma, várias explicações são sugeridas na literatura para entender tal resistência, uma vez que os biofilmes podem ser vistos como mais um obstáculo no contexto da resistência antibiótica.

A tolerância física é um fator de resistência que depende da estrutura tridimensional do biofilme, a qual é oferecida pela matriz exopolissacarídica e é capaz de reduzir a difusão

das substâncias antimicrobianas. É um mecanismo de curto prazo. (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

A tolerância fisiológica depende da taxa metabólica dos microrganismos no biofilme, uma vez que a maioria dos antibióticos atuam em células metabolicamente ativas e, as células sésseis, têm diferentes gradientes metabólicos. Quanto mais afastado da superfície, menor será a disponibilidade de nutrientes. A tolerância de um biofilme maduro é de 100 a 1000 vezes maior em comparação às mesmas espécies bacterianas livres, de tal forma, alguns antibióticos tornam-se menos efetivos quanto mais velho for o biofilme, existindo uma predominância de células persistentes, que podem evadir-se e restabelecer a infecção (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Além da tolerância física e fisiológica, os biofilmes também apresentam a tolerância adaptativa, que se dá pela capacidade dos mesmos em modificar e/ou neutralizar o agente antimicrobiano. Esse mecanismo não requer mudanças genéticas, sendo estabelecido por sinais reguladores que são interrompidos quando a exposição à substância antimicrobiana cessa. A tolerância adaptativa pode ser específica ou inespecífica (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Ainda pode-se citar a resistência convencional nos biofilmes, que acontece em função da taxa de mutação, que é maior do que a observada nas bactérias planctônicas devido à proximidade e contato horizontal célula-célula, permitindo diferentes padrões da expressão gênica e facilidade na transmissão dos fatores de virulência. Além disso, a barreira de difusão oferecida pela matriz extracelular resulta em diferentes gradientes químicos e ambientais como pH ácido e baixos níveis nutricionais que levam a uma diminuição do estado metabólico e hipóxia. Assim se estabelecem diferentes concentrações dos antimicrobianos disponíveis para interagir com as células, aumentando a resistência e contribuindo com a expressão dos fatores de virulência (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; FLEMMING *et al.*, 2016; MARAGON, 2019; SINGH *et al.*, 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

2.5. Biossurfatantes: Rhamnolipídeos

Os surfatantes são agentes de superfície capazes de reduzir a energia livre do sistema, pois podem substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface diminuindo a tensão superficial e interfacial dos líquidos; estes são constituídos por uma

porção hidrofóbica e um grupo hidrofílico, podendo ser chamados também de substâncias anfifílicas (MULLIGAN, 2005).

Os surfatantes sintéticos são derivados de petróleo e apresentam baixa biodegradabilidade e alta toxicidade, sendo necessária a busca por novas alternativas compatíveis com o meio ambiente. Neste contexto, surgiram os biossurfatantes (BS), moléculas tensoativas produzidas por microrganismos, que apresentam como características principais alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, além de serem sintetizados a partir de substratos renováveis – Tabela 1 (ARAB; MULLIGAN, 2014; SILVA *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2012). São sintetizados por processos biotecnológicos, utilizando substratos de baixo custo por exemplo, resíduos agroindustriais. Devido a sua natureza os BS representam uma importante ferramenta de inovação e sustentabilidade, preenchendo as atuais demandas do mercado. De acordo com a Global Market Insights (2020), no ano de 2019, o mercado de biossurfatantes ultrapassou o valor de US\$1,5 bilhões, tendo uma projeção estimada de até US\$6,5 bilhões em 2027.

Durante os últimos anos uma grande variedade de microrganismos vem sendo estudada para a produção de biossurfatantes. Por serem moléculas anfifílicas, os BS também reduzem a tensão superficial e interfacial auxiliando a mistura de duas fases de polaridades distintas. Além desta característica, são melhores produtores de espuma e mais estáveis quando expostos a condições ambientais extremas, se comparados aos surfatantes sintéticos, tornando-os alternativas promissoras em diversas áreas industriais (AL-BAHRY *et al.*, 2013).

Dentre os biossurfatantes mais conhecidos, podemos destacar os glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídios/ácidos graxos, lipídeos neutros, surfatantes poliméricos e surfatantes particulados (BANAT *et al.* 2010).

Tabela 1 – Principais classes de biossurfatantes e seus microrganismos produtores

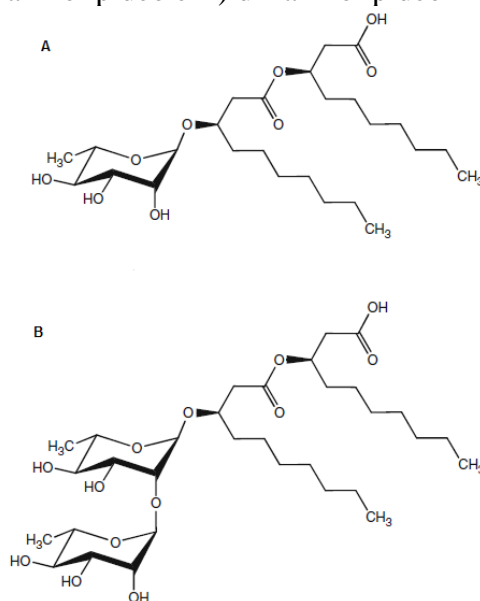
| Classe | Microrganismo |
|---|------------------------------------|
| Glicolipídeos | |
| Ramnolipídeos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Lipopeptídeos | |
| Surfactina | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros | |
| Fosfolipídeos | <i>Thiobacillus thiooxidans</i> |
| Surfatantes poliméricos | |
| Emulsan e Biodispersan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| Surfatante particulado | |
| Vesícula | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |

Fonte: Adaptada de Marinho, Silva e Luna (2022).

A porção hidrofóbica dos BS é, na maioria das vezes, constituída por longas cadeias de ácidos graxos hidroxilados (ou não) enquanto a região hidrofílica pode ser formada por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos, álcoois e ésteres, entre outros (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Os ramnolipídeos (RL) são glicolipídeos produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* que apresentam cadeias de ácidos-graxos β -hidroxilados ligados a uma ou a duas moléculas de ramnose, constituindo os mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos (Figura 3). Estes compostos representam uma das classes de biossurfatantes mais importantes, devido a presença de propriedades que possibilitam inúmeras aplicações em diversas áreas da indústria, incluindo emulsificação, detergência, formação de espuma, solubilização, biorremediação entre outras. Além disso, os RL podem ser produzidos a partir de uma variedade de substratos renováveis (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010; MARCHANT; BANAT, 2012; REIS *et al.*, 2011).

Figura 3 - Representação da estrutura química dos principais homólogos de RL. A) mono-ramnolipídeo e B) di-ramnolipídeo



Fonte: Modificado de McClements, Bai e Chung (2017)

Os ramnolipídeos podem ser aplicados em diversos setores industriais, desde a indústria de cosméticos e alimentícia, até no tratamento e prevenção de COVID-19. Devido as características anfifílicas, conseguem interagir com a membrana lipídica do vírus causador do coronavírus, o qual tem sua estrutura afetada, uma vez que é a membrana lipídica que envolve o RNA, vital para o SARS-CoV-2 (ÇELIK *et al.*, 2020; SMITH *et al.*, 2020). Com a membrana lipídica afetada, ocorre o impedimento da replicação do vírus.

Além de serem ótimos agentes de limpeza, podem ser utilizados como agentes carreadores para formulação de sistema de entrega de moléculas ativas. Esta propriedade está relacionada com a sua habilidade de auto-agregação, ou formação de estruturas micelares as quais podem funcionar como lipossomas (NAKANISHI *et al.*, 2009).

2.6. Ramnolipídeos no controle de patógenos de importância alimentar

Devido suas propriedades físico-químicas, os ramnolipídeos são considerados um dos melhores surfatantes, podendo ser aplicado diretamente nas indústrias de diversos setores comerciais. Nas indústrias alimentícias, microrganismos podem causar danos e interferir na qualidade dos produtos, colocando em risco a segurança alimentar. Os ramnolipídeos possuem propriedades conservantes, antimicrobianas e antiaderentes, podem controlar biofilmes bacterianos e ainda possuem propriedades emulsificantes,

podendo interferir – de forma positiva, na qualidade dos alimentos (ARAÚJO, 2018; MNIF; GHRIBI, 2016; TWIGG *et al.*, 2019).

Estudos evidenciaram a atividade antimicrobiana dos ramnolipídeos sobre diversos microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras (ABALOS *et al.*, 2001; HABA *et al.*, 2003). Segundo Araújo, Freire e Nitschke (2013), a atividade antiadesiva dos biossurfatantes pode evitar a formação de biofilmes em superfícies nas quais os alimentos entrarão em contato, sendo possível reduzir a adesão microbiana nessas superfícies se as mesmas forem condicionadas com biossurfatantes (Figura 4 – a). A ação antiadesiva pode estar ligada a alterações nas propriedades físico-químicas, que podem gerar mudanças nas interações entre superfície e microrganismo.

A atividade antimicrobiana (Figura 4 – b) dos biossurfatantes está relacionada à sua atuação sobre a membrana citoplasmática, uma vez que suas características anfifílicas permitem interação com a bicamada fosfolipídica da membrana. O mecanismo de ação dos ramnolipídeos ainda não foi completamente elucidado, principalmente no que diz respeito a interações moleculares ramnolipídeos-fosfolipídeos, contudo a maioria dos estudos demonstraram aumento da permeabilidade da membrana, além de alterações na organização e estabilidade da bicamada lipídica, o que afeta diretamente a integridade celular (Figura 4 – c) (HABA *et al.*, 2003; 2014; ORTIZ *et al.*, 2006; SOTIROVA; SPASOVA; GALABOVA, 2008).

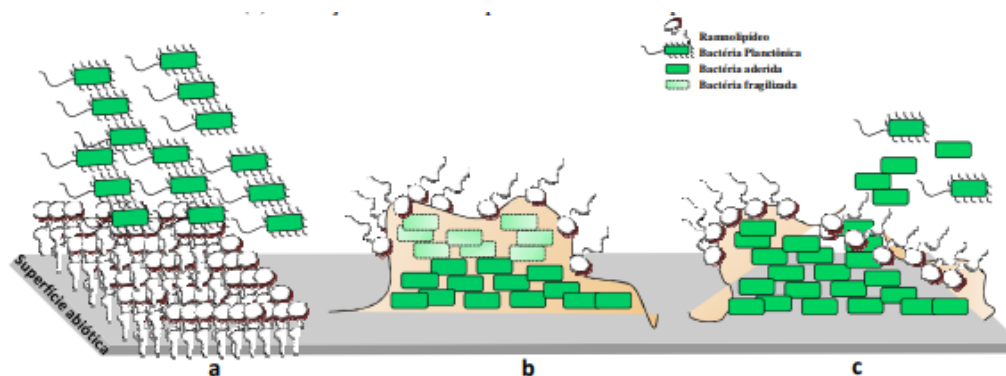
Alguns trabalhos demonstraram a eficiência dos RL no controle de microrganismos de importância alimentar (Tabela 2). Os ramnolipídeos exibiram atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringes* e *Listeria monocytogenes*; às Gram-negativas *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*; e aos fungos *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* e *Mucor* sp. (BENINCASA *et al.*, 2004; HABA *et al.*, 2003; SHAH *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Exemplos de diferentes usos do RL no controle de agentes patogênicos

| Fonte de RL | Alvo | Referência |
|--|--|---------------------------|
| RL de <i>P. aeruginosa</i> isolada de solo contaminado | <i>E. coli</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Salmonella thyphimurium</i> | ABALOS et al., 2001 |
| RL comercial + nisina | <i>Listeria monocytogenes</i> | MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013 |
| RL + óleo resina de aipo | <i>L. monocytogenes</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>B. cereus</i> | MAYER, 2017 |
| RL produzido por <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Listeria monocytogenes</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> | ARAUJO et al., 2016 |
| RL produzido por <i>Burkholderia thailandensis</i> | <i>Streptococcus oralis</i> ; <i>Actinomyces naeslundii</i> ; <i>Neisseria mucosa</i> ; <i>Streptococcus sanguinis</i> | ELSHIKH et al., 2017 |
| Nanoparticulas de quitosana + RL | <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Klebsiella oxytoca</i> | MARAGON et al., 2020 |

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4 – Aplicação de ramnolipídeo no controle de microrganismos. (a) Atividade anti-adesiva, (b) Atividade antimicrobiana e (c) Remoção do biofilme pré-existente em superfície biótica ou abiótica



Fonte: Adaptado de Nitschke e Silva (2018).

Além do controle de patógenos, os ramnolipídeos apresentam outras propriedades interessantes para indústria de alimentos, estabilizando e desestabilizando emulsões;

controlando glóbulos de gordura; podem estabilizar sistemas aerados; aprimorar a textura, cor e sabor dos alimentos; aumentar a validade de alguns produtos, além de ação antioxidante. Outro fator importante é a possibilidade de produzir RL a partir de resíduos e subprodutos da indústria alimentícia, colaborando para valorização e redução de resíduos (MNIF; GHRIBI, 2016; SAIBABA 2023).

2.7. Efeito da força iônica na atividade antimicrobiana dos RL

Quando em concentração acima da Concentração Micelar Crítica (CMC), os RL conseguem auto agregar e formar estruturas como micelas, vesículas ou lamelas, sendo que, a predominância de cada tipo de estrutura depende diretamente de fatores como pH, força iônica e temperatura. As micelas são formadas quando, em uma interface água - óleo, a parte apolar fica voltada para o óleo, enquanto a parte polar está em contato com a água. A redução da CMC de surfatantes aniônicos, na presença do NaCl, está relacionada à neutralização dos grupos polares negativos pelo íon Na^+ , que promove redução da repulsão entre as moléculas do surfatante, e favorece a formação das estruturas micelares compactas e em consequência, reduz o valor de CMC (HELVACI; PEKER; ZDEMIR, 2004; ISHIGAMI; GAMA; NAGAROKA, 1987; RAZA *et al.*, 2010; YOSHIMURA, 2022).

Apesar da ação dos RL estar relacionada a atuação sobre a membrana citoplasmática, pouco se sabe sobre o mecanismo envolvido nesta interação. A relação entre a presença de estruturas micelares e a ação antimicrobiana dos biossurfatantes também é controversa na literatura. Alguns autores sugerem que a formação de micelas é responsável pela ação antimicrobiana, enquanto outros afirmam que os monômeros são as moléculas que atuam sobre a estrutura celular alvo (RODRIGUES *et al.*, 2017; SHAO *et al.*, 2017; SOTIROVA; SPASOVA; GALABOVA, 2008).

Em estudo recente, verificou-se que a presença de NaCl reduziu os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos RL frente a *S. aureus*, porém o efeito observado parece depender diretamente dos valores de pH do meio (VIEIRA, 2018). Estudos mais aprofundados são necessários para melhor entendimento da interação entre RL-NaCl visando sua futura aplicação em alimentos.

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana do Biossurfatante Ramnolipídeo frente as células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitória e bactericida mínimas (CIM e CBM, respectivamente) dos RL sobre células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar o efeito da presença de NaCl e variação do pH na atividade antimicrobiana dos Ramnolipídeos
- Contribuir com a elucidação do mecanismo de ação entre Ramnolipídeos e as moléculas estudadas e sua correlação com a atividade antimicrobiana;

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos e meio de cultura

- Microrganismos: foi utilizada a linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC 8095, isolada de torta de creme. As culturas foram mantidas em estoques, que foram armazenadas em meio TSYEB (Tryptone Soy Yeast Extract Broth) acrescidos de glicerol 20% e armazenados a -20°C até o seu uso.
- Meio de cultura: os meios de cultura foram caldo e ágar tripton de soja acrescidos com extrato de levedura - TSEYB e TSEYA, respectivamente, ambos da marca Accumedia®. O pH dos meios foram ajustados e esterilizados em autoclave. Os meios foram distribuídos em placas de petri ou tubos de ensaio e incubadas por 24h em estufa a 37°C para confirmar sua esterilidade.
- Meios de cultura com tratamentos: para os tratamentos testados, foi preparada uma solução inicial de NaCl 10% (10g de NaCl para cada 100 mL de meio TSYEB), a qual foi diluída de acordo com as concentrações desejadas para cada meio. Após esterilização, foi adicionado NaCl ao meio, nas concentrações, 1%, 2%, 5% e 7,5%, respectivamente. Para cada concentração de sal o pH foi ajustado em 5, 6, 7 e 8 utilizando NaOH (0,5M) ou HCl (0,1M). Todos os meios foram esterilizados, em capela de fluxo com filtro de membrana de 0,22µm.

4.2. Padronização do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de dois cultivos subsequentes de 24 horas, em meio TSYEA incubando-se a 37°C. Alíquotas das colônias obtidas em meio TSYEA foram suspensas em meio TSYEB e o valor da densidade ótica (DO) foi ajustada para três valores: $0,1 \pm 0,01$; $0,20 \pm 0,01$ e $0,30 \pm 0,01$, respectivamente, as quais foram medidas em espectrofotômetro. A DO escolhida, foi a de $0,20 \pm 0,01$, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL. Para os experimentos de atividade antimicrobiana, esta suspensão inicial passou por uma diluição no fator de 10, isto é, o inóculo inicial partiu de uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC / mL.

4.3. Preparo do Ramnolípídeo

O Biossurfatante utilizado foi o Ramnolípídeo Comercial (Rhamnolipid Inc.-EUA), em solução a 25%. Para os testes de microdiluição, o RL foi preparado inicialmente na concentração de 10000 *ppm* de RL em água destilada e diluídos em meio TSYEB duplo para 5000 *ppm*. Os meios foram ajustados nos respectivos valores de pH e concentração salina a serem estudados. As soluções foram filtradas em filtro 0,22 μm dentro da capela de fluxo.

4.4. Avaliação da atividade dos RL em células planctônicas

4.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM):

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo segundo metodologia estabelecida pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 100 μL do caldo de cultivo para cada poço. Posteriormente, adicionou-se mais 100 μL de caldo contendo RL na concentração de 5000 *ppm* na primeira coluna da placa. Metade do conteúdo da primeira coluna da placa foi então coletado e transferido para a segunda coluna e assim sucessivamente, até a décima coluna, realizando assim uma diluição seriada que abrangeu concentrações de 2500 a 4,9 *ppm* de Ramnolípídeo. Posteriormente 20 μl do inóculo padronizado, foi adicionado às colunas 1 a 11. Desta forma, as colunas de 1 a 10 foram as colunas testes com meio tratado com ramnolípídeo; a coluna 11 contendo meio de cultura e inóculo serviu como controle positivo e a coluna 12, contendo apenas meio de cultura, serviu como controle negativo. A menor concentração em que não houve crescimento bacteriano foi designada como sendo a CIM. Para facilitar a visualização foram adicionados 20 μl de solução de brometo de tetrazólio (MTT 1 *g/L*), que altera sua coloração de amarelo para roxo na presença de crescimento celular. Foram preparadas quatro placas diferentes, cada uma contendo o caldo de cultura com um valor de pH (5, 6, 7 e 8) e as respectivas concentrações de NaCl.

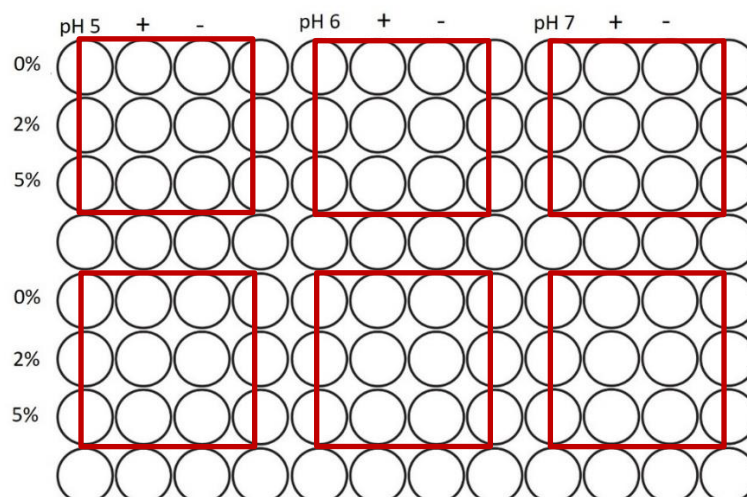
4.4.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para as concentrações de RL que não apresentaram crescimento no teste de CIM foram realizadas análises de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Todo conteúdo do material destes poços (100 μ l) foi transferido para placas TSYEA, com o auxílio de uma pipeta e então, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. O valor de CBM foi designado pela visualização da menor concentração em que não houve crescimento microbiano na placa.

4.4.3. Curva de crescimento

Para a construção das curvas de crescimento do *S. aureus*, foi utilizada a leitora de microplacas Perkin Elmer (modelo EnSpire). Utilizando a placa de 96 poços, foram testados os pH 5, 6 e 7 com as concentrações 0%, 2% e 5% de NaCl. As concentrações de RL utilizadas para cada tratamento, foram definidas a partir do valor de CIM obtido anteriormente, variando entre os valores de 39,06 ppm e 2500 ppm. Em cada placa foi preparada uma duplicata, utilizando dois inóculos diferentes. A placa foi dividida conforme o esquema abaixo (Figura 5):

Figura 5 - Esquema da placa utilizada para construção das curvas de crescimento



Fonte: Elaborada pela autora

A primeira coluna de cada divisão foi preenchida com 100 μ l do meio contendo RL na concentração e pH ajustados, posteriormente, foi adicionado 20 μ l de inóculo. A segunda

coluna foi utilizada como controle positivo, no qual foi adicionado 100µl de caldo de cultivo com pH ajustado junto com 20µl de inóculo. Por fim, a última coluna foi utilizada como controle negativo, no qual foi adicionado apenas o meio de cultura com pH ajustado.

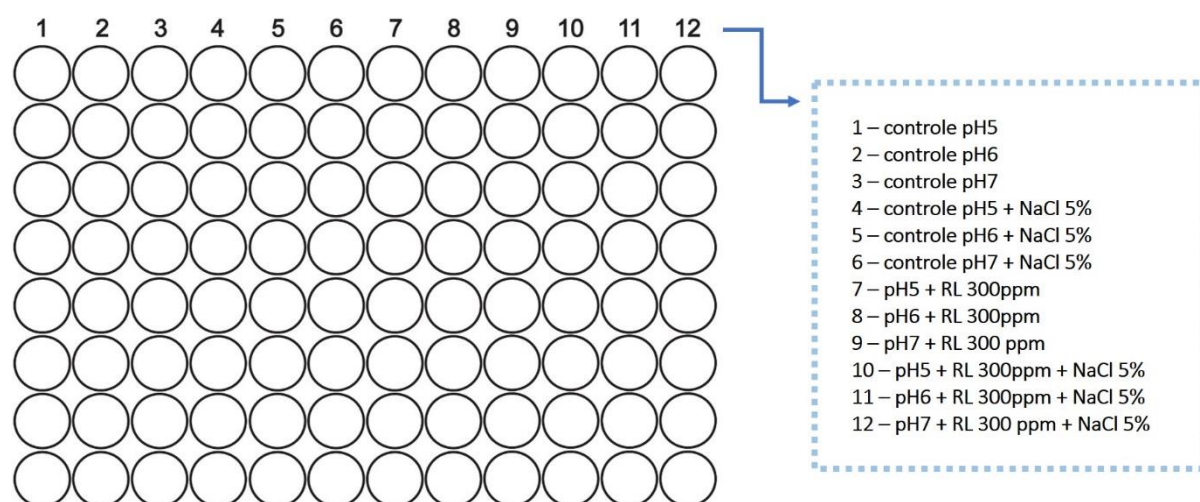
Após a bactéria ser inoculada, a placa foi fechada com papel adesivo e colocada na leitora na temperatura de 37°C. O crescimento foi acompanhado por medidas de DO (610nm) em intervalos constantes durante 48h.

4.5. Avaliação da atividade dos RL na remoção de biofilmes pré-formados

A determinação da atividade do RL em biofilmes de *S. aureus* previamente estabelecidos, foi realizada com base nos resultados obtidos em experimentos anteriores. Após a determinação do CIM, a concentração de RL foi fixada em 300 mg/l. Os testes foram conduzidos em pH 5, 6 e 7 e 5% de NaCl, tendo um controle para cada pH.

Em uma placa de microdiluição de 96 poços foi adicionado 180 µl de meio de cultura (TSYEB) e posteriormente 20µl do inóculo padronizado. A placa foi incubada a 37°C por 24h, para a formação de biofilme. Após às 24h, o meio de cultura foi retirado da placa, permanecendo somente o biofilme aderido. Após a retirada do meio foi adicionado à placa, o controle com seus respectivos tratamentos, como demonstrado na figura 6:

Figura 6 – Esquema da placa utilizada para formação de biofilmes



Fonte: Elaborada pela autora

A placa foi incubada por 24h a 37° C. Para a quantificação da biomassa aderida, o tratamento foi retirado da placa e a mesma foi lavada duas vezes com água destilada esterilizada. Após a lavagem da placa, foram adicionados 200 µl de metanol em cada poço por 15 minutos para a fixação do biofilme. O metanol foi retirado e após a secagem completa da placa, adicionou-se 200µl de solução aquosa de cristal violeta 0,25% o qual foi mantido por 15 minutos. O cristal violeta foi retirado e a placa foi lavada novamente com água destilada. Após a secagem completa da placa, foram adicionados 200µl de ácido acético glacial (33%) em cada poço para solubilização do corante e a placa foi inserida na leitora de microplacas Perkin Elmer (modelo EnSpire) para a leitura da densidade ótica, em 630nm (MIRELES; TOGUCHI; HARSHEY, 2001).

Foram realizadas sete repetições do experimento. Utilizou-se a absorbância média para calcular a porcentagem de remoção do biofilme a partir da seguinte equação:

$$\text{Remoção percentual (\%)} = 100 - \left[\frac{(DO \text{ tratamento})}{(DO \text{ controle})} \times 100 \right]$$

4.6 Quantificação das células viáveis em biofilmes

4.6.1 Esterilização dos cupons de poliestireno

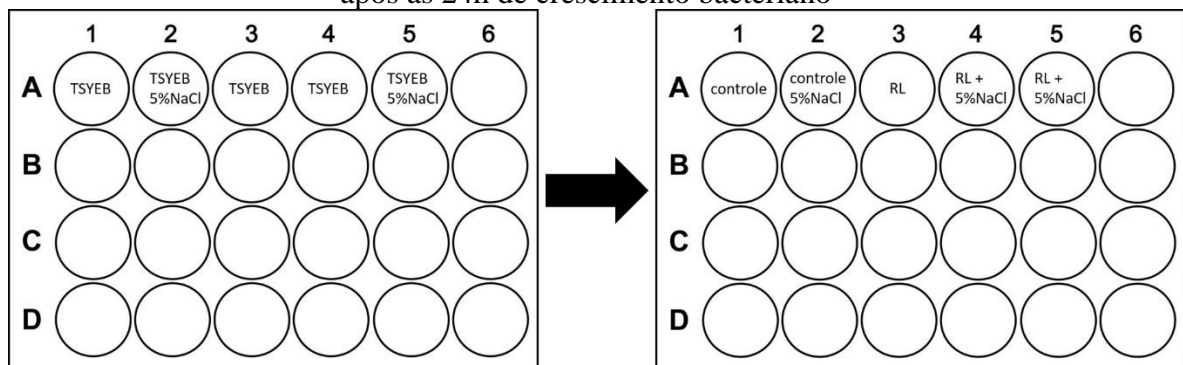
Utilizou-se cupons de poliestireno, com superfície de 1 cm² para o crescimento dos biofilmes. Primeiramente, estes passaram por higienização em um recipiente contendo álcool 96% o qual permaneceu por 10 minutos em banho ultrassônico UltraCleaner 1400A (Unique) na frequência de 40kHz; o álcool foi retirado e em outro recipiente adicionou-se água destilada e detergente, os quais passaram por mais uma limpeza ultrassônica de 10 minutos. Em outro recipiente adicionou-se somente água destilada e os cupons ficaram em banho ultrassônico por mais 10 minutos, a fim de remover todo o detergente. Os cupons de poliestireno foram colocados em uma placa de petri para secagem e submetidos à radiação ultravioleta por 1h (30 minutos de um lado e 30 minutos do outro) (SILVA, 2016).

4.6.2 Crescimento dos biofilmes

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.2, em placa de 24 poços, nos quais adicionou-se, em cada um dos poços, 900µl de meio TSYEB e 100µl do inóculo padronizado com DO (610 nm) ajustada para $0,2 \pm 0,02$. Para os controles contendo NaCl, utilizou-se 900µl de meio TSYEB acrescidos de 5% de NaCl e 100µl do inóculo padronizado. Os cupons esterilizados foram imersos no poço e a placa foi incubada por 24 horas em 37°C. Os testes foram realizados em pHs 5, 6 e 7.

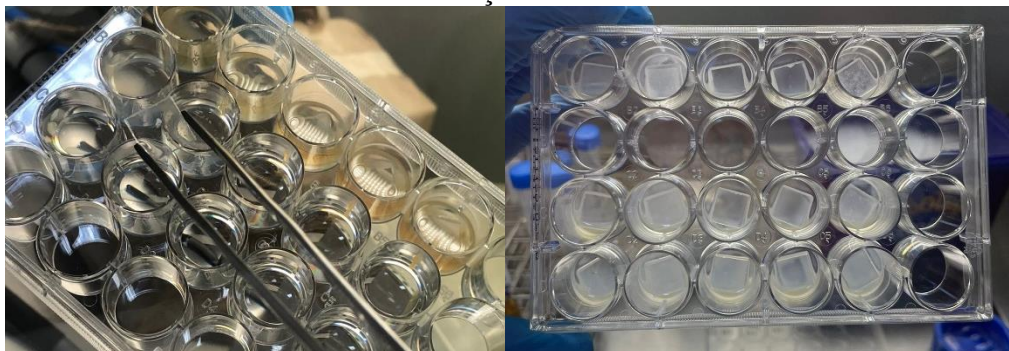
Após 24h, o meio de cultura foi removido, e cada poço foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada e posteriormente foi adicionado 1 ml dos respectivos tratamentos em cada poço, como demonstrado na figura 7:

Figura 7 – Esquema demonstrando o inóculo com os respectivos tratamentos utilizados após as 24h de crescimento bacteriano



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 – Biofilmes de *S. aureus* formados nos cupons de poliestireno após 24h de incubação



Fonte: Elaborada pela autora.

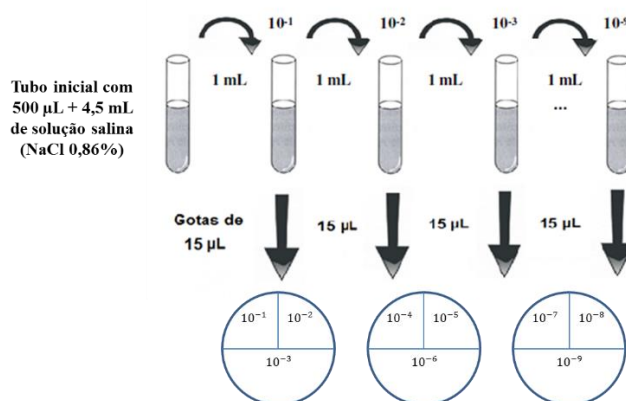
4.6.3 Quantificação das células viáveis no biofilme

Após as 24h, os cupons foram lavados delicadamente em solução salina (2x) para remoção de células não aderidas, retirados com pinça e transferidos para um tubo de ensaio contendo 2 ml de solução salina (0,86%). Para a remoção das células aderidas, utilizou-se a metodologia descrita por Scherba et al. (1991), na qual os tubos contendo os cupons foram mantidos em banho ultrassônico por 10 minutos em uma frequência de 40 kHz e 135 W de potência.

Para a contagem das células presentes no biofilme, foi realizada diluição seriada de 10^{-1} até 10^{-9} da amostra em solução salina (Figura 9). Uma alíquota de 0,5 ml de cada tubo foi transferida para 4,5 ml de solução salina sucessivamente da primeira até a última diluição.

Em seguida, gotas de 15 μ l de cada diluição foram depositadas em placas contendo TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o tempo de incubação, realizou-se a contagem de colônias nas gotas que haviam de 5 à 50 unidades formadoras de colônia (UFC). As células viáveis foram determinadas através do cálculo da média dos números de colônias e multiplicadas pela diluição – os valores foram obtidos em UFC/ml. (SILVA, 2016).

Figura 9 – Esquema do método de diluições seriadas seguido da contagem por gotas em placa de Petri



Fonte: Adaptado de Silva (2016).

4.7 Microscopia Confocal

Foram selecionados os tratamentos que apresentaram melhores resultados nos experimentos anteriores. O controle e os tratamentos foram realizados conforme descrito no item 4.6.2.

Dado o tempo de 24h, os cupons de poliestireno foram removidos, com pinça esteril, dos poços contendo os tratamentos e lavados em solução salina 0,86% para a remoção de células não aderidas. Os cupons retirados foram transferidos para uma nova placa.

Após a lavagem e transferência dos cupons, na nova placa, foi adicionado 80 μ L de solução do kit LIVE/DEAD *BacLight Bacterial Viability* (ThermoFisher). O kit possui dois corantes, sendo eles o marcador verde fluorescente SYTO 9 (excitação: 485nm / emissão: 498nm) – responsável por marcar as células bacterianas, viáveis ou não e o marcador vermelho iodeto de propídeo (PI - excitação: 535nm / emissão: 617nm) – que penetra apenas nas células inviáveis, sendo capaz de reduzir o SYTO 9 na mistura.

Adicionados os corantes, a placa foi coberta com papel alumínio e deixada em repouso por 30 minutos no escuro. Os dois corantes, em conjunto, possibilitam a visualização da estrutura celular dos biofilmes e da ação do tratamento, uma vez que as células que permaneceram viáveis ficam coradas em verde e as células com a membrana celular danificada/inviáveis aparecem em vermelho. As imagens das amostras foram obtidas através do microscópio invertido LSM 780, da marca Zeiss, do IFSC – Instituto de Física de São Carlos da USP.

4.8 Análise estatística

Os valores de CIM e CBM foram expressos com a moda de no mínimo cinco repetições independentes. Os dados de DO foram expressos como a média \pm desvio padrão de oito repetições independentes. Os demais dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de no mínimo três repetições independentes. Os gráficos foram plotados com o auxílio do software OriginPro, versão 8.5 (OriginLab Corporation).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Atividade antibacteriana em células planctônicas

As bactérias do gênero *Staphylococcus aureus*, assim como outros microrganismos, podem ser encontradas em duas formas distintas sendo elas a forma planctônica ou séssil. Shapiro (1998) cita que as bactérias adotam a forma séssil, preferencialmente, por ser a forma que lhes confere melhores chances de adaptação. A forma planctônica está presente nas fases iniciais e finais da formação dos biofilmes, sendo assim, realizamos inicialmente o estudo da ação dos ramnolípídeos (RL) sobre as células livres do *S. aureus*. Foram realizados ensaios para determinação da CIM e da CBM do RL sob diferentes valores de força iônica e pH.

A atividade antimicrobiana dos RL em diferentes valores de pH e concentração de NaCl é mostrada na Tabela 3, em que se pode observar que o valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) tem relação direta com o pH do meio. A alteração do pH de 5 para 8 resultou no aumento do valor de CIM de 78,12 ppm para >2500 ppm. Da mesma forma, o aumento da concentração de NaCl de 0% para 7,5% favoreceu a ação antimicrobiana dos RL em todos os valores de pH testados. Destaca-se que nos pH 7 e 8, a alta concentração de sal (7,5%) apresentou valor de CIM, o que não foi observado na ausência do NaCl.

Tabela 3 – Efeito da concentração de NaCl e pH na atividade antimicrobiana do RL frente a *S. aureus*

| [NaCl] | 0% | | 1% | | 2% | | 5% | | 7,5% | |
|---------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | CIM | CBM | CIM | CBM | CIM | CBM | CIM | CBM | CIM | CBM |
| pH 5,0 | 78,125 | >2500 | 78,125 | >2500 | 78,125 | >2500 | 39,06 | >2500 | 19,53 | >2500 |
| pH 6,0 | 156,25 | >2500 | 156,25 | >2500 | 156,25 | >2500 | 39,06 | >2500 | 39,06 | >2500 |
| pH 7,0 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | 39,06 | >2500 | 39,06 | >2500 |
| pH 8,0 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | >2500 | 625,0 | >2500 |

Fonte: Elaborada pela autora

O melhor efeito antimicrobiano em pH 5 pode estar ligado ao fato de que os RL são considerados surfatantes aniônicos em pH neutro ou alcalino, entretanto, em condições ácidas, têm comportamento de tensoativos não-iônicos devido a protonação de grupos carboxílicos (LEBRÓN-PALER; PEMBERTON, 2006). Estudos de Ishigami, Gama e

Nagaroha (1987), mostram que o pKa do RL é em torno de 5,6, assim, quando o pH está abaixo deste valor, os grupos polares do RL ficam protonados, estando predominante na forma não iônica que, por ser isenta de carga efetiva, evita a repulsão eletrostática com os grupos aniônicos dos fosfolipídios da membrana citoplasmática, facilitando a interação entre a célula e o RL.

Quando temos pH com valores próximos a neutralidade, ou alcalinos, o grupo carboxila fica majoritariamente desprotonado e carregado negativamente (forma aniônica), podendo dificultar a interação do RL com as células devido a repulsão eletrostática (FERREIRA, 2017). Esta hipótese também já foi reportada por Moore (1997), que afirmou que os surfatantes não-iônicos são mais efetivos na solubilização dos fosfolipídeos quando em comparação com os surfatantes iônicos, devido ao fato de que estes apresentam maior facilidade de permeabilização na membrana plasmática, por serem isentos de carga e não promoverem repulsão elétrica com os grupos aniônicos dos fosfolipídeos.

Quando em presença de NaCl, ocorre a neutralização dos grupos polares negativos pelo íon Na^+ , o que pode reduzir a repulsão entre as moléculas do surfatante, favorecendo assim a interação com a célula (HELVACI; PEKER; ZDEMIR, 2004), como observado nos valores de pH mais altos (7 e 8) e maiores concentrações de NaCl (7,5%).

O tratamento não permitiu eliminar os microrganismos, ou seja, a combinação de parâmetros utilizada não apresentou valor de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Assim, pode-se concluir que a população de *S. aureus* pode ser inibida, entretanto, não erradicada pelo RL, sugerindo adaptação da bactéria ou, ainda, a possibilidade de resistência da bactéria ao antimicrobiano. Também é possível afirmar que o valor do pH e força iônica exerce grande influência sobre o efeito antibacteriano dos RL.

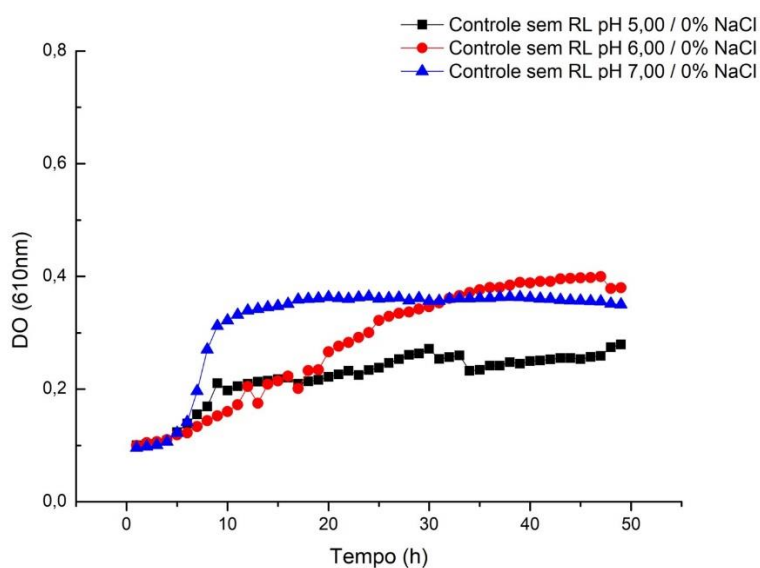
Magalhães e Nitschke (2013) avaliaram a ação antimicrobiana de ramnolipídeos frente à 32 isolados de *L. monocytogenes*. Os resultados mostraram que 90% das linhagens foram sensíveis, com valores de CIM entre 78 – 2.500 ppm. Sendo a ação dos RL predominantemente bacteriostática, porém, quando combinados com nisina, o efeito foi sinérgico e bactericida. Outro estudo recente mostrou que a atividade antimicrobiana dos RL frente as bactérias Gram positivas *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* é dependente do pH e favorecida sob condições ácidas na faixa de pH entre 5-6 (FERREIRA, 2017). Entretanto, as bactérias Gram negativas *Salmonella enterica* e *E. coli* (EHEC) parecem resistentes ao RL independente do pH do meio.

5.2. Curva de crescimento do *S. aureus*

O efeito do RL combinado com NaCl sob diferentes valores de pH foi melhor evidenciado a partir da construção das curvas de crescimento.

A figura 10, refere-se ao crescimento bacteriano na ausência de RL. A partir da curva, é possível verificar que, em pH 5 o crescimento foi mais lento, e menor, quando comparado aos pH 6 e 7, pH ótimo de crescimento do *S. aureus*.

Figura 10 – Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 8095 em meio de cultura TSYEB ajustado para diferentes valores de pH

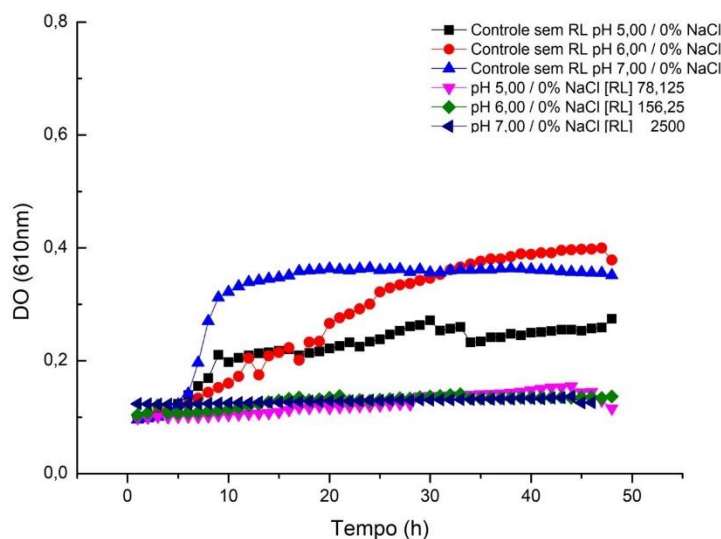


Fonte: Elaborada pela autora.

As figuras 11 a 13, referem-se à comparação do crescimento bacteriano na ausência e presença de RL-NaCl.

A partir das curvas de crescimento também foi possível observar a influência da concentração de NaCl no crescimento de *S. aureus*.

Figura 11 – Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 8095 na presença de RL (CIM) em diferentes valores de pH



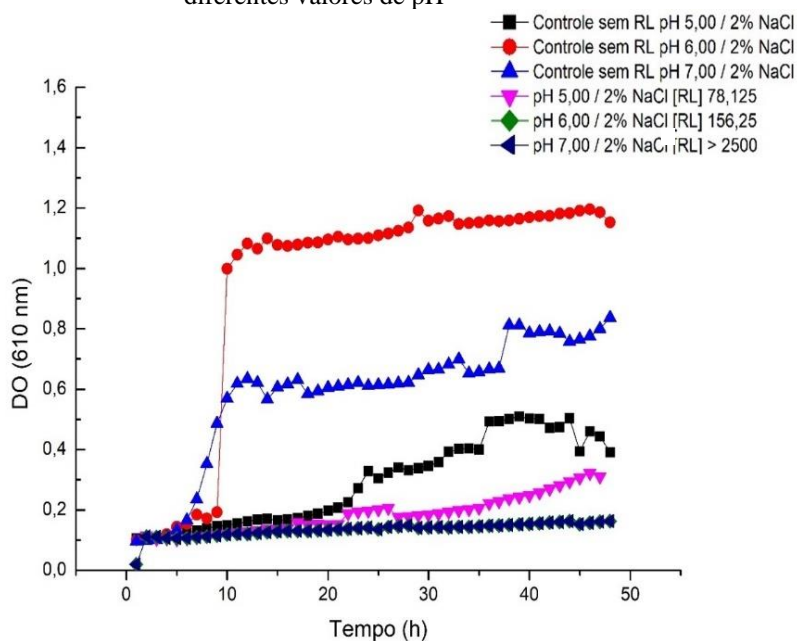
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que em pH mais ácido, foi necessária uma concentração menor do RL (78,12 ppm) para a inibir o crescimento bacteriano, enquanto em pH 7 foi necessária uma concentração de 2500 ppm (Figura 11). Além disso, esperava-se que o sal, por ter atividade conservante reduzisse o crescimento bacteriano, entretanto a presença do sal estimulou o crescimento bacteriano, sugerindo que a linhagem de *S. aureus* utilizada para este trabalho tenha comportamento halofílico. Segundo Santana *et al.* (2010), os estafilococos são capazes de sobreviver e se multiplicar em altos teores de NaCl, podendo crescer em concentrações de até 15%, sendo que as enterotoxinas são produzidas em concentrações de até 10% de NaCl.

De acordo com Scybert *et al.* (2003), para sobreviver em ambientes com a força osmótica elevada, estas bactérias aumentam os níveis internos de solutos compatíveis, podendo assim, manter o equilíbrio de água dentro das células. Quando em contato com o NaCl, as células do *S. aureus* ativam uma série de sistemas transportadores capazes de manter a pressão de turgescência da célula em ambientes de alta osmolaridade.

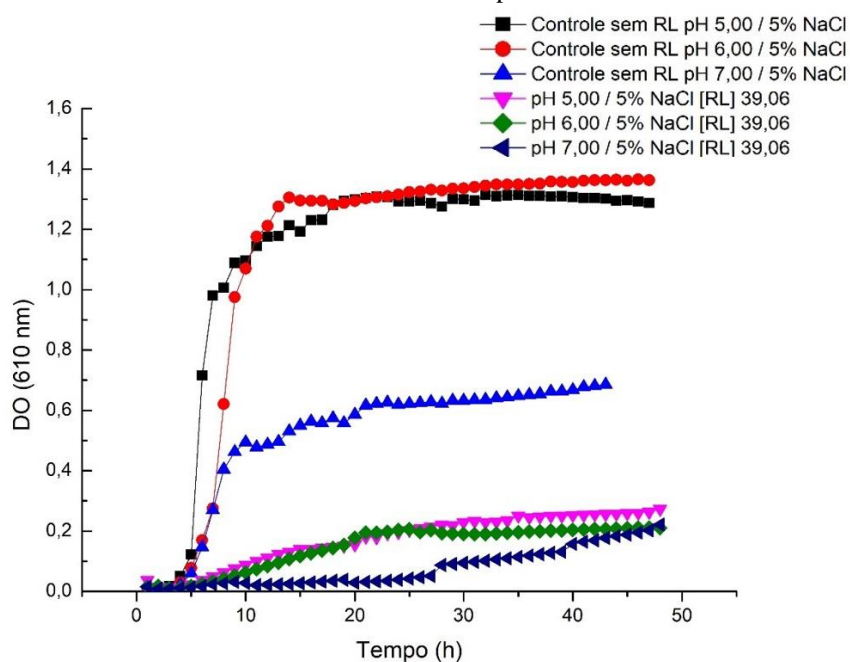
O crescimento em pH 7 na ausência de sal é limitado, apresentando uma Densidade Óptica (DO) máxima de $0,36 \pm 0,02$ (Figura 11) enquanto que a adição de 2% e 5% de NaCl promoveram aumento significativo do crescimento da bactéria (Figura 12 e 13).

Figura 12 - Efeito da combinação de RL e NaCl (2%) no crescimento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes valores de pH



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 13 - Efeito da combinação de RL e NaCl (5%) no crescimento de *Staphylococcus aureus* sob diferentes valores de pH



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 3 mostra que na presença de NaCl a ação antimicrobiana é favorecida pelo RL em todos os valores de pH avaliados. Rodrigues *et al.* (2017), verificaram um comportamento semelhante frente aos fungos *Aspergillus niger* MUM 92.13 e *Aspergillus carbonarius* MUM 05.18, sendo que a adição de NaCl ao meio de cultura, além de

favorecer o crescimento dos fungos em até 19,8%, promoveu um aumento na atividade antifúngica do RL. Segundo os autores, uma das hipóteses para este comportamento é que a combinação do RL com NaCl forma estruturas micelares que aumentariam a atividade antifúngica.

De acordo com Ahmadi, Shadizadeh e Salari (2014), a salinidade e a temperatura, são fatores que influenciam diretamente no desempenho e eficácia do surfatante, afetando diretamente o valor de CMC. Isso acontece porque, na presença do NaCl, as forças eletrostáticas repulsivas presentes entre as moléculas de RL ficam protegidas pelo Na^+ , formando uma monocamada mais compacta, diminuindo o valor de CMC e tensão superficial (ABBASI *et al.*, 2013; HELVACI, PEKER, ZDEMIR, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

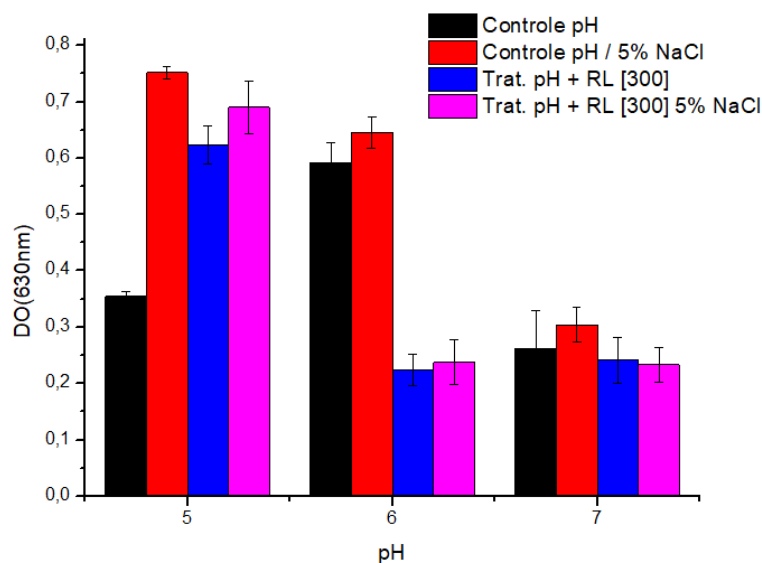
5.3. Remoção de biofilmes pré-formados

A técnica de cristal violeta, foi descrita pela primeira vez em 1985. Por ser um corante básico, o cristal violeta consegue se ligar as moléculas de superfície que estão carregadas negativamente e aos polissacarídeos na matriz extracelular (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Entretanto, a coloração com cristal violeta é pouco adequada para a visualização de células viáveis, uma vez que todas as células são coradas (PITTS *et al.*, 2003).

A remoção dos biofilmes promovida pelos surfatantes ocorre devido ao enfraquecimento entre as interações da bactéria com a superfície e entre a bactéria com outras bactérias, esse enfraquecimento envolve redução de interações interfaciais. A interação das moléculas do RL com a superfície polimérica também envolve forças hidrofóbicas e eletrostáticas, sendo assim, pode-se dizer que a interação depende da composição do material polimérico (SILVA *et al.*, 2017).

Os resultados da Figura 14 mostram que a maior taxa de remoção se deu em pH 6 contendo 5% de NaCl e 300 ppm de RL, em que foi apresentado uma remoção de 63,25% do biofilme formado na placa. Em pH 7, foi observada uma remoção de 23,35% na presença de sal, enquanto que em pH 5, uma remoção de apenas 8,12%. Estudos anteriores realizados no grupo de pesquisa, mostraram um percentual de até 35% de remoção de biofilmes pelo RL (SILVA, *et al.* 2017).

Figura 14 – Remoção de biofilmes de *S. aureus* pelo tratamento com RL (300 ppm) e NaCl (5%) em diferentes valores de pH



Fonte: Elaborada pela autora.

Foulston *et al.* (2014) evidenciaram que a dependência do valor de pH para formação de biofilmes é uma característica de diversas cepas do *S. aureus*. Quando analisamos os controles, é possível visualizar uma diferença no crescimento conforme alteramos o valor de pH dos meios, tendo um crescimento limitado nos pHs 5 e 7 e uma maior produção de biofilmes em pH 6, corroborando com os resultados da figura 14.

A formação dos biofilmes é um processo que envolve diversas etapas desde a interação inicial dos microrganismos até a adesão. Estas etapas dependem de muitos fatores dentre eles o pH do meio. Nostro *et al.* (2012) demonstraram que houve uma redução na adesão inicial de *S. aureus* e *S. epidermidis* em pHs alcalinos devido a redução da hidrofobicidade da superfície celular, o que comprometeu a maturação do biofilme que se mostrou mais fino e menos estruturado. Zmantar *et al.* (2010) avaliaram o crescimento de biofilmes de *S. aureus* em pHs 3, 5, 7, 9 e 12. Quando em pH 7, observaram que das 28 cepas de baixo grau de formação de biofilme analisadas, 24 apresentavam genes *icaA* e *icaD*, além disso, mostraram ainda que apenas uma cepa produtora de biofilme era *icaA* e *icaD* positiva. No mesmo estudo, em pH 5, foi observado que a maioria das cepas formavam pouco biofilme corroborando os dados apresentados no gráfico (figura 14). Os genes *icaA* e *icaD* são genes organizados em um operon que engloba genes *icaABCD*. A atividade do gene *icaA* é melhorada em até 20 vezes quando na presença do gene *icaD* e ambos estão presentes na membrana celular aumentando a expressão do polissacarídeo capsular e da enzima N-acetilglucosaminil responsáveis pela formação dos biofilmes (SALINA, 2015).

Por outro lado, quando adicionamos NaCl ao meio, é possível visualizar nos gráficos uma maior formação de biofilmes em pH 5. Apesar do NaCl ser utilizado como conservante alimentício, aumentando a pressão osmótica nos alimentos, alguns patógenos alimentares são tolerantes ao sal, sendo capazes de alterar suas características fisiológicas. O *S. aureus* é capaz de tolerar altas concentrações de sal, além disso, consegue regular sua expressão genica global para se manter viável. Este fator pode estar relacionado com a resistência bacteriana às altas concentrações de sal (LEE; CHOI; YOON, 2014).

Lee, Choi, Yoon (2014) relataram um aumento significativo nos biofilmes de *S. aureus* na presença das concentrações de 4% e 6% de NaCl em relação a ausência de NaCl, indicando que o sal é capaz de induzir a produção de biofilmes. A partir da análise transcricional da bactéria, os autores também sugeriram que o sal é capaz de regular o gene *icaA*, responsável pela adesão intracelular dos biofilmes, aumentando sua produção de 9 a 20 vezes, sugerindo a indução da formação de biofilmes pela presença do NaCl.

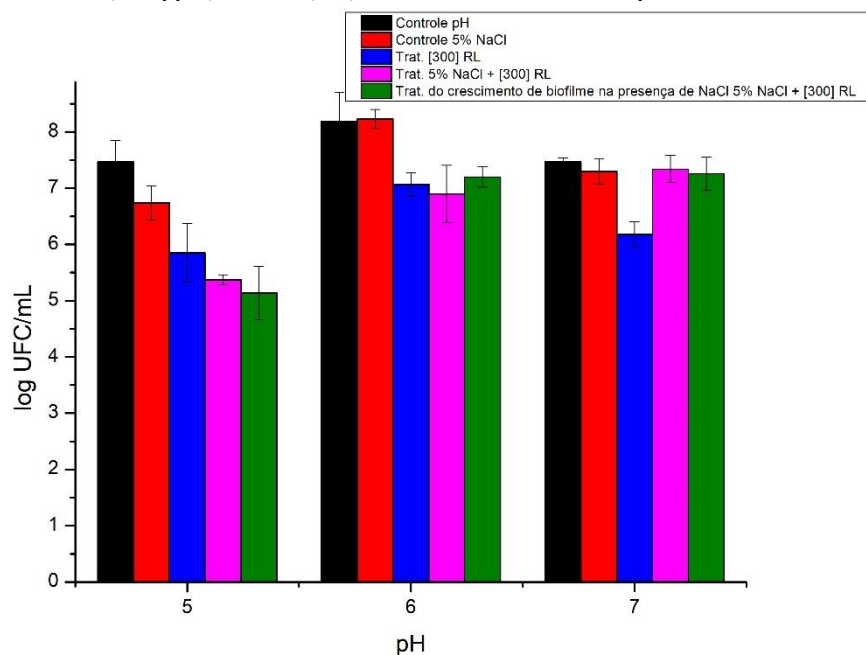
5.4 Quantificação de células viáveis em biofilme pré-formado em cupons de poliestireno

Quando analisamos as células planctônicas, observa-se que o aumento da concentração de NaCl favorece a ação antimicrobiana dos RL, independentemente do valor de pH. Concluimos também um melhor efeito do antimicrobiano em pH 5. Além disso, a partir dos resultados obtidos em pH 6, 7 e 8, observa-se que quanto mais alto o pH do meio, maior a concentração de RL necessária para inibição do crescimento bacteriano. Ao analisarmos o crescimento do *S. aureus*, observamos o crescimento mais lento da bactéria no pH 5. O NaCl promoveu um estímulo no crescimento bacteriano, sugerindo comportamento halofílico. Apesar do estímulo apresentado, quando alteramos os valores de pH, podemos ver que o NaCl auxilia também na inibição do crescimento bacteriano devido sua interação com o RL, demonstrando, que para as células livres, ocorre maior ação do RL em todos os pH (Tabela 1 – onde observamos que na presença do sal obtivemos valores de CIM em pHs que não apresentam este valor na ausência do mesmo). Este comportamento mudou quando analisamos os biofilmes.

Os experimentos realizados utilizando a coloração com cristal violeta mostraram uma maior remoção dos biofilmes em pH 6. Uma vez que a técnica não é adequada para a avaliação de células viáveis, para melhor entendimento do efeito dos tratamentos, foi realizada a contagem bacteriana utilizando o método descrito no item 4.6.3. Para estes ensaios, a concentração de RL foi fixada em dois valores. Inicialmente, testamos a concentração de 300ppm, e a partir dos resultados obtidos, dobramos a concentração para 600ppm.

É possível visualizar que na concentração de 300ppm de RL por 24h, não houve redução significativa nas células viáveis dos biofilmes, principalmente nos pHs 6 e 7 (Figura 15).

Figura 15 – Quantificação de células viáveis em biofilmes de *S. aureus* submetidos a tratamento com RL (300 ppm) e NaCl (5%) sob diferentes valores de pH.



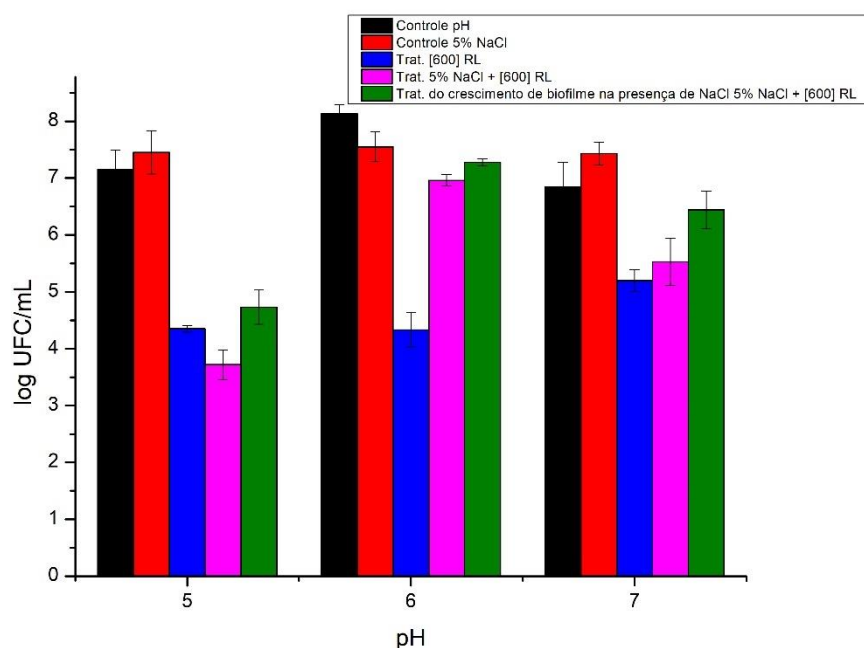
Fonte: Elaborada pela autora.

Quando a concentração de RL foi aumentada para 600ppm, pode-se observar comportamento semelhante ao observado em células livres, ou seja, quanto mais alto o valor de pH, é necessária uma maior concentração de RL para inibição das células viáveis (item 5.1). O aumento da concentração poderia ter sido maior, afim de observar uma maior redução dos biofilmes em pHs mais altos. Esse comportamento pode ser verificado ao visualizar uma redução de até 3,8 logs no número de células viáveis quando o tratamento contendo RL em pH 6 foi utilizado, enquanto que em pH 5, na concentração

de 300ppm, houve uma redução máxima de 1,62 logs no número de células viáveis ao se comparar com o controle.

Comparando-se a ação do tratamento RL+5% NaCl em biofilmes pré-formados em meios de cultura acrescidos de 5% de NaCl foi observado a melhor ação dos ramnolipídeos em pH 5, mostrando a redução de aproximadamente 2,7 logs de células viáveis com 600 ppm de RL (figura 16). Quando analisamos o tratamento RL+5% NaCl em controle de pH 5 (ausente de NaCl), a redução em de células viáveis foi maior ou seja, de 7,15 para 3,72 log UFC/mL, sugerindo que o sal estimula a produção ou a adesão dos biofilmes o que explicaria a menor redução dos biofilmes formados em meio contendo NaCl. Pode-se supor ainda, que o sal tenha ação na expressão dos genes *icaA* e *icaD*, contudo, seriam necessários mais ensaios para a confirmação dessa hipótese.

Figura 16 - Quantificação de células viáveis em biofilmes de *S. aureus* submetidos a tratamento com RL (600 ppm) e NaCl (5%) sob diferentes valores de pH



Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda na figura 16, é possível visualizar a redução de até 3,8 log UFC/mL em pH 6, quando utilizamos o tratamento de 600 ppm de RL. Em pH 7, a maior redução de 1,6 log UFC/mL no tratamento com RL. Sendo assim, a combinação entre NaCl e RL, tem melhor eficácia apenas quando o pH está mais ácido (pH 5). O tratamento com RL (sem NaCl) mostrou-se mais eficiente nos biofilmes comparado a combinação com NaCl,

diferente do observado para células planctônicas (Tabela 3) onde foi possível evidenciar redução do CIM com adição de NaCl em todos os valores de pH.

Existem vários surfatantes e desinfetantes que agem sobre microrganismos, entretanto, devido a resistência adquirida por células em biofilmes, a atividade destes diminui muito, sendo necessárias grandes concentrações ou até mesmo a combinação com outros compostos. De acordo com Abdallah et al. (2015) agentes sanitizantes podem eliminar as células viáveis do biofilme, entretanto, não conseguem remove-los totalmente da superfície. Outra hipótese para a dificuldade da remoção dos biofilmes, é que a matriz extracelular presente na parte mais externa do biofilme, adsorve os antimicrobianos e reduzindo a quantidade que fica disponível para a parte interna (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Diversos fatores físicos podem influenciar na atuação dos surfatantes na superfície dos biofilmes, desde a concentração, pH até a temperatura (Abdallah *et al.*, 2014), além disso, Pagedar e Singh (2015) avaliaram que a população do biofilme pode diminuir se aumentarmos o tempo de contato do mesmo com o surfatante, entretanto, Gomes e Nitschke (2011) avaliaram que o tempo de contato não apresenta diferença significativa para a remoção de biofilmes de *S. aureus* por biosurfatantes.

Os RL são influenciados pelo valor do pH podendo mudar sua conformação de grandes vesículas para micelas, sendo de grande importância o controle do pH nas soluções – grandes agregados micelares podem reduzir a interação com biofilmes (DAHRAZMA; MULLIGAN; NIEH, 2008; RODRIGUES, 2019; SILVA *et al.*, 2017). Além disso, com o aumento do pH, pode ocorrer maior formação de biofilmes, como foi constatado por Hošťacká, Ciznar, Stefkovicova (2010) em seus estudos com *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae* e *Vibrio cholerae*.

De acordo com Lim et al. (2004) a presença do sal em meio de cultura possibilita o crescimento do biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Barboza (2015) também, verificou uma alta taxa de formação de biofilmes estafilocócicos em uma concentração de 4% de NaCl, corroborando com os resultados deste trabalho, em que se observa maior formação dos biofilmes na presença de 5% de NaCl (Figura 14). Entretanto, diferente do observado para células planctônicas, a combinação de RL + NaCl não aumentou a atividade antimicrobiana nos biofilmes principalmente em pH 6 e 7 (Figura 16). Possivelmente a presença da matriz dificulta a interação do RL com as células e a presença de NaCl não é suficiente para aumentar esta interação.

O tipo e composição da matriz polimérica extracelular também influencia a ação dos RL sobre os biofilmes. Silva *et al.* (2017), demonstraram que a formação e remoção, dos biofilmes dependem diretamente do meio em que as bactérias se encontram, quando utilizou o leite como meio de cultura, devido à presença de carboidratos, houve maior sensibilidade dos biofilmes ao ramnolipídeo apresentando uma remoção de até 86,9% dos biofilmes de *S. aureus* enquanto em caldo nutriente a remoção foi de 35%. A maior ruptura em leite aconteceu porque neste meio, o biofilme foi mais hidrofílico aumentando a interação entre o biofilme e o tensoativo. Assim, é possível que a matriz polimérica formada nos diferentes valores de pH e na presença de NaCl também possa influenciar na atividade dos RL.

5.5 Microscopia Confocal

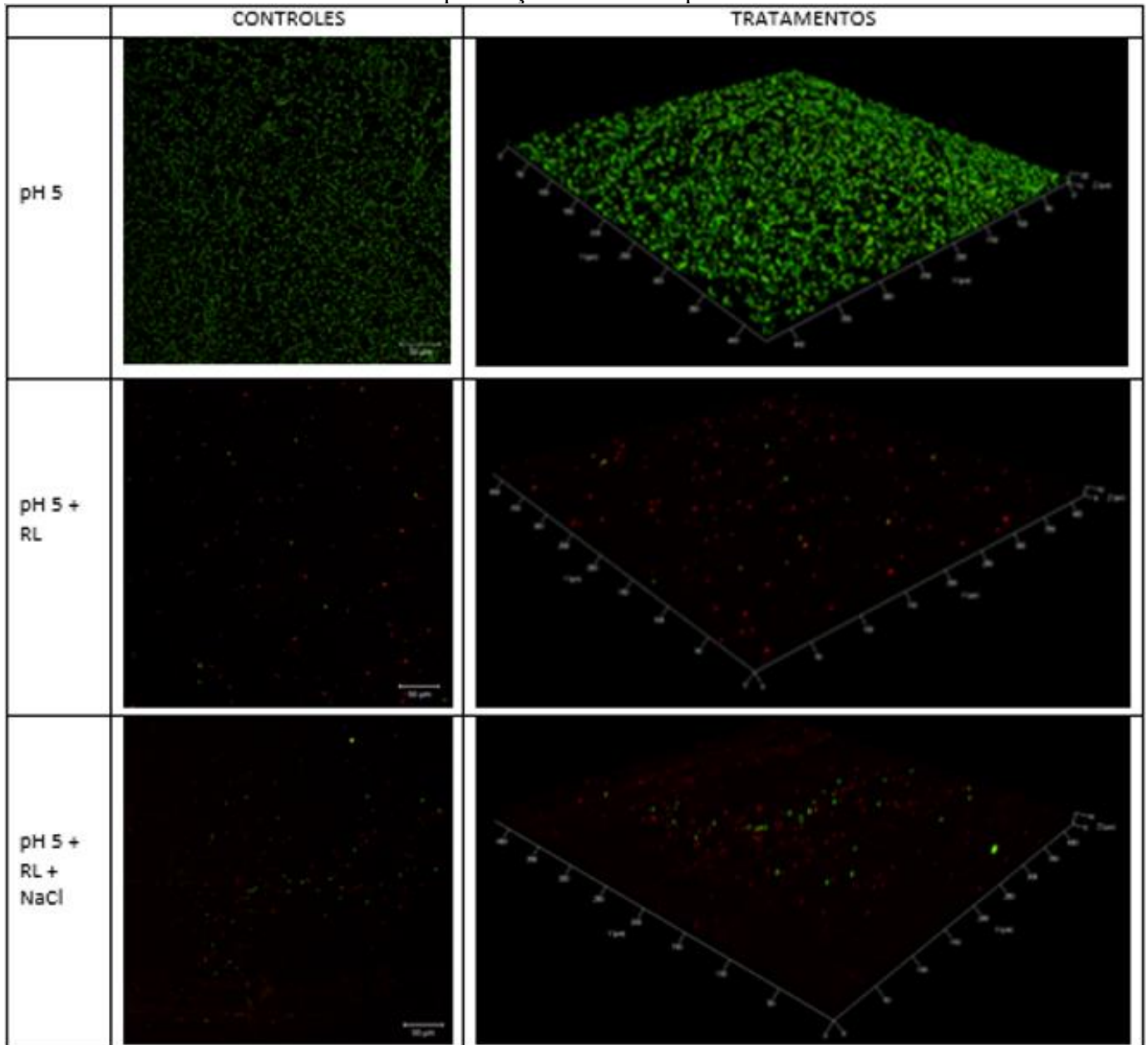
Após as análises de quantificação das células viáveis, afim de uma melhor visualização da ação dos tratamentos sobre os biofilmes, foi realizada a microscopia confocal. Para essa análise, foram selecionados os pHs 5 e 6, uma vez que nas concentrações de RL testados em pH 7 não obteve-se resultado significativo.

Analisando a figura 17 podemos comparar as amostras controle, onde em pH 5 a produção de biofilmes atingiu até 20 μm de espessura, enquanto que em pH 6 (figura 18) atingindo 14 μm . Ainda é possível verificar que quando aplicamos o tratamento contendo 600 ppm de RL, obtivemos uma remoção significativa das células na superfície, sendo possível visualizar a redução do volume das células.

Comparando as imagens obtidas com os resultados apresentados anteriormente, foi possível verificar que, quando utilizamos o cristal violeta para quantificar a remoção das células viáveis, observamos a melhor taxa de remoção em pH 6, utilizando o tratamento de RL + 5% NaCl (figura 14). Em contrapartida, quando foram feitos os testes para quantificação das células viáveis, o melhor efeito da adição do NaCl acontece em meio mais ácido (pH 5). Esses resultados são demonstrados nas imagens, onde podemos comparar a espessura dos biofilmes, em pH 5, o tratamento contendo RL + 5% de NaCl apresentou a espessura de 14 μm enquanto que em pH 6 podemos observar um biofilme de 30 μm . De tal maneira, podemos confirmar que o melhor tratamento contendo NaCl se dá em pH ácido, como vimos anteriormente. Entretanto, em pH 6 é possível observar que apesar de o biofilme não ter sido removido, as células estão

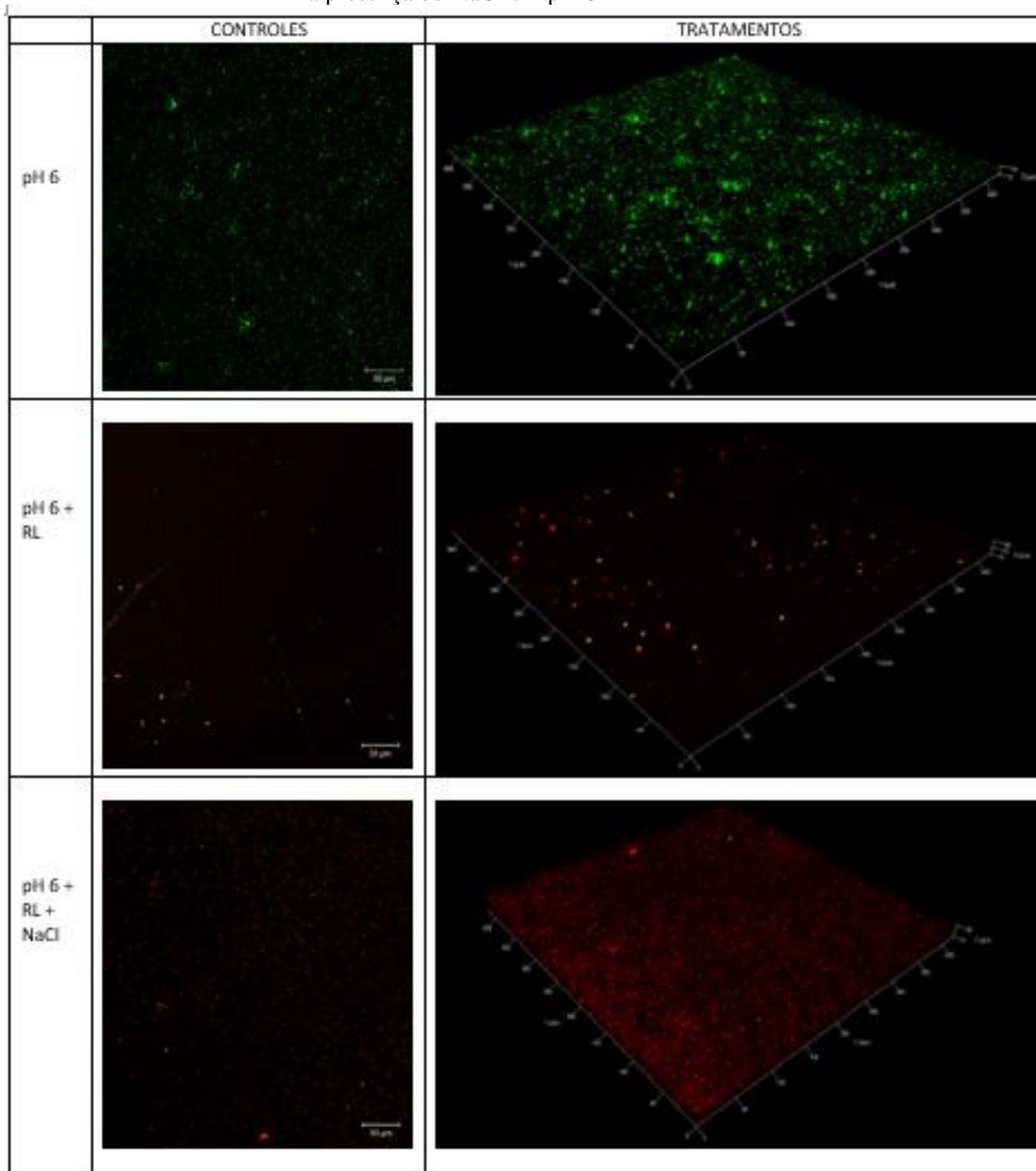
predominantemente mortas, sugerindo que a adição de *NaCl* em pH 6 é eficaz para a inibição do biofilme, mas não para a remoção do mesmo.

Figura 17 - Imagens de microscopia confocal mostrando a ação do RL na ausência e na presença do NaCl em pH 5



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 - Imagens de microscopia confocal mostrando a ação do RL na ausência e na presença do NaCl em pH 6



Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens obtidas pela microscopia confocal, corroboram com os dados apresentados na figura 16, confirmando os resultados obtidos nos experimentos anteriores.

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho mostram o efeito do pH e força iônica na atividade antimicrobiana de ramnolipídeos frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095) tanto em células livres como nas células em biofilmes.

Os resultados mostraram que a atividade dos RL é dependente do pH e da força iônica do meio. Em células planctônicas, a ação antimicrobiana foi maior em pH ácido, entretanto, a presença de NaCl permitiu ampliar a atividade principalmente em valores de pH neutro e alcalino. Os biofilmes se mostraram mais resistentes e foi possível evidenciar a influência do NaCl e do pH do meio na atividade do RL. A remoção de biofilmes foi mais eficiente em pH 6 e 7 enquanto que a viabilidade foi reduzida de forma mais significativa em valores de pH na faixa ácida corroborando com os dados obtidos em células planctônicas. Os resultados sugerem que o RL possui potencial para controle de *S. aureus* em alimentos ácidos e salgados.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar a composição da matriz polimérica dos biofilmes nos diferentes valores de pH e presença de NaCl.
- Estudar a combinação de RL com outros fatores como temperatura e tempo de contato sobre atividade antimicrobiana em biofilmes.
- Avaliar a ação dos RL sobre células planctônicas de *S. aureus* em modelo alimentar em condições de salinidade e pH ácidos.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, A. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1367-1371, 2001.
- ABBASI, H. et al. Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 256-265, 2013.
- ABDALLAH, Marwan et al. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 38-47, 2015.
- ABDALLAH, Marwan et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453-472, 2014.
- ABRAHAM, Nabil M.; JEFFERSON, Kimberly K. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 6, p. 1504, 2012.
- ACHESON, DWK. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. 3rded. [S.l.s.n], 2000. p. 485-501.
- AHMADI, M. A.; SHADIZADEH, S. R.; SALARI, Z. Dependency of critical micellization concentration of an anionic surfactant on temperature and potassium chloride salt. **Petroleum science and technology**, v. 32, n. 16, p. 1913-1920, 2014.
- AL-BAHRY, S. N. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.
- ALMEIDA, J. C. *et al.* Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Semina: ciências biológicas e da saúde**, v. 34, n. 1, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2013v34n1p97>.
- ARAÚJO, J. S. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA usando glicose como substrato e aplicações**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, p. 848-858, 2013.
- ARAÚJO, L. V. *et al.* Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 481-488, 2011.
- ARAÚJO, L. V. *et al.* Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171-178, 2016.
- ARAÚJO, P. A. *et al.* The Ability of an antimicrobial agent to penetrate a biofilm is not correlated with its killing or removal efficiency. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 675-683, 2014.

BANAT, I. M. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARBOZA, G. N. **Análise da produção de biofilme em resposta a agentes estressantes em staphylococcus aureus**. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

BENINCASA, M. *et al.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.

BJARNSHOLT, T. *et al.* Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.

BOSCARIOL, R.; OUCHI, J. D.; PEREIRA, G. C. Produção de biofilmes por *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde em Foco**, n. 10, p. 011-016, 2018. Disponível em: https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/002_produ%C3%A7%C3%A3o_biofilme_staphylococcus_aureus.pdf. Acesso em: 28 jan. 2023.

BOYCE, T. G. **Intoxicação alimentar por estafilococos**. 2019. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BArbios-digestivos/gastroenterite/intoxica%C3%A7%C3%A3o-alimentar-por-estafilococos>. Acesso em: 26 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf. Acesso em: 26 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, 2015.

CAROCHO, Márcio; MORALES, Patricia; FERREIRA, Isabel CFR. Natural food additives: Quo vadis?. **Trends in food science & technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CARVALHO, S. A. *et al.* Pesquisa de enterotoxinas e de substâncias antagonistas produzidas por *Staphylococcus aureus* recuperados de leite bovino in natura e de outros alimentos. In: SEMANA DE PÓS GRADUAÇÃO DA UFMG, 3., Belo Horizonte, 2002. **Anais [...]**. Belo Horizonte: [s.n.], 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

CENTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E FÁRMACOS.

Resistance in *in vitro* selected tigecycline-resistant methicillin-resistant *staphylococcus aureus* sequence type 5 is driven by mutations in *mepR* and *mepA* genes. (2018). Disponível em: <http://cibfar.ifsc.usp.br/2018/08/21/resistance-in-in-vitro-selected-tigecycline-resistant-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-sequence-type-5-is-driven-by-mutations-in-mepR-and-mepA-genes/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

ÇELIK, Pınar Aytaç et al. Biosurfactants' potential role in combating COVID-19 and similar future microbial threats. **Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 334, 2020.

CHAVANT, Patrick et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 68, n. 3, p. 605-612, 2007.

CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. *Ciência Equatorial*, v. 2, n. 1, 2012. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/cienciaequatorial/article/view/567/404>. Acesso em: 25 abr. 2020.

CHEN, L.; WEN, Y.-M. The Role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 66-73, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

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

DAHRAZMA, B.; MULLIGAN, C. N.; NIEH, M.-P. Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): a small-angle neutron scattering (SANS) study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 2, p. 590-593, 2008.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DIRETORIA DE ABASTECIMENTO. **Boas práticas na manipulação de alimentos: doenças transmitidas por alimentos.** 2017. Disponível em: http://www.dabst.eb.mil.br/_upados/_secoes/_sgls/_2017/PASA-PROGRAMA-DE-AUDITORIA-E-SEGURANCA-ALIMENTAR/MATERIAL-DIDATICO/Doencas_Transmitidas_por_Alimentos.pdf. Acesso em: 25 abr. 2020.

DONG, Q. *et al.* Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 8, p. 5408-5413, 2011.

DÖTSCH, M. *et al.* Strategies to reduce sodium consumption: a food industry perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 10, p. 841-851, 2009.

DOYLE, M. E.; GLASS, K. A. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 44-56, 2010. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, p. 2–16, 2012.

ELSHIKH, M. *et al.* Rhamnolipids from non-pathogenic burkholderia thailandensis E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v. 36, p. 26–36, 2017.

FERREIRA, J. F. **Estudo da atividade antimicrobiana de ramnolípídeos contra bactérias patogênicas de importância alimentar**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Pret, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-20082018-115010/publico/Dissert_JakelineFFerreira_corrigeida.pdf. Acesso em: 3 mar. 2020.

FERREIRA, J. F.; VIEIRA, E. A.; NITSCHKE, M. The Antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. **Food Research International**, v. 116, p. 737-744, 2019.

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

FLEMMING, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p.563-575, 2016.

FOULSTON, L. *et al.* The Extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. **MBio**, v. 5, n. 5, 2014. DOI: 10.1128/mBio.01667-14.

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

FRANK, D. N. *et al.* The Human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. **PLoS One**, v. 5, n. 5, May 2010. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010598>.

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food microbiology**. 4thed. New York: Mc Graw-Hill, 1988.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal**. 2005. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

GAO, Z. *et al.* Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3575-3581, Oct. 2010.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 98S-110S, 2002.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Biosurfactants market trends 2020-2026/ growth projections**. 2020. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industryanalysis/biosurfactants-market-report>. Acesso em: 15 nov. 2022.

GOMES, M. Z. V. **Utilização de biosurfatantes no controle da adesão bacteriana e na remoção de biofilmes de patógenos alimentares em superfície de poliestireno**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. DOI: 10.11606/D.75.2011.tde-18102011-164110.

GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.-H. The Genera staphylococcus and macrococcus. **The Prokaryotes**, p. 5-75, 2006. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_1.

GUERREIRO, M.G. **Bacteriologia especial com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984.

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

HABA, E. *et al.* Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 776-783, 2014.

HELVACI, S. S.; PEKER, S.; ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.35, p.225-233, 2004.

HOLT, J. G. *et al.* Facultatively anaerobic gram-negative rods. *In*: HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9thed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

HOŠTACKÁ, A.; ČIŽNÁR, I.; ŠTEFKOVIČOVÁ, M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. **Folia Microbiologica**, v. 55, p. 75-78, 2010.

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

JACOBSSON, G. **Invasive Staphylococcus aureus infections**. Göteborg: University of Gothenburg, Institute of Biomedicine, Department of Infectious Medicine, 2009.

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

KARRAS, D. J. Incidence of foodborne illnesses: preliminary data from the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet). **Annals of Emergency Medicine**, v. 35, n. 1, p. 92-93, 2000.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 672, p. 203-210, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_15.

LABOISSIÈRE, P. **OMS estima 2 milhões de mortes por comida e água contaminadas**. 2015. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-04/oms-estima-2-milhoes-de-mortes-por-comida-e-agua-contaminadas-todos-os-anos>. Acesso em: 25 abr. 2020.

LAMERS, Ryan P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC evolutionary biology**, v. 12, p. 1-15, 2012.

LEBRÓN-PALER, A. *et al.* Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 22, p. 7649-7658, 2006.

LEE, S.; CHOI, K.-H.; YOON, Y. Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, n. 2, p. 257, 2014.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. [i] *Staphylococcus aureus* [i] and food poisoning. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LIM, Y. *et al.* Control of glucose-and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 722-729, 2004.

LIMA, M. F. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 178, Dec. 2014. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00178.

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

MARANGON, C. A. **Formulação de nanopartículas de quitosana/rhamnolípido: nova alternativa para o controle de *Staphylococcus* spp.** 2019. Tese (Doutorado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019. DOI:10.11606/T.82.2019.tde-24112021-124631.

MARANGON, C. A. *et al.* Combination of rhamnolipid and chitosan in nanoparticles boosts their antimicrobial efficacy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 5, p. 5488–5499, 2020.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1597-1605, 2012.

MARINHO, P. S. S.; SILVA, R. R.; LUNA, J. M. Microbial biosurfactants and environmental applications: a narrative review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34123>.

MAYER, D. M. D. **Controle de patógenos de importância alimentar utilizando rhamnolípido e óleo-resina de *apium graveolens***. 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. DOI: 10.11606/D.82.2018.tde-20082018-145802.

MENOITA, E. *et al.* Biofilmes: conhecer a entidade. **Journal of Aging & Innovation**, v. 1, n. 2, p. 23-32, 2012.

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

MNIF, I.; GHRIBI, D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4310-4320, 2016.

MONROE, D. Lookin for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, Nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>.

MOORE, S. L. **The Mechanisms of antibacterial action of some nonionic surfactants**. 1997. Thesis (PhD) - University of Brighton, 1997.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

NAKANISHI, M. *et al.* Nano vectors with a biosurfactant for gene transfection and drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 19, n. 3, p. 165-169, 2009.

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

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. E. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2018.

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

NITSCHKE, M. *et al.* Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7864-7873, 2017.

NOSTRO, A. *et al.* Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation. **Apmis**, v. 120, n. 9, p. 733-742, 2012.

OLIVEIRA, D. K.; CARDOSO, A. M. Biofilmes microbianos: um desafio para a saúde. NewsLab, 27 nov. 2018. Disponível em: <https://newslab.com.br/biofilmes-microbianos-um-desafio-para-a-saude/>. Acesso em: 04, jan. 2023.

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

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally**. United Kingdom, 2016. (Final report and recommendations to the review of antimicrobial resistance).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Segurança dos alimentos é responsabilidade de todos**. Brasília, 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5960:seguranca-dos-alimentos-e-responsabilidade-de-todos&Itemid=875. Acesso em: 21 jan. 2020.

ORTIZ, J. *et al.* Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 98-104, 2006.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. Evaluation of antibiofilm effect of benzalkonium chloride, iodophore and sodium hypochlorite against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5317-5322, 2015.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-165, 2008.

PEREIRA, M. L. *et al.* Estafilococos: até onde sua importância em alimentos?. **Revista Higiene Alimentar**, v. 44, n. 68/69, p. 32-40, 2000.

PITTS, B. *et al.* A Microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, n. 2, p. 269-276, 2003.

RACHID, S. *et al.* Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3357-3363, 2000.

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

REIS, R. S. *et al.* Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – a review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6377-6384, 2011.

REPÚBLICA PORTUGUESA. ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA UNIVERSIDADE CATÓLICA. **Staphylococcus aureus**. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx>. Acesso em: 26 abr. 2020.

- RODRIGUES, A. I. *et al.* Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.
- RODRIGUES, R. S. **Formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável e seu controle por biossurfactantes**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.
- RUPP, M. E.; SOPER, D. E.; ARCHER, G. L. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 2975-2979, 1992.
- food sector. In: INAMUDDIN, C. O. A. **Applications of next generation biosurfactants in the food sector**. New York: Academic Press, 2023. p. 349-360.
- SALINA, A. **Pesquisa dos genes *icaD* e *bap* de adesão intracelular bacteriana e formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativa* isolados de mastite bovina**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.
- SÁNCHEZ, M. *et al.* Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, n. 1, p. 246-253, 2007.
- SANNASIDDAPPA, T. H. *et al.* The Influence of *Staphylococcus aureus* on gut microbial ecology in an in vitro continuous culture human colonic model system. **PLoS one**, v. 6, n. 8, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023227.
- SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n.3, p.545–554, 2010.
- SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SCHERBA, G. *et al.* Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, p. 2079-2084, 1991.
- SCYBERT, S. *et al.* NaCl-sensitive mutant of *Staphylococcus aureus* has a Tn917-*lacZ* insertion in its *ars* operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p. 171-176, 2003.
- SHAH, A. H. *et al.* Arcobacter – an emerging threat to animals and animal origin food products? **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 225-236, 2011.
- SHAO, B. *et al.* Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: a review. **Microbiological Research**, v. 200, p.33-44, 2017.
- SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology**. v. 52, p. 81-104, 1998.
- SILVA, E. J. *et al.* Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 117, p. 36-41, 2014.

SILVA, S. S. **Aplicação de rhamnolípido no controle de biofilmes de patógenos alimentares**. 2016. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. DOI: 10.11606/T.75.2016.tde-20102016-140442.

SILVA, S. S. *et al.* Efeito do rhamnolípido sobre a hidrofobicidade dos biofilmes de *Listeria monocytogenes*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25., 2016, Gramado. **Anais [...]**. Gramado: FAURGS, 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/491.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2020.

SILVA, S. S. *et al.* Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 7864–7873, 2017.

SINGH, P. *et al.* Production of biosurfactant stabilized nanoparticles. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 8, p. 701-707, 2017.

SMITH, M. L. *et al.* Biosurfactants: a Covid-19 perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01341.

SONG, T.; DUPERTHUY, M.; WAI, S. N. Sub-optimal treatment of bacterial biofilms. **Antibiotics**, v. 5, p. 1-18, 2016.

SORAGNI, L.; BARNABE, A. S.; MELLO, T. R. C. Doenças transmitidas por alimentos e participação da manipulação inadequada para sua ocorrência: uma revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 9, n. 2, p. 19-31, 2019.

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

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

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 12.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

TWIGG, M. *et al.* Surfactants from the sea: rhamnolipid production by marine bacteria. **Access Microbiology: an open research platform**, v. 1, n.1A, Apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0066>.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de Mexico**, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005.

VIEIRA, E. A. **Ação antimicrobiana de rhamnolípido sobre células sésseis e planctônicas de *Staphylococcus aureus*: efeito do pH**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. DOI: 10.11606/D.75.2019.tde-13032019-163150.

VOON, H. C.; BHAT, R. ; RUSUL, G. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34-55, 2012.

WELKER, C. A. D. *et al.* Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010.

WHITMAN, W. B. *et al.* **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nded., New York: Springer-Verlag, 2012. v. 5, part B.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheets: food safety**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/facts-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 9 set. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food Safety**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 25 abr. 2020.

YOSHIMURA, I. **Produção e caracterização de ramnolipídios a partir de substratos alternativos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/235666>. Acesso em: 10 jan. 2023.

ZMANTAR, T. *et al.* A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. **The New Microbiologica**, v. 33, n. 2, p. 137-145, 2010.

ZHENG, C. *et al.* Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 338-342, 2012.

ZHENG, C. *et al.* **Antibiotic resistance threats in the United States**. 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2021.