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

PAULA DE CAMARGO BERTUSO

RAMNOLIPÍDEOS COMO ALTERNATIVAS NO CONTROLE DE *Bacillus cereus* e *Leishmania infantum chagasi*

São Carlos

2022

PAULA DE CAMARGO BERTUSO

RAMNOLIPÍDEOS COMO ALTERNATIVAS NO CONTROLE DE *Bacillus cereus* e *Leishmania infantum chagasi*

VERSÃO CORRIGIDA

Tese de Doutorado 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, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Profa. Dra. Marcia Nitschke

São Carlos

2022

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

B552r

Bertuso, Paula de Camargo
Ramnlipídeos como alternativas no controle de *Bacillus cereus* e *Leishmania infantum chagasi* / Paula de Camargo Bertuso ; orientadora Marcia Nitschke. -- São Carlos, 2022.

Tese (Doutorado)- 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, 2022.

1. Bacillus cereus. 2. Endósporo. 3. Ramnolopídeo. 4. Limonero. 5. Óleo resina de aipo. 6. Atividade leishmanicida. 7. Citotoxicidade. 8. ROS. 9. Dose-dependência. 10. Exosporium. 11. Surfactante. I. Título.

Elena Luzia Palloni Gonçalves – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Paula de Camargo Bertuso

TÍTULO: "Ramnolipídeos como alternativas no controle de *Bacillus cereus* e *Leishmania infantum chagasi*"

Data da defesa: 25/04/2022

Comissão Julgadora	Resultado
Prof(a). Dr(a). Marcia Nitschke IQSC/USP -- Orientadora	Não votante
Prof(a). Dr(a). Léa Chapaval Andri Embrapa	Aprovada
Prof(a). Dr(a). Suzan Pantaroto de Vasconcelos UNIFESP	Aprovada
Prof(a). Dr(a). Cristina Paiva de Souza UFSCar	Aprovada
Prof(a). Dr(a). Taís Maria Bauab UNESP	Aprovada
Prof(a). Dr(a). Gabriel Augusto Marques Rossi Universidade Vila Velha	Aprovada

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Plinio Roberto de Aquino Bertuso e Cilmara de Camargo Bertuso, à minha irmã, Camila de Camargo Bertuso, e aos meus queridos amigos, por todo o carinho e amor incondicional.

Aos meus colegas e técnicos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana pela ajuda e por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Nitschke, pela confiança, oportunidade de aprendizado e conhecimento transmitido.

À Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, Prof. Dr. Gabriel Augusto Marques Rossi, Dra. Lea Chapaval Andri, Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcelos e Profa. Dra. Tais Maria Bauab pela participação na banca examinadora deste trabalho.

À Dra. Adriana Marcos Vivoni, curadora da Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos – CCGB – FIOCRUZ, pelo fornecimento das linhagens de *Bacillus cereus* utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal e a Dra. Genoveva Lourdes Flores Luna, do Laboratório de Investigação Endócrino Metabólica (LIEM) da UFSCar, pelo auxílio com os testes de citotoxicidade e ROS.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar, pelo fornecimento da cepa de *Leishmania infantum chagasi.*

À Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa e a Dra. Bianca Soriano, do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do DMP da UFSCar, pela realização dos testes de atividade leishmanicida.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC pelo suporte institucional e administrativo.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pelo uso de suas instalações, e ao Técnico Dr. Marcio de Paula pelo auxílio com as imagens de MEV.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de algum modo para o sucesso desta longa jornada. Sem esse apoio, o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

RESUMO

BERTUSO, P. C. **Ramnolipídeos como alternativas no controle de *Bacillus cereus* e *Leishmania infantum chagasi*.** 2022. Tese (Doutorado) – 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, São Carlos, 2022.

A utilização de antimicrobianos naturais e menos agressivos ao meio ambiente é uma tendência na indústria de alimentos. Os ramnolipídeos (RL), surfactantes de origem microbiana, vêm demonstrando potencial para controle de patógenos além de apresentarem status de "tensoativos verdes", obtidos a partir de substratos renováveis, contribuindo para a bioeconomia circular. Visando estudar a viabilidade dos RL como alternativas inovadoras no controle de microrganismos, este trabalho apresenta duas abordagens distintas. No primeiro capítulo estudou-se a ação antimicrobiana de ramnolipídeo e sua combinação com limoneno e óleo resina de aipo no controle de células vegetativas e endósporos de *Bacillus cereus,* uma bactéria conhecida por causar intoxicações alimentares e grandes prejuízos na indústria alimentícia, especialmente na indústria de laticínios por ser um importante deteriorante para a cadeia do leite. Os resultados mostraram que o RL potencializou a ação dos compostos hidrofóbicos naturais frente a *B. cereus,* além de capacidade para controle da bactéria na presença de leite como modelo alimentar. No segundo capítulo foi avaliada a citotoxicidade do RL e sua atividade leishmanicida. Os testes em células humanas mostraram que o efeito citotóxico do RL é dose dependente, atingindo cerca de 70% de morte celular após 72h de exposição nas concentrações testadas. A presença do RL também aumentou a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células e os resultados sugerem que o mesmo possa causar dano ao DNA das células em altas concentrações. O RL foi capaz de reduzir em 90% a população de leishmania após 24 h com concentrações de 1,56 mg/ml, se mostrando um potencial composto para tratamento da leishmaniose, zoonose negligenciada e com limitadas opções terapêuticas.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*. Endósporo. Ramnolipídeo. Limoneno. Óleo resina de aipo. Atividade leishmanicidal. Citotoxicidade. ROS. Dose-dependência. Exosporium. Surfactante.

ABSTRACT

BERTUSO, P. C. **Rhamnolipids as alternatives for control of *Bacillus cereus* and *Leishmania infantum chagasi*.** 2022. Tese (Doutorado) – 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, São Carlos, 2022.

The use of antimicrobials that are natural and less aggressive to the environment is a trend in the food industry. Rhamnolipids (RL), microbial-derived surfactants, have potential for control of pathogens and, in addition to their "green" status, they are obtained from renewable substrates contributing to circular bioeconomy. Aiming to study the feasibility of RL as innovative alternatives for control of microorganisms, this study presents two distinct approaches. In the first chapter, antimicrobial activity of RL and their combination with limonene and celery oleoresin, was evaluated to control vegetative cells and endospores of *Bacillus cereus,* a well-known food pathogen that causes significant economic losses in food industry, especially in dairy once it is an important deteriorating factor for the milk chain. The results shows that RL enhanced the activity of the natural hydrophobic compounds against *B. cereus* and has ability to control this bacterium using milk as food model. In the second chapter, cytotoxicity and leishmanicidal activity of RL was evaluated. The tests performed with human cells showed that the cytotoxic effect of RL is dose-dependent, reaching around 70% cell death after 72 h exposure. The presence of RL has also increased the amount of oxygen reactive species in cells, suggesting they may cause DNA damage in high concentrations. For the tests performed with leishmania, the presence of RL reduced 90% of parasite population after 24 h using concentrations of 1.56 mg/ml, showing a great potential for leishmaniosis treatment, an important neglected zoonosis with limited therapeutic options.

Keywords: *Bacillus cereus*. Endospores, Rhamnolipid. Limonene. Celery oleoresin. Leishmanicidal activity. Cytotoxicity. ROS. Dose-dependency. Exosporium. Surfactant.

Capítulo I

Avaliação do potencial antimicrobiano de ramnolipídeo e sua combinação com limoneno e óleo resina de aipo no controle de células vegetativas e endósporos de *Bacillus cereus*

RESUMO

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva capaz de formar endósporos e é conhecida por causar intoxicações alimentares e grandes prejuízos na indústria alimentícia, especialmente na indústria de laticínios. Nesse estudo, o biosurfactante ramnolípideo (RL), limoneno (LN) e óleo resina de aipo (OR) foram avaliados como alternativas naturais para controle do crescimento de células vegetativas e endósporos de *B. cereus*. Para tanto, os compostos foram testados separadamente e em combinação. Inicialmente, o RL foi avaliado frente a 14 linhagens de *B. cereus* isoladas de diferentes alimentos. A ação antimicrobiana frente à células vegetativas e endósporos revelou valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,098 mg/ml para quase todas as linhagens testadas e concentração bactericida mínima (CBM) variando entre 0,098 e > 25 mg/ml, demonstrando o grande potencial do RL no controle desta bactéria. A presença dos antimicrobianos, tanto individualmente quanto em combinação, induziu a esporulação. Também foi capaz de inibir a germinação de endósporos em até 98%, demonstrando uma redução de 3,6 log na população para a linhagem 33018 e inibição da germinação maior de 99%, com redução de 5,5 log na população da linhagem 0426. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a exposição ao RL é capaz de causar danos nas camadas mais externas dos endósporos, especialmente no exospório. Utilizando leite desnatado reconstituído como modelo alimentar observou-se que o RL promoveu inibição no crescimento de células vegetativas e endósporos de *B. cereus*, apresentando CBM de 3,13 mg/ml para as células vegetativas da linhagem 0426. O surfactante também inibiu o crescimento de bactérias no leite durante seu armazenamento sob refrigeração. De forma geral, pode-se concluir que o ramnolipídeo aumentou a ação antimicrobiana dos compostos hidrofóbicos naturais frente a células vegetativas e endósporos de *B. cereus,* sugerindo potencial para desenvolvimentos de novas estratégias para controle deste importante patógeno alimentar.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*. Endósporo. Ramnolipídeo. Limoneno. Óleo resina de aipo. Exosporium. Surfactante.

ABSTRACT

Bacillus cereus is a Gram-positive endospore-forming bacteria well-known as a food pathogen causing great losses in food industry, especially in dairy. In this study, rhamnolipids (RL) biosurfactant, limonene (LN) and celery oleoresin (OR) were evaluated as bio-based alternatives for controlling the growth of vegetative cells and endospores of *B. cereus*. To address their antimicrobial activity, the compounds were tested separately and in combination. Firstly, RL were tested against 14 *B. cereus* strains isolated from different types of foodstuffs. The antimicrobial activity against vegetative cells and endospores revealed minimal inhibitory concentration (MIC) values of 0.098 mg/ml for almost all strains and minimal bactericidal concentration (MBC) varying between 0.098 and > 25 mg/ml, demonstrating that RL are prospective candidates to control of *B. cereus*. The presence of the antimicrobials, both alone and in combination, induced bacterial sporulation in culture media. By contrast, can inhibit endospore germination up to 98%, showing 3.6 log reduction in spore outgrowth, for strain 33018; and germination inhibition of more than 99%, reducing by 5.5 log the outgrowth, for strain 0426. Scanning electronic microscopy images showed that the exposure to RL causes damage in the external layers of endospores, especially in the exosporium. When using reconstituted skim milk as a food model it was possible to observe that RL inhibited the growth of vegetative cells and endospores of *B. cereus*, with MBC of 3.13 mg/ml for the vegetative cells of strain 0426. The surfactant also reduced bacterial growth in milk under refrigerator temperature. In general, rhamnolipid enhanced the antimicrobial activity of the natural hydrophobic compounds against vegetative cells and endospores of *B. cereus,* which suggests its potential for the development of new strategies to control this important food pathogen.

Keywords: *Bacillus cereus*. Endospores. Rhamnolipid. Limonene. Celery oleoresin. Exosporium. Surfactant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagens de *B. cereus* obtida por microscopia campo claro após coloração de esporos com verde malaquita. Em rosa observa-se as células vegetativas e em verde, os endósporos.....23
Figura 2: Iniciação da esporulação a partir da atuação das quinases sensoriais de esporulação KinA, KinB, KinC, KinD e KinE, seguida da ativação do gene *Spo0A* e formação do pré-esporo antes de sua liberação no ambiente.....26
Figura 3: Foto de microscopia eletrônica de varredura de endósporo de *B. cereus* proveniente de linhagem emética.....27
Figura 4: Exemplo de estruturas químicas de mono- e di-ramnolipídeo.....30
Figura 5: Estrutura química do R-limoneno.....33
Figura 6: Representação esquemática do protocolo para determinação de CIM e CBM.....42
Figura 7: Representação esquemática do protocolo para montagem da curva de sobrevivência.....43
Figura 8: Representação esquemática do protocolo para montagem do experimento de inibição da germinação de endósporos.....44
Figura 9: Representação esquemática do protocolo para avaliação do crescimento de células vegetativas e esporos de B. cereus em modelo alimentar.....47
Figura 10: Curva de sobrevivência de *B. cereus* ATCC 33018 na presença de (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), CIM (vermelho) e 16x CIM (azul). As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.....53
Figura 11: Coloração de endósporos de *B. cereus* 33018 para os tratamentos (a) controle, (b) OR + RL CIM 14h e (c) OR + RL CIM 24h. Os endósporos são visíveis nas imagens (b) e (c) como regiões sem coloração no interior das células (setas). Magnificação 1000x.....54
Figura 12: Imagens das placas de Petri utilizadas para contagem de células viáveis nos experimentos de curva de sobrevivência. Na amostra sem diluição não foi observado crescimento após incubação, entretanto, após diluição da amostra, diversas colônias foram observadas. (a) LN + RL; (b) RL.....55
Figura 13: Curva de sobrevivência de *B. cereus* CCGB 0426 na presença de (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), CIM (vermelho) e CBM (azul). As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.....56

Figura 14: Porcentagem de inibição da germinação de endósporos de *B. cereus* 33018 para os tratamentos contendo RL, OR + RL e LN + RL. As concentrações utilizadas para este experimento foram 16x e 32x CIM. As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).....58
Figura 15: Redução Log da germinação de endósporos de *B. cereus* 33018 após tratamento com (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), 16xCIM (vermelho) e 32x CIM (azul). As barras de erros representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.....59
Figura 16: Porcentagem de inibição da germinação de endósporos de *B. cereus* 0426 para os tratamentos contendo RL, OR + RL e LN + RL. As concentrações utilizadas para este experimento foram CBM e 2x CBM. As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).....60
Figura 17: Redução Log da germinação de endósporos de *B. cereus* 0426 após tratamento com (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), CBM (vermelho) e 2xCBM (azul). As barras de erros representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.....61
Figura 18: Imagens de MEV ilustrando o efeito do RL na inibição da germinação de endósporos de *B. cereus* 0426. A presença de RL não permite que as células germinem. (a) Controle sem RL 2 h; (b) RL 2 h; (c) RL 24 h.....64
Figura 19: Imagens de MEV de endósporos da *B. cereus* 0426 submetidos a tratamento com RL. A presença de RL modificou a superfície dos endósporos e, em alguns casos, promoveu a lise celular. (a) e (b) Controle sem RL 0 h; (c) e (d) RL 24 h.....65
Figura 20: Curva de crescimento de endósporos de *B. cereus* 0426 na presença de RL utilizando leite desnatado reconstituído como meio de cultivo na temperatura de 30 °C.....67
Figura 21: Fotos do experimento realizado com endósporos de *B. cereus* a 30 °C após 24 horas de inoculação. (a) Controle; (b) RL 6,25 mg/ml; (c) Leite antes da inoculação dos endósporos.....68
Figura 22: Curva de crescimento de *B. cereus* 0426 na presença de RL utilizando leite desnatado reconstituído como meio de cultivo a 4 °C.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos do uso de RL no controle de agentes patogênicos.....31

Tabela 2: Linhagens utilizadas nesse estudo e suas respectivas origens.....39

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de RL frente à *B. cereus*.....49

Tabela 4: Dados de resistência à antibióticos e genes de virulência de algumas linhagens de *B. cereus*.....50

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do RL, LN e OR nas células vegetativas de *B. cereus* 33018.....52

Tabela 6: Atividade antimicrobiana do RL frente a células vegetativas de *B. cereus* 0426.....52

Tabela 7: Atividade antimicrobiana do RL frente à endósporos de diferentes linhagens de *B. cereus*.....71

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

°C - graus Celsius

µg/ml - Micrograma por mililitro

µl - Microlitro

µm - micrômetro

AN - Agar nutriente

ANOVA - análise da variância

ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*, em Inglês

BS - Biossurfactantes

CBM - Concentração bactericida mínima

CCGB - Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos

CIM - Concentração inibitória mínima

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

DTAs - Doenças transmitidas por alimentos

EPS - Exopolissacarídeos

FDA - *Food and Drug Administration*, em Inglês

g/l - Grama por litro

HBL - Balanço hidrofílico-lipofílico

HMDS - hexametildisilazano

kDa - Kilodalton

KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico

kV - Kilovolts

LN - Limoneno

mg/l - Miligrama por litro

mg/ml - Miligrama por mililitro

MgSO4 - Sulfato de magnésio

ml - Mililitro

mm - Milímetro

nm - Nanômetro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

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

NaCl - Cloreto de sódio

OR - Óleo resinas / Óleo resina de aipo

pH - Potencial hidrogeniônico

RL - Ramnolipídeo

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

tRNA - Ácido ribonucleico transportador

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....23
2.1. *Bacillus cereus*.....23
2.2. Ramnolipídeos e atividade microbiana.....28
2.3. Limoneno e Óleo resina de aipo.....33
3. OBJETIVOS.....37
3.1. Objetivo geral.....37
3.2. Objetivos específicos.....37
4. METODOLOGIA.....39
4.1. Microrganismos.....39
4.2. Meios de cultura.....40
4.3. Ramnolipídeo.....40
4.4. Limoneno.....40
4.5. Óleo Resina de Aipo.....40
4.6. Preparo e padronização do inóculo bacteriano.....40
4.7. Preparo das soluções estoque.....41
4.8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....41
4.9. Curva de sobrevivência (*time-kill*).....42
4.10. Inibição da germinação de endósporos de *B. cereus*.....43
4.11. Coloração de endósporos com verde malaquita.....45
4.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de endósporos de *B. cereus*.....46
4.13. Avaliação do crescimento de células vegetativas e esporos da linhagem *B. cereus* 0426 em modelo alimentar (leite desnatado reconstituído).....46
4.14. Análise estatística.....48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....49
5.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....49
5.2. Curva de sobrevivência (*time-kill*).....53
5.3. Inibição da germinação de endósporos.....58
5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de endósporos de *B. cereus*.....63
5.5. Avaliação do crescimento de células vegetativas e esporos da linhagem B. cereus 0426 em modelo alimentar (leite desnatado reconstituído).....66
5.6. Atividade antimicrobiana de RL frente a endósporos de *B. cereus*.....70

6. PRINCIPAIS RESULTADOS.....73
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS 75
REFERÊNCIAS.....77

1. **INTRODUÇÃO**

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são aquelas relacionadas ao consumo de água ou alimentos contaminados e se apresentam como quadros de náuseas, vômitos e/ou diarreias, dores abdominais, algumas vezes febre, meningite ou até insuficiência renal (BRASIL, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2019). A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 600 milhões de pessoas adoecem após ingestão de alimentos contaminados e 420 mil morrem todos os anos (WHO, 2019). Entre os agentes causadores de surtos de DTA no Brasil de 2007 a 2017, as bactérias, entre elas *Bacillus cereus*, foram responsáveis por mais 95% dos casos (BRASIL, 2017). Entre os mais afetados estão aqueles que possuem sistema imunológico enfraquecido, como, por exemplo, crianças menores que 5 anos de idade, idosos, mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos (WHO, 2015; 2019).

As intoxicações alimentares causadas por *B. cereus* são comumente causadas pelo consumo de carne, molhos, massas, sobremesas e produtos lácteos contaminados (TURNBULL, 1996). Também existem inúmeros casos reportados de intoxicação após ingestão de arroz cozido que permaneceu longos períodos de tempo acondicionado em temperatura ambiente (TURNBULL, 1996).

Estudos relacionados aos surtos de intoxicação alimentar registrados na França entre 2007 e 2014, demonstraram que concentrações de apenas 400 UFC/g de *B. cereus* foram suficientes para causar sintomas nos consumidores (GLASSET et al., 2016).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 1998 e 2008, refeições contendo arroz foram responsáveis por 50% dos casos de surto relacionados a B. *cereus* (BENNETT; WALSH; GOULD, 2013). Mais recentemente, após um surto de intoxicação em uma rede de *fast food* de comida chinesa, 33 isolados de *B. cereus* foram identificados em amostras de feijão oriundos de planta de processamento de grãos (CARROLL et al., 2019).

A presença de *B. cereus* associada à biofilmes, juntamente com outras bactérias, foi relatada em laticínios e em linhas de pasteurização, sendo as bactérias do gênero *Bacillus* as que estavam presente em maior quantidade (SHARMA; ANAND, 2002). A estrutura dos biofilmes garante maior proteção contra fatores ambientais adversos (VU et al., 2009), o que dificulta ainda mais sua eliminação. Biofilmes também têm sido associados a diversas condições médicas, como, por exemplo, periodontite, fibrose cística, endocardite e otite, além de serem capazes de se desenvolver em implantes e equipamentos médicos, como cateteres

(DONLAN, 2002; SRIVASTAVA; BHARGAVA, 2016). Na fase de dispersão de um biofilme, células são dispersas no ambiente para colonizar novos nichos; no caso de um biofilme existente em um dispositivo médico, existe a possibilidade dessas células infectarem a corrente sanguínea ou o trato urinário do paciente (DONLAN, 2002; SRIVASTAVA; BHARGAVA, 2016). Extrapolando para a indústria alimentícia, se um biofilme que está crescendo em uma linha de pasteurização passa pelo processo de dispersão, é possível que essas células venham a contaminar o produto final, podendo causar intoxicações em seus consumidores.

Rossi et al. (2018), estudou isolados de *B. cereus* encontrados em diversos pontos da cadeia de produção de laticínios, desde equipamentos e utensílios até no produto final após processamento e disponível para consumo. De forma geral, grande parte dos isolados apresentam genes responsáveis pela produção de toxinas, como *cytK*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB* e *nheC* (ROSSI et al., 2018). O fato de isolados de *B. cereus* terem sido encontrados em praticamente todas as etapas da cadeia chegando aos produtos oferecidos ao consumidor final, mostra mais uma vez a dificuldade de eliminação dessa bactéria pelos métodos tradicionais de limpeza utilizados na indústria; além do fato de que a presença de genes ligados á produção de toxinas reforça a capacidade que esses isolados possuem em causar quadros de intoxicação.

Esses estudos ajudam a ilustrar o potencial dessa bactéria em causar prejuízos, tanto na indústria alimentícia quanto na saúde da população, mesmo em pequenas quantidades. Por este motivo é extremamente importante o desenvolvimento de novos métodos de limpeza e desinfecção das linhas de produção e ambientes que envolvem alimentos, garantido assim qualidade e segurança aos consumidores (NITSCHKE; COSTA, 2007; SHI; ZHU, 2009).

Atualmente existe grande demanda pelo uso de produtos naturais, mais seguros e que não causem danos ao meio ambiente; por este motivo, a procura por aditivos alimentares “verdes” vêm aumentando consideravelmente (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; DAVISON[1], 1997 *apud* LEONARD et al., 2010). Além disso, o uso de produtos naturais também se mostra interessante quando consideramos o desenvolvimento de resistência microbiana aos desinfetantes tradicionalmente utilizados (GRAY et al., 2018).

---

[1] Davidson, P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobialcompounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. ASM, New York, pp. 520–556.

Os ramnolipídeos (RL) são biossurfactantes sintetizados principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, que se apresentam como alternativa ao uso de tensoativos sintéticos pois apresentam características físico-químicas similares (ABALOS et al., 2001; NITSCHKE; SILVA, 2018), com a vantagem de possuir baixa toxicidade, biodegradabilidade e serem produzidos a partir de substratos renováveis (NITSCHKE; COSTA, 2007; NITSCHKE; SILVA, 2018). O uso de resíduos como matéria prima para a produção de Ramnolipídeos têm sido reportado por alguns autores com o uso de resíduos agroindústrias e óleos em geral, e, além de potencialmente diminuírem os custos de produção do biossurfactantes, contribui para a bioeconomia circular (GAUR et al., 2022). Além disso, existem diversos estudos na literatura que demonstram o potencial do RL como agente antimicrobiano, anti-adesivo e anti-biofilme contra patógenos alimentares (ARAUJO et al., 2016; CLEMENTS et al., 2019; MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; SILVA et al., 2017)

O limoneno (LN) é o principal constituinte do óleo essencial de laranja e outros cítricos (GÜLAY KIRBAŞLAR et al., 2009; OKUNOWO et al., 2013; SUN, 2007). Esses óleos essenciais têm apresentado atividade antimicrobiana frente a diversos fungos e bactérias, incluindo patógenos alimentares (ANDRADE et al., 2014; GOMES et al., 2014; GÜLAY KIRBAŞLAR et al., 2009; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; OKUNOWO et al., 2013). Óleo resinas (OR) são misturas viscosas de óleos essenciais e resinas extraídas com o uso de solventes orgânicos (ARSHAD et al., 2018; SOWBHAGYA, 2014) que também tem demonstrado atividade antimicrobiana (MASSON et al., 2013; MAYER, 2017). Muitas OR têm como seu principal constituinte o LN, ao qual se credita seu potencial antimicrobiano (OKUNOWO et al., 2013).

Apesar de óleos essenciais e óleo resinas derivadas de plantas apresentarem potencial no controle de patógenos alimentares, seu uso é limitado devido às altas concentrações necessárias, baixa solubilidade em água e alto impacto sensorial (LUCERA et al. 2012). Uma alternativa seria seu uso combinado com agentes emulsificantes, como os surfactantes, que permitiriam melhorar a solubilidade em água, reduzindo a quantidade de óleo necessária e seus efeitos sensoriais indesejados. Além disso, a combinação de mais de um agente antimicrobiano poderia também potencializar seus efeitos, o que facilitaria a eliminação das bactérias no ambiente industrial, dificultando seu desenvolvimento nos alimentos manipulados e processados.

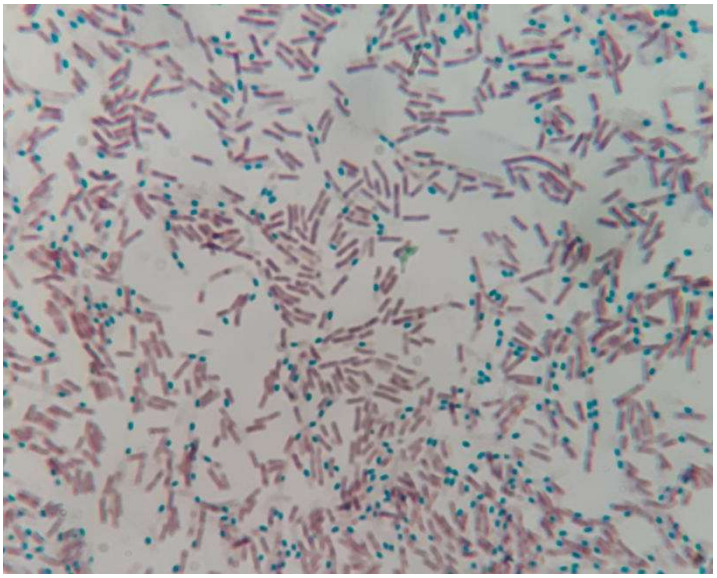
O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do ramnolipídeo, limoneno e óleo resina de aipo quando utilizados individualmente e em combinação no controle de células vegetativas e endósporos de *Bacillus cereus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bacillus cereus

Bacillus cereus (Figura 1) são bactérias Gram-positivas, aeróbicas, dotadas de mobilidade, em formato de bastonete (largura de 1 µm e comprimento entre 3 a 5 µm), possuem capacidade de esporulação e são conhecidas por serem patógenos ocasionais de humanos e outros animais (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2012; RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015; TURNBULL, 1996). Segundo a literatura, esta bactéria é capaz de crescer em temperaturas entre 4 a 48 °C e pH variando entre 4,9 até 9,3; além de tolerar concentrações de sal de até 7,5% (FDA, 2012). *B. cereus* também é conhecido por sua capacidade de crescer em diversos tipos alimentos causando intoxicações alimentares e grandes prejuízos na indústria de alimentos (TURNBULL, 1996).

Figura 1: Imagens de *B. cereus* obtida por microscopia campo claro após coloração de esporos com verde malaquita. Em rosa observa-se as células vegetativas e em verde, os endósporos.



Fonte: Autoria própria.

Biofilmes são comunidades multicelulares incorporadas em uma matriz extracelular composta de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, onde as células bacterianas exibem características fisiológicas diferentes quando comparadas a forma planctônica (DONLAN;

COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002; WATNICK, 2000). As células de *B. cereus* também apresentam a capacidade de aderir a superfícies, formando biofilmes, o que lhes garante maior proteção contra fatores ambientais adversos, desidratações e alterações de pH, temperatura e agentes químicos (VU et al., 2009), dificultando ainda mais a sua eliminação.

Algumas espécies do gênero *Bacillus*, incluindo o *B. cereus*, são também a causa de abcessos, infecções em queimaduras e ferimentos, infecções de ouvido, endocardites, meningites e infecções do trato urinário e respiratório, entre outras (TURNBULL, 1996).

Segundo o FDA, uma quantidade de células maior que 10^6 células por grama de alimento já indica potencial risco à saúde humana, apesar de na maioria dos casos, as toxinas que *B. cereus* liberam nos alimentos serem responsáveis pelos sintomas (FDA, 2012).

B. cereus pode causar duas formas de intoxicação alimentar: (1) diarreica, caracterizada por episódios de diarreia e dor abdominal cerca de 8 a 16 horas após ingestão do alimento contaminado; ou (2) emética, caracterizada por náuseas e vômitos cerca de 1 a 5 horas após consumo do alimento contaminado (FDA, 2012; TURNBULL, 1996).

No caso da intoxicação do tipo diarreica, a presença 3 toxinas têm sido extensivamente estudadas: a hemolisina BL (Hbl), a enterotoxina não-hemolítica (Nhe) e a citotoxina K (CytK) (BÖHM et al., 2016). Ao estudar o comportamento dos genes e operons responsáveis pela produção dessas toxinas, Böhm et al. (2016), determinaram que, em condições de deficiência de aminoácidos, havia um aumento na ativação da transcrição de seus genes promotores, o que sugere uma maior produção de toxinas apesar da redução no crescimento da bactéria. A alta presença dos genes responsáveis pela produção dessas toxinas em isolados de *B. cereus* têm sido reportada por outros grupos de pesquisa (DIETRICH et al., 2021; GUINEBRETIÈRE; BROUSSOLLE; NGUYEN-THE, 2002; ROSSI et al., 2018).

Já a intoxicação do tipo emética é associada com a toxina cereulide, um peptídeo cíclico de pequena massa molar resistente ao pH, calor e à ação de proteases (AGATA et al., 1994; FDA, 2012). Essa toxina pode resistir ao processo de esterilização em autoclave (aquecimento de 121 °C por 20 minutos), não perde sua atividade mesmo após 60 dias na geladeira (4 °C) e suporta pH entre 2 e 11 (FDA, 2012). Andersson et al. (2007) compararam extratos de 2 linhagens de *B. cereus,* uma produtora de cereulide e a outra não, observando que a presença da toxina foi capaz de intensificar a toxicidade da bactéria em células humanas e murinas, além de inibir a síntese de RNA em células de mamíferos e reduzir a mobilidade de espermatozoides de Javali. Apesar de incomum, existem também relatos de falha hepática e

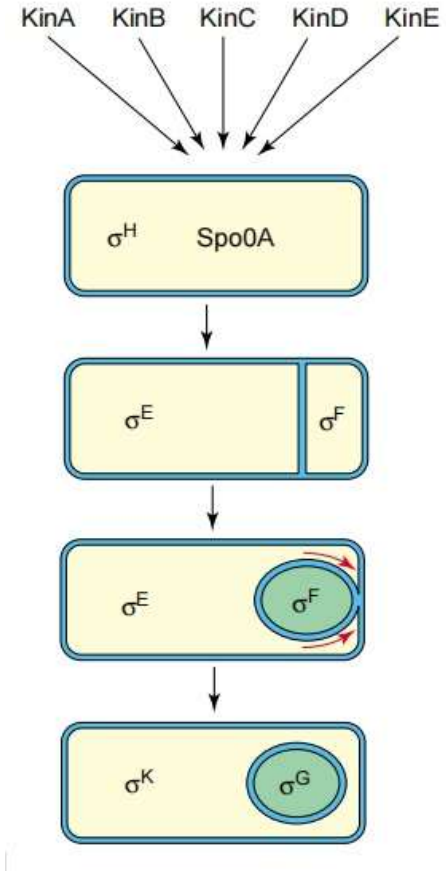
morte associados à enterotoxina cereulide de *B. cereus* (DIERICK et al., 2005; FDA, 2012; PÓSFAY-BARBE et al., 2008). Beisl et al. (2020) relatou em trabalho recente a possibilidade de potencialização do efeito citotóxico da cereulide ao ser combinada com deoxinivalenol, uma micotoxina encontrada comumente em produtos cereais.

A produção da toxina cereulide têm sido associada também ao processo de formação de endósporos de *B. cereus*, que causam intoxicações pois conseguem sobreviver ao cozimento e à pasteurização e podem germinar e liberar as toxinas caso o alimento não seja acondicionado na temperatura adequada (ALI et al., 2017; TALLENT; KNOLHOFF, 2020; TURNBULL, 1996). De forma geral, os endósporos de *Bacillus* são resistentes ao calor, radiação, desinfetantes e dessecação, além de diversos outros tipos de estresses físicos e químicos, tornando-os de difícil eliminação tanto de materiais médico-hospitalares quanto de alimentos (HUANG et al. 2021; RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015; TURNBULL, 1996).

O mecanismo pelo qual acontece a esporulação tem sido extensivamente estudado em *Bacillus subtilis*, no entanto, foi também observado que alguns dos genes envolvidos neste processo possuem sítios ativos conservados para diversas espécies do gênero *Bacillus* (STEPHENSON; HOCH, 2002). Com isso é possível especular que o mecanismo presente em *B. cereus* seja similar. Acredita-se que mais de 400 genes estão envolvidos no processo de esporulação, atuando basicamente na síntese de proteínas específicas dos endósporos e reprimindo os genes envolvidos no funcionamento das células vegetativas (WOLSKA; GRUDNIAK; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, 2007).

Em condições ambientais adversas, onde o crescimento passa a não ser mais uma opção viável, as quinases sensoriais de esporulação KinA, KinB, KinC, KinD e KinE fosforilam o gene regulador da esporulação *Spo0F*, que por sua vez ativa o gene *Spo0A* e o fator de transcrição σ^H para dar início ao processo de esporulação (PIGGOT; HILBERT, 2004; STEPHENSON; HOCH, 2002). A célula então sofre uma divisão assimétrica, onde a ativação de σ^F dará origem ao pré-esporo. Na célula-mãe, por sua vez, haverá a produção de uma cascata proteica que promoverá a degradação do septo assimétrico e acionará a migração da membrana que envolverá o pré-esporo (PIGGOT; HILBERT, 2004) (Figura 2). Depois que o pré-esporo é liberado no interior da célula-mãe, é ativada uma segunda cascata de proteínas e transcritos que garantirão resistência a este esporo, num processo conhecido por maturação do esporo e, finalmente, o endósporo é liberado no ambiente após a lise da célula-mãe (PIGGOT; HILBERT, 2004; WOLSKA; GRUDNIAK; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, 2007).

Figura 2: Iniciação da esporulação a partir da atuação das quinases sensoriais de esporulação KinA, KinB, KinC, KinD e KinE, seguida da ativação do gene *Spo0A* e formação do pré-esporo antes de sua liberação no ambiente.



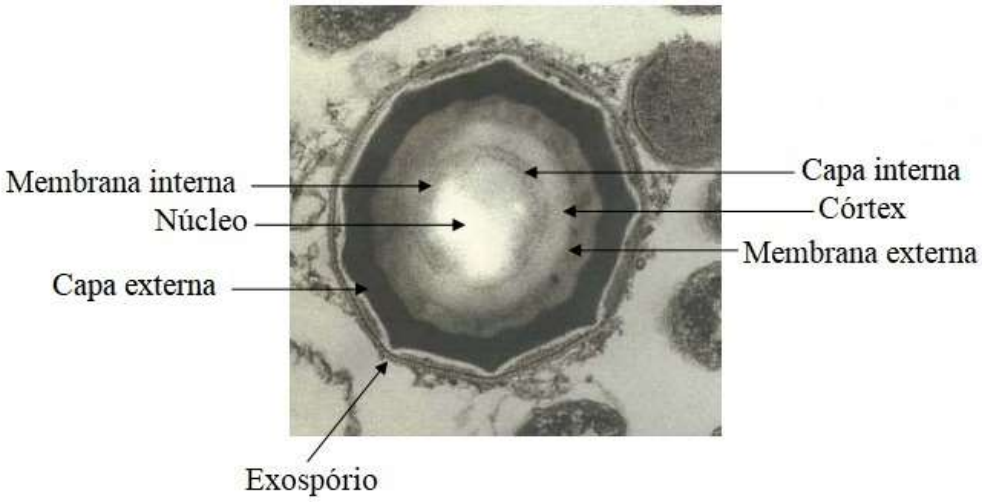
Fonte: Modificado de Piggot e Hilbert (2004).

Durante o processo de esporulação, com a ativação do gene *Spo0A*, a expressão de *PclR* é reprimida, fazendo com que a bactéria pare de produzir toxinas (LERECLUS et al., 2000). O gene *PclR* é um regulador da transcrição presente em diversas espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, incluindo o *B. cereus*, que atua com o auxílio de um peptídeo chamado PapR. O gene *PapR* é expresso sob o controle do regulador *PlcR* e seu produto é secretado pela célula para, em seguida, retornar para o interior celular em sua forma processada e finalmente ativar o gene *PlcR* (GOHAR et al., 2008; SLAMTI; LERECLUS, 2002). Dessa forma, o sistema PlcR-PapR atua como um sistema de quorum-sensing que controla a expressão de diversos genes de toxinas ligadas à virulência, como por exemplo: *citK*, *nheA*, *nhB* e *nheC* (GOHAR et al., 2008).

O processo de esporulação reduz entre 75 a 90% o conteúdo de água de uma célula vegetativa, fato que pode ser relacionado à alta resistência ao calor e à produtos químicos observada (WOLSKA; GRUDNIAK; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, 2007).

A posição e forma do endósporo varia de acordo com a espécie da bactéria, no caso do *B. cereus* os endósporos possuem predominantemente forma cilíndrica e posição subterminal (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Sua estrutura é mais complexa do que a da célula vegetativa (WOLSKA; GRUDNIAK; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, 2007), como é possível observar na Figura 3:

Figura 3: Foto de microscopia eletrônica de varredura de endósporo de *B. cereus* proveniente de linhagem emética.



Fonte: Modificado de Shaheen (2009)

O núcleo do esporo, que é uma estrutura análoga ao protoplasto das células vegetativas, contém o DNA, ribossomos, tRNA, além de altas concentrações de ácido dipicolínico e íons Ca^{2+} (SETLOW, 2006; SHAHEEN, 2009a; WOLSKA; GRUDNIAK; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, 2007). A presença do ácido dipicolínico é característica dos endósporos, não estando presente nas células vegetativas; esse ácido se apresenta complexado com o Ca^{2+} e tem participação importante na resistência à desnaturação térmica do DNA dos endósporos, o que garante sua alta resistência ao calor, além de atuar como auxiliar no processo de desidratação do endósporo (MADIGAN et al., 2016; TURNBULL, 1996).

Envolvendo o núcleo encontram-se 3 estruturas: membrana interna, córtex e membrana externa. Essas estruturas darão origem à parede celular da célula vegetativa quando o endósporo germina (TURNBULL, 1996). O córtex é composto basicamente por mureína (peptideoglicano) que apresenta modificações estruturais quando comparada à mureína encontrada nas células vegetativas e possui importância na resistência à radiação e ao calor (TURNBULL, 1996; WOLSKA; GRUDNIAK; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, 2007).

Os endósporos também apresentam estruturas que o ajudam a se proteger de diversos agentes químicos e enzimas. Essas estruturas são as capas, que são formadas por várias camadas de proteínas, em sua maioria, exclusivas dos endósporos, e que podem corresponder em até 50% do seu volume (MADIGAN et al., 2016; SETLOW, 2006; SHAHEEN, 2009b; TURNBULL, 1996).

Por fim, a camada mais externa do endósporo é chamada de Exospório e consiste em um envoltório proteico (MADIGAN et al., 2016). Assume-se que esta estrutura desempenhe um papel na infecção, especialmente para *B. anthracis*, que é membro da família do *B. cereus*, pois ela que faz o contato inicial com o hospedeiro e suas células de defesa (BOZUE; WELKOS; COTE, 2015).

Uma vez que as condições desfavoráveis são minimizadas e/ou eliminadas, os endósporos são capazes de germinar, dando origem a células vegetativas com capacidade de multiplicação (ALI et al., 2017; HUANG et al, 2021; RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em seu Guia de Alimentos e Vigilância Sanitária, recomenda algumas medidas simples de como evitar casos de contaminação de alimentos durante seu preparo e armazenamento, são elas: (1) manter o local e os utensílios limpos, (2) separar alimentos crus e cozidos para evitar contaminação cruzada, (3) cozinhar completamente os alimentos e os reaquecer de forma correta, (4) manter os alimentos sempre refrigerados e (5) utilizar água e matérias-primas seguras no preparo (ANVISA, 2016).

2.2. Ramnolipídeos e atividade antimicrobiana

Surfactantes são compostos anfifílicos que possuem capacidade de se acumular entre duas fases, como óleo/água, reduzindo a tensão superficial e interfacial (DESAI; BANAT, 1997). Esses compostos possuem diversas aplicações na indústria, entre elas, produção e

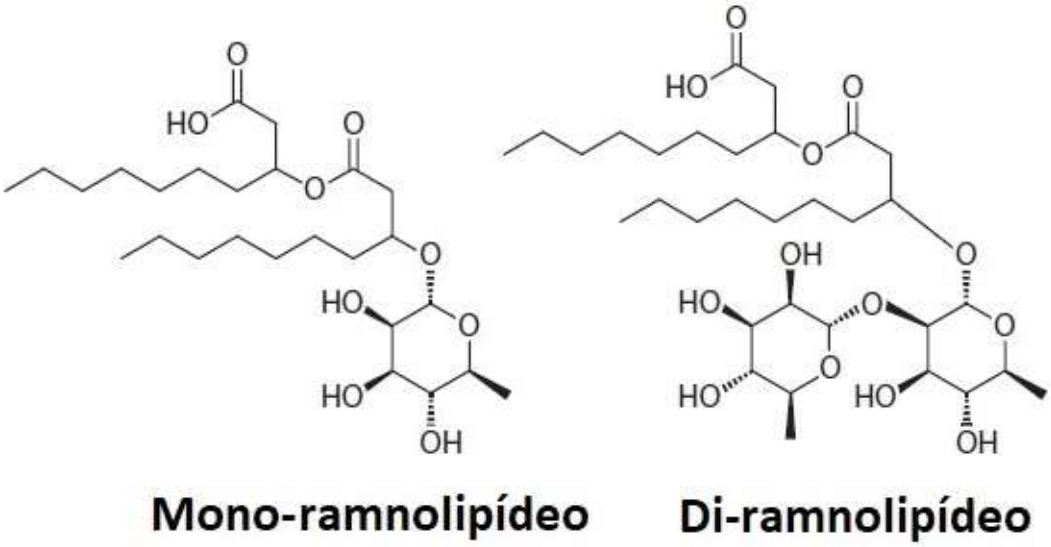
processamento de alimentos, produtos agroquímicos, produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, detergentes, aditivos para combustíveis, lubrificantes, tintas, adesivos, remediação de solos e aplicações médicas (SCHRAMM; STASIUK; MARANGONI, 2003).

Surfactantes derivados de microorganismos tem se mostrado capazes de substituir os sintetizados quimicamente com características surfactantes e emulsificantes similares, tendo como vantagens o fato de apresentarem baixa toxicidade, serem biodegradáveis e obtidos a partir de substratos renováveis, fornecendo uma alternativa mais sustentável para a indústria e contribuindo para a bioeconomia circular (ABALOS et al., 2001; GAUR et al., 2022; NITSCHKE; COSTA, 2007; NITSCHKE; SILVA, 2018). Diversos estudos vêm relatando o uso de resíduos agroindustriais e óleos em geral com alto conteúdo de carbono para a produção de surfactantes; entre os resíduos utilizados é possível citar: cascas de laranja, banana, cenoura e lima, óleo de coco, de palma e de soja usados para fritura e bagaço de cana-de-açúcar (GAUR et al., 2022; GEORGE; JAYACHANDRAN, 2009; SINDHU et al., 2016).

Dentre os surfactantes derivados de microorganismos podemos citar os ramnolipídeos (RL), que são uma classe de biossurfactantes (BS) produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* (JARVIS; JOHNSON, 1949). Estruturalmente, os ramnolipídeos são glicolipídeos constituídos de moléculas de ramnose (porção hidrofílica) ligadas a cadeias de ácido β-hidroxi-decanóico (porção hidrofóbica) (JARVIS; JOHNSON, 1949; LANG; WULLBRANDT, 1999). Os RL se apresentam como uma mistura de homólogos com variação no número de ramnoses e tamanho da cadeia hidrofóbica, sendo predominantemente observados o mono e o di-RL (Figura 4), que são constituídos e uma e duas ramnoses, respectivamente (LANG; WULLBRANDT, 1999; LOTFABAD et al., 2010).

Muitos trabalhos na literatura, vêm destacando as propriedades antimicrobianas dos RL. Quando realizada uma busca na plataforma Scopus Elsevier, utilizando-se as palavras-chave “rhamnolipid” e “antimicrobial”, foram encontrados 235 trabalhos publicados entre os anos 2000 e 2021. O primeiro trabalho que reporta a atividade antimicrobiana dos RL remete ao ano de 1971 onde ITOH e colaboradores, demonstraram a eficácia de dois tipos de RL produzidos por *P. aeruginosa* contra diversas linhagens bacterianas. Desde então, diferentes homólogos de RL foram testados frente a amplo espectro de microrganismos, sendo a maioria dos estudos desenvolvidos sobre bactérias tanto planctônicas como em biofilmes.

Figura 4: Exemplo de estruturas químicas de mono- e di-ramnolipídeo.



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

Sotirova et al. (2008) reportaram que a presença de RL no meio de cultura inibiu o crescimento de várias bactérias Gram-positivas, enquanto para as Gram-negativas o crescimento foi semelhante ao controle, sugerindo maior resistência das células Gram-negativas devido provavelmente às diferenças existentes na parede celular destes dois tipos de bactérias. Entretanto, existem diversos relatos na literatura associados a ação antimicrobiana dos RL incluindo muitas linhagens de bactérias Gram-negativas (Tabela 1).

Em estudo recente, RL produzidos por *Pseudomonas* sp. inibiram o crescimento de *B. subtilis, S. aureus e Aeromonas hydrophila*. Os RL também promoveram a redução de 89% da produção de EPS em *S. aureus* (SABARINATHAN et al., 2021). Sabe-se que o EPS está envolvido na formação de biofilmes e na proteção das células a agentes externos (DAVENPORT; CALL; BEYENAL, 2014), mostrando que os RL podem impedir também a formação de biofilmes.

Em uma abordagem mais aplicada, preparações contendo RL foram utilizadas com êxito para o recobrimento de laranjas com o objetivo de prolongar seu tempo de prateleira uma vez que retardaram a colonização bacteriana nessas frutas (ADETUNJI et al., 2018). Com o recobrimento, os autores observaram uma redução de até 2,6 UFC/g no crescimento bacteriano e redução de até 5,6 UFC/g no crescimento de mofos e leveduras nas frutas durante as 8 semanas de experimento.

Diversos estudos na literatura destacam a ação dos RL frente a células vegetativas de *B. cereus* (ABALOS et al., 2001; FERREIRA; VIEIRA; NITSCHKE, 2019; HABA et al., 2003; LOTFABAD; SHAHCHERAGHI; SHOORAJ, 2013; MAYER, 2017; NDLOVU et al., 2017) porém não há relatos de sua atividade contra endósporos desta bactéria.

Além de ação contra patógenos alimentares, a literatura descreve diversas bactérias, fungos, células cancerígenas humanas e até mesmo pupas de mosquitos sensíveis ao RL, ilustrando o vasto campo de aplicação para esse biossurfactante.

Tabela 1: Exemplos do uso de RL no controle de agentes patogênicos

Fonte de RL	Célula alvo	Referência
RL produzido por *P. aeruginosa* isolada de solo contaminado	*E. coli; Salmonella thyphimurium; B. cereus; Microccocus luteus; S. aureus; Aspergillus niger; Penicillium crysogenum*	ABALOS et al., 2001
RL produzido por *P. aeruginosa* com óleo de fritura como fonte de carbono	*Salmonella thyphimurium; E. coli, Klebsiella pneumoniae; S. aureus; B. cereus; Micrococcus luteus; Penicillium funiculosum*	HABA et al., 2003
RL produzido por linhagens de *Pseudomonas sp.*	*Streptococcus pneumonia; Staphylococcus epidermidis; S. aureus; B. subtilis; B. cereus; Enterococcus faecalis*	LOTFABAD; SHAHCHERAGHI; SHOORAJ, 2013
RL comercial + nisina	*Listeria monocytogenes*	MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013
Emulsões de RL + óleos essenciais	*Candida albicans; S. aureus* (MRSA)	HABA et al., 2014
Extratos comerciais de di e mono-RL	Linhagens de células humanas (HK-2 e hepatócitos) e de câncer (HepG2, Caco-2, Hela e MCF-7)	JIANG et al., 2014
Di-RL produzido por *Pseudomonas fluorescens*	Pupas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*	PRABAKARAN et al., 2015
RL produzido por *P. aeruginosa* isolada de	*Fusarium oxysporum*	DEEPIKA; RAMU SRIDHAR;

mangue		BRAMHACHARI, 2015
RL produzido por *Pseudomonas sp.*	*Listeria monocytogenes; Pseudomonas fluorescens*	ARAUJO et al., 2016
RL e RL + óleoresina de aipo	*Listeria monocytogenes; B. cereus*	MAYER, 2017
RL produzido por *Pseudomonas sp.* + NaCl	*Aspergillus niger; Aspergillus carbonarius*	RODRIGUES et al, 2017
RL produzido por *Burkholderia thailandensis*	*Streptococcus oralis; Actinomyces naeslundii; Neisseria mucosa; Streptococcus sanguinis*	ELSHIKH et al., 2017
RL produzido por *P. aeruginosa* isolada de esgoto	*E. coli; Klebsiella pneumoniae; Salmonella typhimurium; Salmonella enterica; Serratia marcescens; S. aureus; B. cereus; Enterococcus faecalis; Candida albicans; Cryptococcus neoformans*	NDLOVU et al., 2017
RL comercial	*Listeria monocytogenes; B. cereus; S. aureus*	FERREIRA; VIEIRA; NITSCHKE, 2019
Nanopartículas de RL + quitosana	*S. aureus; Staphylococcus epidermidis; Klebsiella oxytoca*	MARANGON et al., 2020
RL produzido por *Pseudomonas sp.*	*B. subtilis, S. aureus; E. coli; Aeromonas hydrophila;* células de sarcoma humano Ht-1080	SABARINATHAN et al., 2021

Fonte: Autoria propria.

É amplamente aceito que a membrana citoplasmática é o local principal da ação dos surfactantes (NICKERSON; ASPEDON[2], 1992 *apud* NIELSEN et al., 2005). Os BS formam agregados na superfície celular, levando à formação de poros transmembrana e favorecendo a saída de constituintes celulares (KING et al., 1991; SOTIROVA et al., 2008). Ao interagir

[2] Nickerson, K. W., and A. Aspedon.1992. Detergent-shock response in enteric bacteria. **Molecular Microbiology.** 6:957–961.

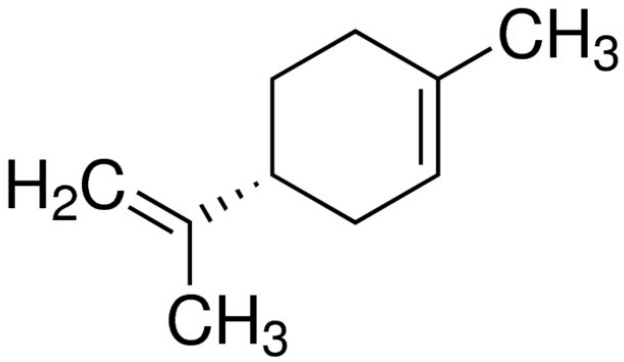
com a membrana, o BS também pode favorecer a solubilização das proteínas presentes em sua superfície, contribuindo para o extravasamento de conteúdo intracelular (SOTIROVA et al., 2008). Uma vez que a membrana é comprometida, a permeabilidade das células aumenta, o que leva à lise e morte celular (SAMBANTHAMOORTHY et al., 2014).

2.3. Limoneno e Óleo resina de aipo

Óleos essenciais são compostos complexos, voláteis e hidrofóbicos formados por plantas como parte de seu metabolismo secundário (ASBAHANI et al., 2015; SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016).

D-limoneno (Figura 5) é o maior constituinte de diversos óleos essenciais, especialmente os de citros, como limão, lima, laranja, toranja, tangerina, entre outros (GÜLAY KIRBAŞLAR et al., 2009; OKUNOWO et al., 2013; SUN, 2007). Através do uso da técnica de espectrometria de massa e cromatografia gasosa, Gomes et al. (2014) mostraram que o limoneno é o composto majoritário nos óleos de lima (52,1%), limão (52,6%) e laranja (76%) além de compor 75% do óleo essencial de toranja (OKUNOWO et al., 2013).

Figura 5: Estrutura química do R-limoneno.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2022)

Gülay Kerbaslar et al. (2009), demonstraram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de toranja, laranja e limão, entre outros, contra a linhagem de *B. cereus* ATCC 7064, sendo que todos os óleos testados apresentaram zona de inibição entre 10 mm a 15 mm.

Os autores também reportaram atividade dos óleos frente a linhagens de *E. coli, S. aureus, L. monocytogenes, P. aeruginosa,* entre outras (GÜLAY KIRBAŞLAR et al., 2009). Okunowo et al. (2013) também demonstraram que, quando solubilizado em metanol, o óleo essencial de toranja apresentou atividade contra *B. cereus* maior que a do antibiótico ciprofloxacina.

Corthouts e Michiels (2016) testaram a atividade antimicrobiana de 67 óleos essenciais frente a células vegetativas e endósporos de *B. cereus.* Entre eles, lima, limão e algumas espécies de laranja apresentaram resultados satisfatórios, sendo o óleo essencial de canela o mais eficiente entre todos os testados.

Como D-limoneno é o maior constituinte dos óleos em questão, especula-se que ele é também o principal responsável pela atividade antimicrobiana e antifúngica reportada (GOMES et al., 2014; OKUNOWO et al., 2013).

A atividade antimicrobiana dos hidrocarbonetos cíclicos, tais como o limoneno, é atribuída às interações hidrofóbicas com a membrana celular, afetando seu funcionamento e de suas proteínas (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). O acúmulo desses compostos na membrana, que é proporcional à sua disponibilidade no meio aquoso; faz com que ela se torne túrgida ao mesmo tempo em que a atividade da proteína citocromo oxidase C diminui e a permeabilidade a íons aumenta (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994).

Óleo resinas (OR), por sua vez, são misturas viscosas de óleos essenciais e resinas que são extraídas de vegetais através do uso de solventes orgânicos (ARSHAD et al., 2018; SOWBHAGYA, 2014). OR podem ser encontradas em sua forma líquida pela adição de solventes como propilenoglicol, o que facilita seu uso em produtos alimentícios (SOWBHAGYA, 2014). Uma das vantagens das OR é seu baixo conteúdo de água, que evita degradação oxidativa, perda de sabor e contaminação microbiana, o que contribui para maior vida de prateleira (KING, 2006).

O aipo (*Apium graveolens*) tem sido utilizado há muitos anos pela medicina tradicional, principalmente para o tratamento de infecções urinárias e problemas renais. No entanto, existem relatos também do uso de aipo como diurético, hepatoprotetor, afrodisíaco, laxativo, para dor no corpo, alívio da insônia, anti-hipertensivo, para controle do colesterol e até anticâncer (ABURJAI et al., 2009; AL-ASMARI; ATHAR; KADASAH, 2017; FAZAL; SINGLA, 2012; SINGH; HANDA, 1995). O óleo essencial de aipo também apresentou atividade contra fungos e leveduras (HASSANEN; EISSA; HAFEZ, 2015).

Estudos anteriores demonstraram o potencial da óleo resina e do óleo essencial de aipo frente a patógenos alimentares, incluindo o *B. cereus* (FAZAL; SINGLA, 2012; HASSANEN; EISSA; HAFEZ, 2015; MAYER, 2017), no entanto, seu efeito sobre os endósporos dessa bactéria nunca foi avaliado.

Em estudo recente, Prakoso et al. (2020) mostraram que o extrato de aipo foi capaz de inibir em mais de 50% o crescimento de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Os autores também relataram que o extrato foi capaz de ajudar na cicatrização de ferimentos na pele contaminados com a bactéria. Alguns estudos na literatura apontam para a ação de componentes isolados do extrato de sementes de aipo contra a bactéria *Helicobacter pylori* (ZHOU et al., 2009). Tanto a MRSA quanto a *H. pylori* são duas bactérias com histórico de difícil eliminação no ambiente hospitalar, o que ilustra o potencial dos produtos derivados do aipo como agentes antimicrobianos.

O D-limoneno foi relatado por diversos autores como o maior constituinte do óleo essencial de aipo (FAZAL; SINGLA, 2012; HASSANEN; EISSA; HAFEZ, 2015; MAYER, 2017), o que sugere que este é um dos principais responsáveis pelo efeito antimicrobiano observado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de Ramnolipídeo, Óleo resina de Aipo e Limoneno frente a células vegetativas e endósporos de *Bacillus cereus*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentrações bactericida mínima (CBM) de Ramnolipídeo, Óleo resina de Aipo e Limoneno, isoladamente e em combinação, frente a células vegetativas de *B. cereus*.

- Avaliação do efeito dos antimicrobianos isolados e em combinação frente a endósporos de *B. cereus* através de testes de CIM e CBM e sua capacidade de inibir a germinação.

- Estudo do possível efeito do tratamento antimicrobiano com RL nos endósporos de *B. cereus* através do uso de técnicas de microscopia eletrônica.

- Avaliação do potencial antimicrobiano do RL para controle de *B. cereus* em modelo alimentar (leite desnatado reconstituído).

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas 14 linhagens de *B. cereus* obtidas de coleções de culturas diferentes, ATCC e CCGB/FIOCRUZ (Tabela 2).

Tabela 2: Linhagens utilizadas nesse estudo e suas respectivas origens.

Código	**Coleção**	**Isolamento**
10876	ATCC	Frasco de cultura contaminado
11778	ATCC	Não informado
33018	ATCC	Leite em pó infantil
33019	ATCC	Leite em pó infantil
0426	CCGB/FIOCRUZ	Empadão de frango
0477	CCGB/FIOCRUZ	Leite
0524	CCGB/FIOCRUZ	Carne crua
0534	CCGB/FIOCRUZ	Leite em pó desnatado
0547	CCGB/FIOCRUZ	Mistura para polenta
1217	CCGB/FIOCRUZ	Noz moscada em pó
1223	CCGB/FIOCRUZ	Orégano
1224	CCGB/FIOCRUZ	Farinha de mandioca crua
1517	CCGB/FIOCRUZ	Café
1734	CCGB/FIOCRUZ	Leite em pó modificado

Fonte: Autoria própria.

4.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nesse estudo foram caldo e agar triptona de soja (Accumedia®) suplementado com 6 g/l de extrato de levedura (TSEYB e TSEYA). Os valores de pH foram ajustados para 7,3 de acordo com orientação do fabricante.

Para a formação de endósporos de *B. cereus*, foi utilizado Agar nutriente (Accumedia®, AN) suplementado para favorecer a esporulação (suplementado com 0,06 g/l de $MgSO_4$ e 0,35 g/l KH_2PO_4) (ALI et al., 2017). O pH foi ajustado para 6,8 de acordo com orientação do fabricante.

4.3. Ramnolipídeo

Para esse trabalho foi utilizado o Ramnolipídeo Comercial (AGAE Technologies) com 90% de pureza.

4.4. Limoneno

A amostra de Limoneno (Cutrale, 97% de pureza) utilizada para este trabalho foi gentilmente cedida pelo professor Dr. André Luiz Meleiro Porto.

4.5. Óleo resina de Aipo

A Óleo resina (8%) extraída de sementes de Aipo (*Apium graveolens*) utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida por Beraca Sabará S.A (Brasil).

4.6. Preparo e padronização do inóculo bacteriano

Culturas de *B. cereus* estocadas em freezer a -20 °C foram transferidas para TSEYA e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período um novo repique foi realizado em meio líquido TSEYB e as células foram novamente incubadas a 37 °C por 24 h. No dia seguinte, foi realizado um novo repique em meio líquido e incubado por mais 3 h a 37 °C. Após, a suspensão foi ajustada para DO 0,5 (610 nm), que corresponde a cerca de 3 x 10^7 UFC/ml.

4.7. Preparo das soluções estoque

Todos os antimicrobianos e suas combinações foram diluídos em meio de cultura TSYEB. O RL foi diluído na concentração de 50 mg/ml e posteriormente esterilizado em filtro 0,22 µm. As soluções contendo somente OR ou LN foram preparadas na concentração de 80 mg/ml de óleo, com adição de propilenoglicol na proporção de 1:1 (v/v) + 0,5% de tween 80, e esterilizadas em filtro 0,45 µm. Já no caso das misturas, as soluções estoque foram preparadas com OR ou LN na concentração de 80 mg/ml, propilenoglicol (1:1) e 5 mg/mL de RL, seguidas de esterilização em filtro 0,45 µm. Para todas as soluções preparadas, o volume final foi completado com meio TSYEB antes da filtração.

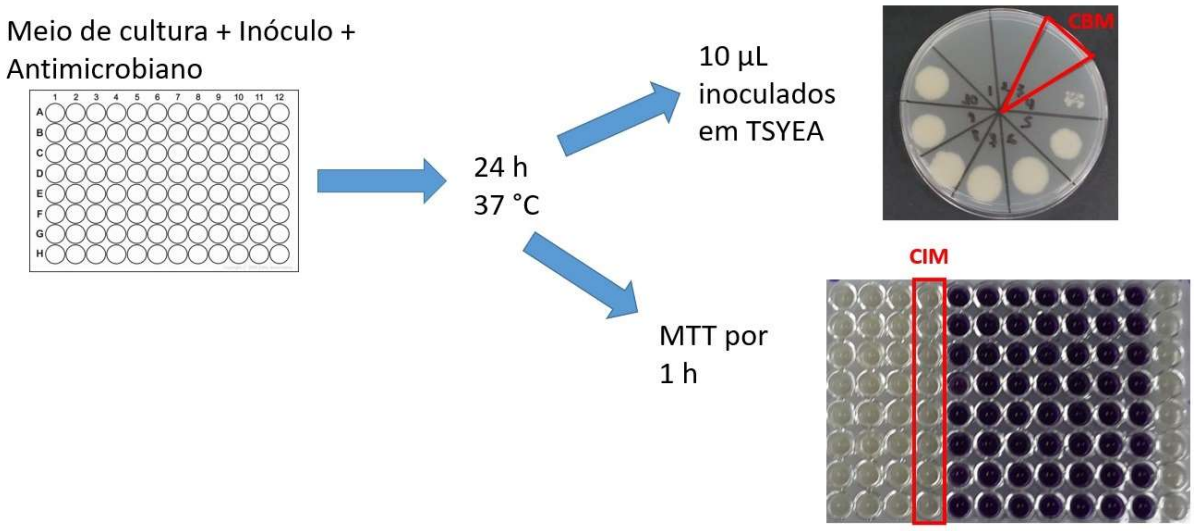
4.8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os testes de CIM e CBM realizados nesse estudo seguiram a metodologia descrita na Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Para montagem do teste, foram adicionados 100 µl do meio de cultura TSYEB em cada poço da microplaca de 96 orifícios. Foram então adicionados 100 µl da solução do antimicrobiano a ser testado na primeira coluna e realizada uma diluição seriada passando 100 µl para a coluna seguinte até a coluna de número 10. Por fim, 20 µl de inóculo padronizado foram adicionados nas colunas de 1 a 11. A coluna 11, contendo somente meio e células, foi considerada o controle positivo, enquanto a coluna 12 foi considerada o controle negativo, contendo somente meio de cultura ou meio de cultura e antimicrobiano.

A placa foi incubada por 24 h a 37 °C, sem agitação. Amostras de 10 µl dos poços da placa onde foi possível observar inibição visual do crescimento foram transferidas para placas de TSYEA e incubadas a 37°C por 24 e 48 h para determinar o CBM. Na sequência, foram adicionados 20 µl de solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio) na concentração de 1 mg/ml (em água destilada) na placa de 96 poços e a mesma foi incubada por 1 h a 37 °C (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012). O CIM foi determinado como a menor concentração onde não houve mudança de cor (de amarelo para roxo) no meio contendo MTT, ou seja, a droga em questão foi capaz de inibir o crescimento celular. Enquanto o CBM foi considerado a menor concentração da droga capaz de impedir o crescimento bacteriano nas placas (Figura 6).

Para os testes realizados com células vegetativas, o inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.6. Já para os testes realizados com endósporos, a preparação das células foi realizada conforme descrito a seguir no item 4.10.

Figura 6: Representação esquemática do protocolo para determinação de CIM e CBM.



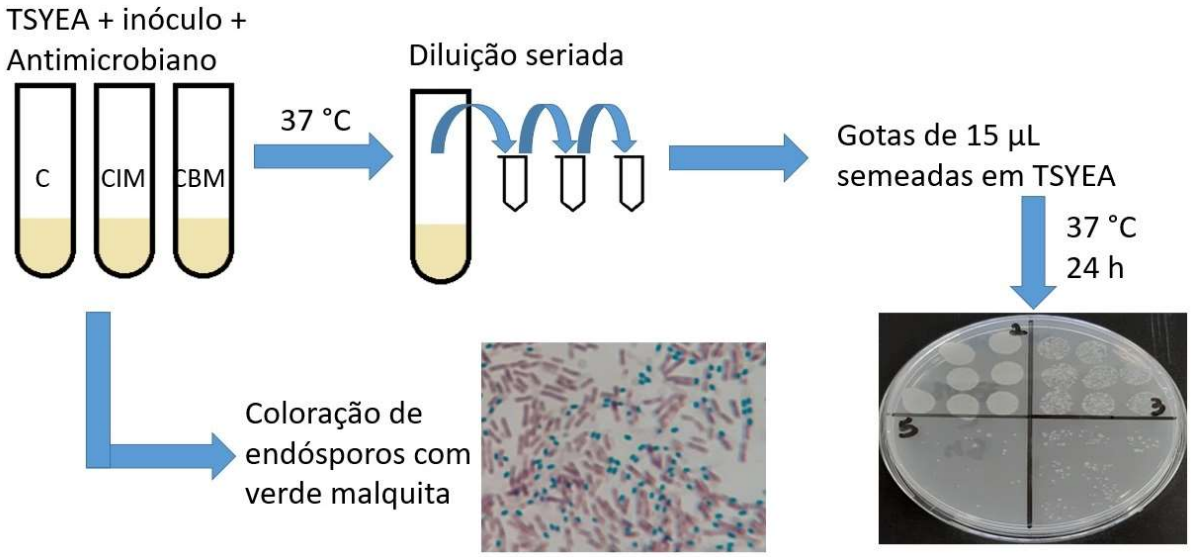
Fonte: Autoria própria.

4.9. Curva de sobrevivência (*time-kill*)

Após padronização do inóculo conforme descrito no item 4.6., uma alíquota de 1 ml foi adicionada em 5 ml de meio de cultura contendo diferentes concentrações de antimicrobiano. Os tratamentos foram então incubados a 37 °C sem agitação. Nos intervalos de tempo selecionados (0, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas) uma alíquota de 0,1 mL de cada tratamento foi retirada e adicionada a 0,9 ml de solução salina (NaCl 0,86%) para realização de uma diluição seriada (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012). Com o objetivo de contar as células viáveis presentes nos tratamentos em determinado tempo, gotas de 15 µl de cada diluição foram semeadas em meio sólido TSYEA e incubadas a 37 °C por 24 h seguida da contagem de colônias e cálculo de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) (Figura 7) (MILES; MISRA; IRWIN, 1938).

Quando pertinente, amostras de solução foram retiradas em tempos pré-determinados para a realização de coloração de endósporos com verde malaquita conforme descrito no item 4.11.

Figura 7: Representação esquemática do protocolo para montagem da curva de sobrevivência.



Fonte: Autoria própria.

4.10. Inibição da germinação de endósporos de *B. cereus*

O protocolo para a realização desse ensaio foi modificado de Ali et al. (2017).

Culturas estoque de *B. cereus* mantidas à -20 °C foram transferidas para TSYEA e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período de incubação, um novo repique foi realizado em Agar nutriente suplementado para favorecer a esporulação (suplementado com 0,06 g/l de $MgSO_4$ e 0,35 g/l KH_2PO_4) e as células foram então incubadas a 37 °C por 10 dias. Uma amostra de células foi retirada da placa para confirmar a esporulação pelo uso do corante verde malaquita conforme descrito no item 4.11.

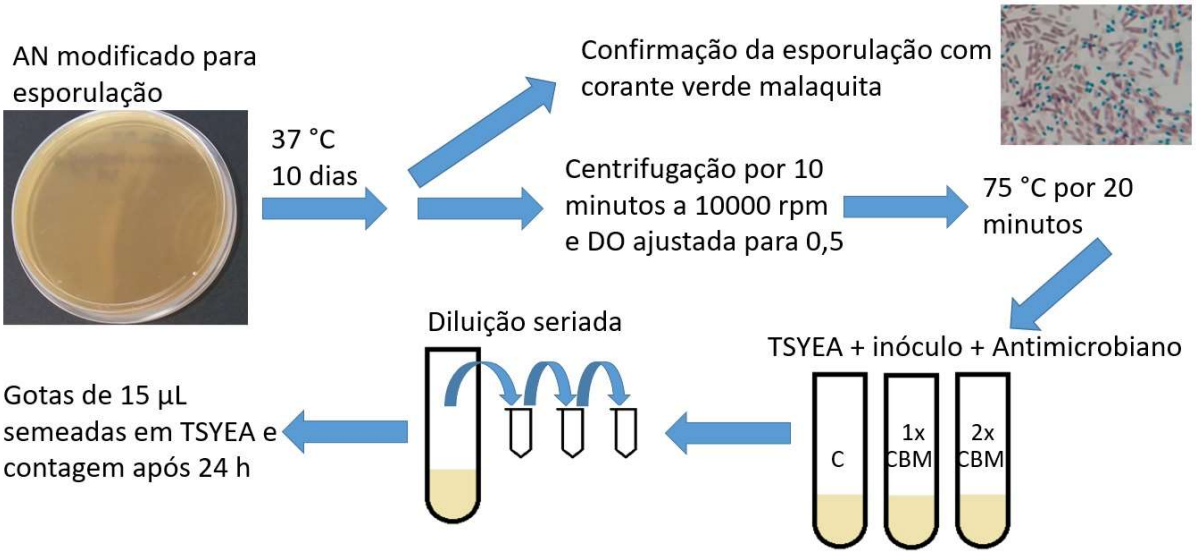
A seguir, foi retirada uma alíquota de células da placa que foi transferida para 5 ml água destilada. De forma similar ao procedimento realizado para padronização do inóculo, a solução foi diluída em água esterilizada até a obtenção de uma suspensão com Densidade Ótica (DO) de 0,5 em 610 nm. A suspensão foi então aquecida por 20 minutos a 75 °C com o

objetivo de eliminar possíveis células vegetativas presentes, dessa forma restando apenas os endósporos para a realização do experimento.

Para a montagem do ensaio, uma alíquota de 1 ml de suspensão de endósporos foi adicionada em 5 ml de meio de cultura contendo diferentes concentrações de antimicrobiano. Os tratamentos foram então incubados a 37 °C sem agitação (Figura 8).

Nos intervalos de tempo selecionados (0, 2, 6, 10 e 24 horas) uma alíquota de 0,1 ml de cada tratamento foi retirada e adicionada a 0,9 ml de solução salina (NaCl 0,86%). Foi então realizada uma diluição seriada (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012) e contagem de células viáveis pelo método da gota em meio TSYEA (MILES; MISRA; IRWIN, 1938). As células não tratadas no tempo 0 h foram utilizadas como controle para este experimento.

Figura 8: Representação esquemática do protocolo para montagem do experimento de inibição da germinação de endósporos.



Fonte: Autoria própria.

Os cálculos para porcentagem de inibição da germinação de endósporos e redução log, foram realizados com o auxílio das seguintes equações (ALI et al., 2017):

$$\text{\% inibição da germinação de endósporos} = \frac{(UFCcontrole - UFCtratamento)}{UFCcontrole} \times 100, \quad (1)$$

$$\text{Redução log} = \log_{10}\left(\frac{UFCcontrole}{UFCtratamento}\right) \quad (2)$$

4.11. Coloração de endósporos com verde malaquita

O procedimento de coloração de endósporos utilizando verde malaquita, também conhecida como Wirtz-Conklin, descrito a seguir foi modificado de SCHAEFFER; MACDONALD[3], 1933 *apud* HAMOUDA; SHIH; BAKER, 2002). Após padronização do inóculo conforme descrito no item 4.6., uma alíquota de 1 ml de inóculo foi adicionada em 5 ml de meio de cultura TSYEB contendo diferentes concentrações de antimicrobiano. Após crescimento em período de tempo pré-determinado, 2 ml de cada amostra foram transferidos para um tubo e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 ml de água destilada repetindo-se a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi então ressuspendido em cerca de 50 µl de água destilada. A suspensão celular obtida foi transferida para uma lâmina de vidro e fixada por calor com o auxílio de uma lamparina. Soluções de verde malaquita (5% em água destilada) e de safranina (2,5% em etanol 95%) diluída 1:10 em água destilada foram preparadas.

Após fixação, o esfregaço de células foi coberto pela solução de verde malaquita e incubado em temperatura ambiente por 45 minutos para que o corante penetre nas células. Na sequência, a lâmina foi lavada com água destilada e então contra-corada com a solução de safranina por 30 segundos. Após lavagem para retirada do excesso de corante, a lâmina foi seca e observada no microscópio com auxílio da objetiva de imersão (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

As células na forma de endósporos apresentarão coloração verde, enquanto o restante das células, que estarão na sua forma vegetativa, apresentará coloração rosa (SCHAEFFER; MACDONALD[3], 1933 *apud* HAMOUDA; SHIH; BAKER, 2002).

---

[3] Schaeffer, A. B. and MacDonald, F. (1933). A simplified method of staining endospores. **Science**, 77, 194.

4.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de endósporos de *B. cereus*

Para preparo das amostras para análise microscópica foi utilizada a metodologia estabelecida por Murtey e Ramasamy (2016) e modificada por Vieira (2018).

Esporos da linhagem de *B. cereus* 0426 foram preparados conforme descrito no item 4.10., inoculados em meio de cultura com ou sem a presença de Ramnolipídeo e incubadas a 37 °C por um período determinado de tempo (0, 2 e 24 h). Após a incubação, as amostras foram transferidas para tubos eppendorff centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi então lavado duas vezes utilizando solução salina (NaCl 0,86%). A DO foi avaliada para garantir a presença de quantidade satisfatória de células na suspensão. Alíquotas de 20 µl de cada suspensão foram depositados em lâminas de vidro redondas com 13 mm de diâmetro previamente recobertas com poli-lisina (poly-lysinehydrobromide type III, Sigma) e secas em temperatura ambiente sob fluxo laminar. O recobrimento com poli-lisina foi realizado depositando-se 10 µl de solução 50 mg/l nas lâminas de vidro, submetidas a secagem sob fluxo laminar.

As lâminas contendo as células aderidas foram então submersas em solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 e fixadas por 1 h e 30 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato de sódio pH 7,2 e seguiu-se para a etapa de desidratação. Para realizar a desidratação das amostras, as lâminas contendo as células fixadas foram imersas em soluções de etanol com gradiente crescente de concentração (35, 50, 75, 95 e 2x 100%) por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submersas em hexametildisilazano (HMDS, Sigma) até receberem o recobrimento com ouro. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 440 (Zeiss) operando a 15 kV na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos.

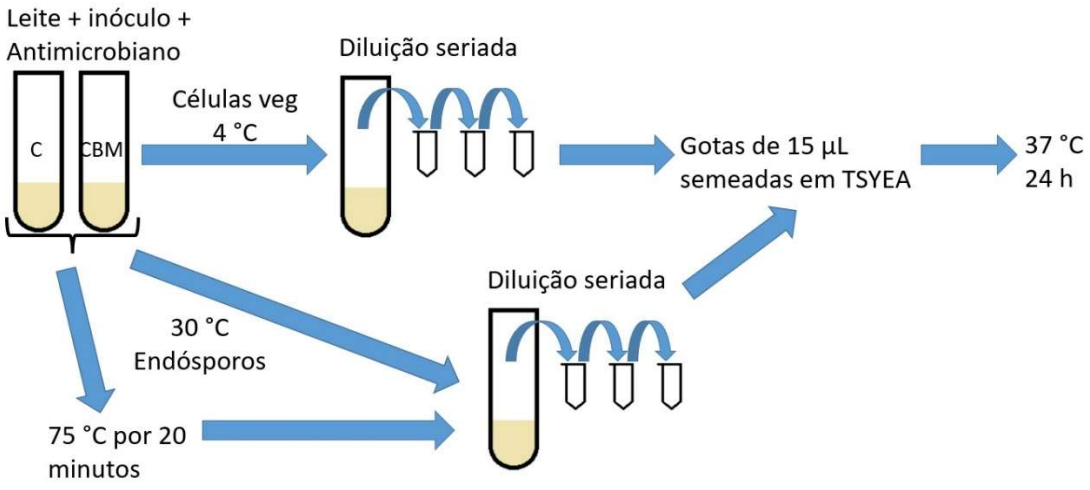
4.13. Avaliação do crescimento de células vegetativas e esporos da linhagem *B. cereus* 0426 em modelo alimentar (leite desnatado reconstituído)

Com o objetivo de estudar a ação antimicrobiana do RL em modelo alimentar foi utilizado o leite em pó desnatado preparado na concentração de 10% em água destilada com pH ajustado para 6,5. O leite foi esterilizado em autoclave à 121 °C por 10 minutos no dia anterior ao uso.

Utilizando o leite como meio de cultura para o crescimento do *B. cereus*, foram realizados testes de CBM conforme descrito no item 4.8. mas sem adição do MTT. Para esses testes foram utilizadas tanto células vegetativas quanto endósporos e ambos foram incubados na temperatura de 30 °C. O preparo das células vegetativas foi realizado conforme descrito no item 4.5. e, na sequência, foram realizadas duas diluições seriadas 1:10 com o objetivo de obter inóculo inicial de 10^4 UFC/ml. Já o preparo dos esporos de *B. cereus* e seu tratamento térmico foram realizados conforme descrito no item 4.10. seguidos de duas diluições seriadas 1:10 para obter inóculo inicial de 10^4 UFC/ml.; a confirmação da presença de esporos foi realizada a partir da coloração de verde malaquita e safranina, conforme descrito no item 4.11. Após encontrados os valores de CBM, foram realizadas curvas de crescimento a 30 °C e a 4 °C para determinar se o RL era capaz de inibir o crescimento ou eliminar completamente a bactéria. A metodologia para essas curvas de crescimento foi modificada de Sun et al. (2021).

As amostras foram montadas na proporção de 5 partes de leite contendo a droga para 1 parte de inóculo e separadas em tubos de ensaio contendo 1,5 ml de solução cada. Quando a inoculação foi realizada com células vegetativas, as células foram incubadas em geladeira a 4 °C e foi retirada uma amostra nos seguintes tempos: 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Uma alíquota de 100 µl de amostra foi retirada para realizar diluições seriadas 1:10 com solução salina e, na sequência, plaqueadas em TSYEA. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 h para crescimento e contagem celular (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática do protocolo para avaliação do crescimento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* em modelo alimentar.



Fonte: Autoria própria.

Quando a inoculação foi realizada com endósporos, as células foram incubadas a temperatura de 30 °C e foi retirada uma amostra nos seguintes tempos: 4, 8, 24, 48 e 72 horas. Uma alíquota de 100 µl de amostra foi retirada para realizar diluições seriadas com solução salina e, na sequência, plaqueadas em TSYEA para contagem de células totais (esporos + células vegetativas). O restante da amostra foi aquecido por 20 minutos a 75 °C para eliminar as células vegetativas e assim realizar a contagem somente dos esporos. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 h para crescimento e contagem celular (Figura 9) (SUN et al, 2021).

4.14. Análise estatística

Os valores de CIM e CBM foram expressos como a moda de, no mínimo, três repetições independentes. Os demais dados foram expressos como a média ± desvio padrão de três repetições independentes. A análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey foram realizados com o auxílio do software OriginPro, versão 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As linhagens de *B. cereus* foram tratadas com RL com o objetivo de determinar as concentrações mínimas necessárias para inibir o crescimento ou eliminar o microrganismo após 24 horas de exposição (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de RL frente à *B. cereus*.

Linhagem	CIM (mg/ml)	CBM 24h (mg/ml)
10876	0,098	6,25
11778	0,78	>25
33018	0,098	1,56
33019	0,098	0,098
0426	0,098	0,098
0477	0,098	0,098
0524	0,098	>25
0534	0,098	0,098
0547	0,098	0,098
1217	0,098	6,25
1223	0,098	6,25
1224	0,098	25
1517	0,098	0,098
1734	0,098	12,5

As placas de petri foram incubadas por mais 24 h para confirmar os valores de CBM

Fonte: Autoria própria.

Como é possível observar na tabela 3, o valor de CIM do RL para a maioria das linhagens testadas foi 0,098 mg/ml. Já para o CBM, há maior variação de valores para as células vegetativas. No caso das linhagens 11778 e 0524, o valor de CBM é maior que os valores utilizados no teste realizado, dessa forma, pode-se afirmar que o efeito do RL sobre essas linhagens é bacteriostático nesse intervalo de concentrações. Nota-se também que, mesmo quando comparamos linhagens isoladas do mesmo tipo de alimento, caso das

linhagens 33018, 33019, 0534 e 1734, que foram isoladas de leite em pó, a diferença no CBM também é evidenciada com valores que variam de 0,098 até 12,5 mg/ml.

Dentre as informações fornecidas pela CCGB/FIOCRUZ (VIVONI[4], 2017) para as linhagens doadas, algumas contam com o perfil de resistência a antibióticos e presença de genes ligados à virulência de *B. cereus.* (Tabela 4).

Tabela 4. Dados de resistência à antibióticos e genes de virulência de algumas linhagens de *B. cereus.*

Linhagem	Antibióticos				Genes							
	V	C	G	T	*cytK*	*hblA*	*hblC*	*hblD*	*nheA*	*nheB*	*nheC*	*entFM*
0477[i]	S	I	S	R	P	P	P	P	P	P	P	P
0524[i]	R	I	S	R	A	A	A	A	P	P	P	P
0534[i]					P	P	P	P	P	P	P	P
0547[i]					P	P	P	P	P	P	P	P
1217[i]	S	I	S	R	P	P	P	P	P	P	P	P
1223[i]	S	I	S	I	P	A	A	A	P	P	A	P
1224[i]	S	I	S	R	A	P	P	P	P	P	P	P
1517[i]					P	P	P	P	P	P	P	P
1734[ii]					A	A	A	A	P	P	P	P

V: vancomicina; C: clindamicina; G: gentamicina; T: tetraciclina; S: sensível; I: resistência intermediária; R: resistente; P: presente; A: ausente.

i: Informações cedidas pela FIOCRUZ (VIVONI[4], 2017; VIVONI[5], 2021); ii: MASCARENHAS, 2018.

Fonte: Autoria própria.

É interessante notar que a linhagem que apresentou maior valor de CBM (linhagem 0524 com CBM > 25 mg/ml) também apresentou resistência ao antibiótico vancomicina, enquanto as outras linhagens se mostraram sensíveis a este mesmo antibiótico (VIVONI[4], 2017). A Vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos efetivo especialmente contra bactérias Gram-positivas que atua inibindo a síntese dos peptideoglicanos, que formam a parede celular das bactérias (NAGARAJAN, 1991). A linhagem 0524, assim como algumas outras, também apresentou resistência ao antibiótico tetraciclina (VIVONI[4], 2017). A

[4] VIVONI, A. M. (comunicação pessoal, 24 de outubro de 2017).
[5] VIVONI, A. M. (comunicação pessoal, 21 de dezembro de 2021).

tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, usada tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que atua na inibição da síntese proteica (SHUTTER; AKHONDI, 2021).

Quanto aos genes de virulência, nota-se que as linhagens CCGB possuem praticamente todos os genes pesquisados, com exceção das linhagens 0524, 1223, 1224 e 1734. Das 4 linhagens, nas 3 com maiores valores de CBM (0524 com CBM >25 mg/ml; 1224 com CBM 25 mg/ml; 1734 com CBM 12,5 mg/ml) não foi detectada a presença do gene *cytK* (MASCARENHAS, 2018; VIVONI[6], 2021). O gene *cytK* codifica uma proteína de 34 kDa altamente citotóxica, com atividade hemolítica e capaz de causar enterite necrótica (LUND; DE BUYSER; GRANUM, 2000). Esse gene foi reportado como presente em cerca 60% das linhagens de *B. cereus* isoladas de temperos culinários (CUFAOGLU; AYAZ, 2022). Além disso, tem sido associado, juntamente com os genes *entFM, nheA, nheB* e *nheC* e *hblA*, C e D, a casos de intoxicação do tipo diarreica (FOGELE et al., 2018; GUINEBRETIÈRE; BROUSSOLLE; NGUYEN-THE, 2002). Essa alta prevalência dos genes produtores de toxinas em isolados de *B. cereus*, em especial *nheA, nheB* e *nheC*, também foram reportadas por outros grupos de pesquisa (GUINEBRETIÈRE; BROUSSOLLE; NGUYEN-THE, 2002; ROSSI et al., 2018). Os resultados permitem inferir que os RL possuem ação inibitória ampla sobre as células vegetativas de *B. cereus* mesmo virulentas e resistentes a antibióticos, embora o valor de CBM não tenha sido encontrado para algumas linhagens.

Para dar continuidade aos testes antimicrobianos, utilizando também o limoneno e óleo resina de aipo, foram escolhidas 2 linhagens principais: ATCC 33018 e CCGB 0426. Sendo uma já amplamente utilizada pelo grupo do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (ATCC 33018) e a outra proveniente da coleção da FIOCRUZ com CBM relativamente baixo para as células vegetativas (CCGB 0426). A Tabela 5 mostra os valores de CIM e CBM para as células vegetativas da linhagem 33018 tanto para o RL, LN e OR separadamente, quanto para as misturas óleos/RL.

Como já observado anteriormente, o RL foi capaz de inibir o crescimento celular da linhagem 33018 com concentrações de apenas 0,098 mg/ml e promoveu morte celular com 1,56 mg/ml. Já a OR, quando avaliada isoladamente, mostrou o maior valor de CIM entre os compostos testados. Para os dois óleos não foi possível determinar os valores de CBM nas concentrações testadas. Quando combinada com o RL, por sua vez, tanto a OR quanto o LN apresentaram redução nos valores de CIM além de CBM. A mistura contendo OR + RL foi

[6] VIVONI, A. M. (comunicação pessoal, 21 de dezembro de 2021).

capaz de inibir o crescimento celular com 2,5 + 0,156 mg/ml e eliminar a população com 20 + 1,25 mg/ml enquanto para a mistura LN + RL o CIM encontrado foi de 1,25 + 0,078 mg/ml e o CBM foi 20 + 1,25 mg/ml. Esses resultados sugerem que, quando combinados com RL, o efeito antimicrobiano da OR e do LN é melhorado.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana do RL, LN e OR nas células vegetativas de *B. cereus* 33018.

Composto	**CIM (mg/ml)**	**CBM 24h (mg/ml)**
RL	0,098	1,56
OR	40	>40
OR+RL	2,5 OR + 0,156 RL	20 OR + 1,25 RL
LN	2,5	>40
LN+RL	1,25 LN + 0,078 RL	20 LN + 1,25 RL

As placas de petri foram incubadas por mais 24 h para confirmar os valores de CBM encontrados

Fonte: Autoria própria.

Já para a linhagem 0426, tanto o CIM quanto o CBM apresentaram valor de 0,098 mg/ml (Tabela 6) frente ao RL, sendo mais sensível que a linhagem 33018. Assim como observado anteriormente, o OR apresentou o menor efeito antimicrobiano, no entanto, para o LN, a linhagem 0426 se mostrou mais sensível. Similarmente ao observado para a linhagem 33018, quando combinados com o BS, os dois óleos apresentaram uma redução nos valores necessários para promover a inibição e morte celular. A mistura contendo OR + RL foi capaz de inibir o crescimento celular com 10 + 0,63 mg/ml e eliminar as células com 20 + 1,25 mg/ml enquanto para a mistura LN + RL o CIM encontrado foi de 1,25 + 0,078 mg/ml e o CBM foi 20 + 1,25 mg/ml. Corroborando a hipótese de que a combinação dos compostos hidrofóbicos com o RL aumenta a atividade antimicrobiana.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana do RL frente a células vegetativas de *B. cereus* 0426.

Composto	**CIM (mg/ml)**	**CBM 24h (mg/ml)**
RL	0,098	0,098
OR	>40	>40
OR+RL	10 OR + 0,63 RL	20 OR + 1,25 RL
LN	1,25	>40
LN+RL	1,25 LN + 0,078 RL	20 LN + 1,25 RL

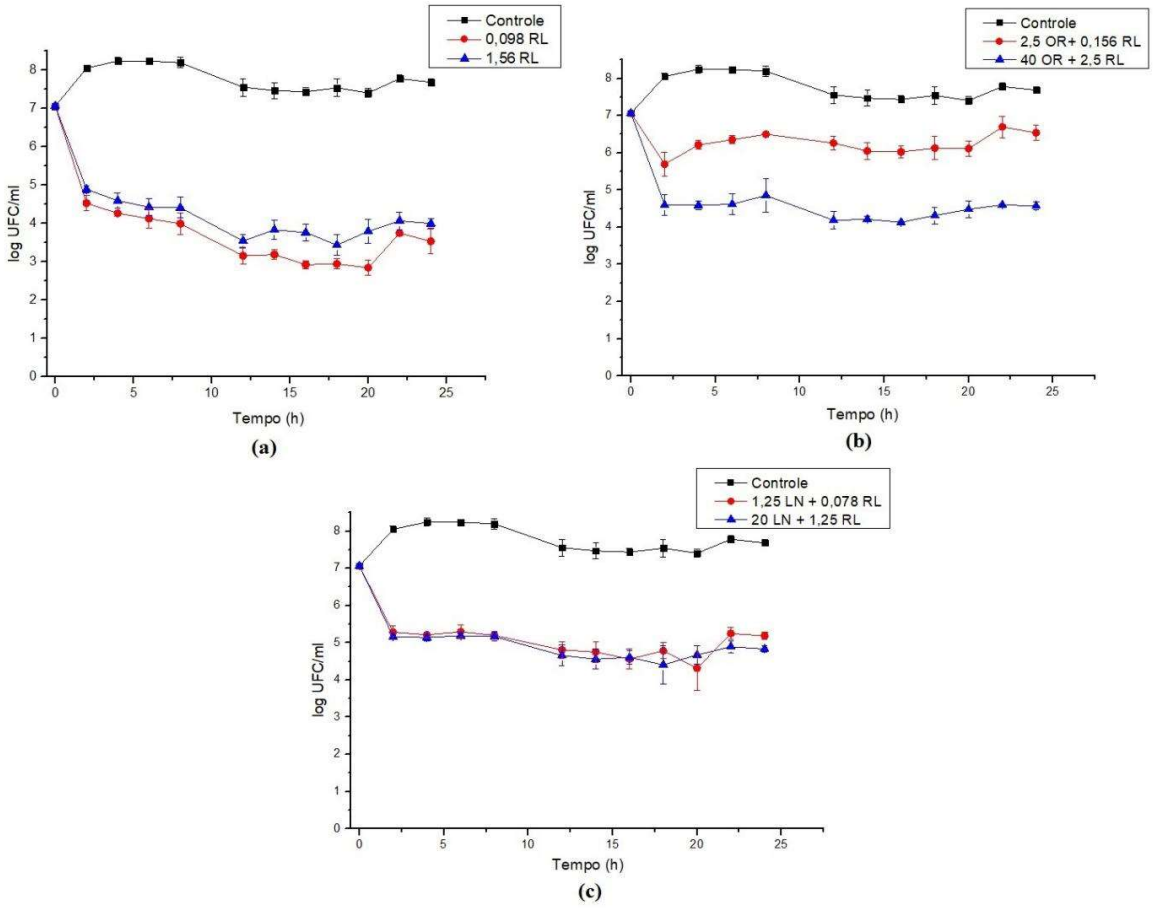
As placas de petri foram incubadas por mais 24 h para confirmar os valores de CBM encontrados

Fonte: Autoria própria.

5.2. Curva de sobrevivência (*time-kill*)

Novos experimentos foram conduzidos utilizando os valores determinados anteriormente nos ensaios de CIM e CBM, com o objetivo de avaliar o crescimento da bactéria na presença dos antimicrobianos em intervalos de tempo pré-definidos (Figura 10). Como não foram encontrados valores de CBM para as amostras de OR e LN isolados, as mesmas não foram consideradas nesse ensaio.

Figura 10. Curva de sobrevivência de *B. cereus* ATCC 33018 na presença de (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), CIM (vermelho) e 16x CIM (azul). As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.



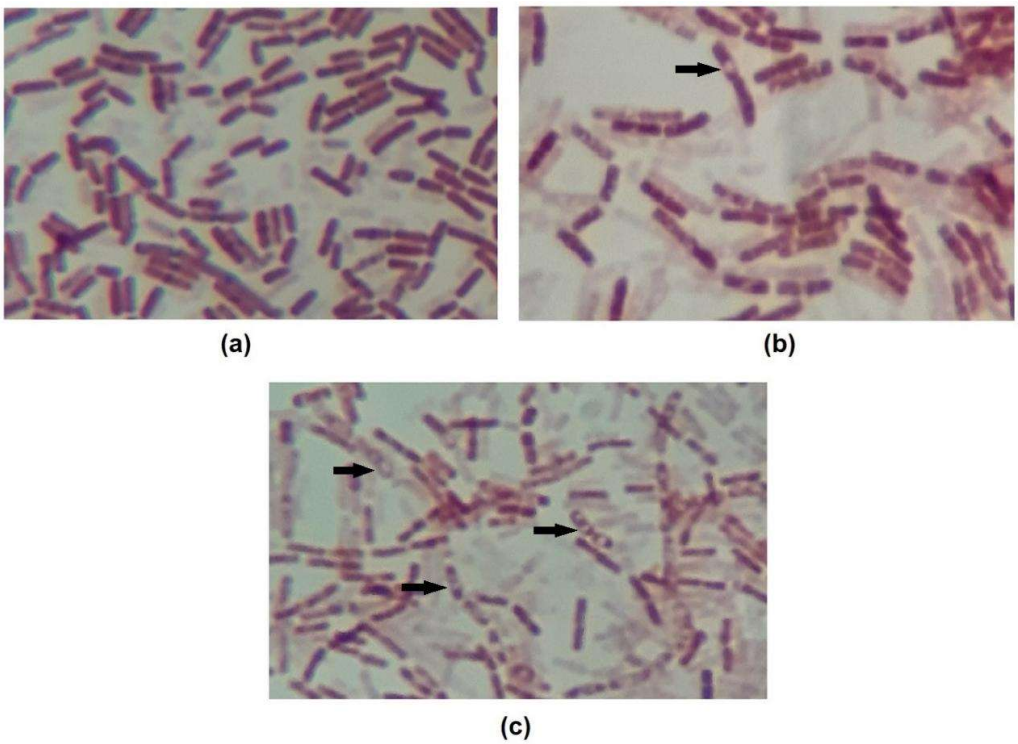
Fonte: Autoria própria.

O crescimento das células de *B. cereus* na presença de RL, OR + RL e LN + RL revelou que os valores inicialmente designados como CBM não foram capazes de eliminar a população celular (Figura 10), mesmo sendo 16 vezes maior que a concentração de CIM. O

tratamento com RL foi capaz de reduzir a contagem de células viáveis por volta de 4 log e a população se manteve nesse nível após 24 h (Figura 10a). A combinação de RL com LN e OR foi capaz de melhorar sua eficácia antimicrobiana, o que corrobora os dados apresentados na Tabela 5. No caso da mistura LN + RL, não há diferença aparente entre os valores de CIM e de 16x CIM (Figura 10c). Por outro lado, para OR + RL é possível perceber que ao aumentar a concentração da mistura ocorreu redução na sobrevivência celular (Figura 10b). Esse incremento na atividade antimicrobiana pode ser explicado pela maior concentração de compostos ativos presentes na OR, como terpenos e sesquiterpenos (MAYER, 2017).

Também é importante notar que todas as curvas apresentam uma queda de cerca de 2 log na contagem de células viáveis após somente 2 horas de exposição. Especula-se que este comportamento seja causado pela capacidade do *B. cereu*s em formar endósporos quando se encontra em circunstâncias adversas. Essa queda inicial sugere que algumas células foram eliminadas neste período de tempo enquanto as células restantes iniciaram o processo de esporulação. Com o objetivo de confirmar essa hipótese, procedeu-se a coloração com verde malaquita e a microscopia revelou a presença de endósporos (Figura 11).

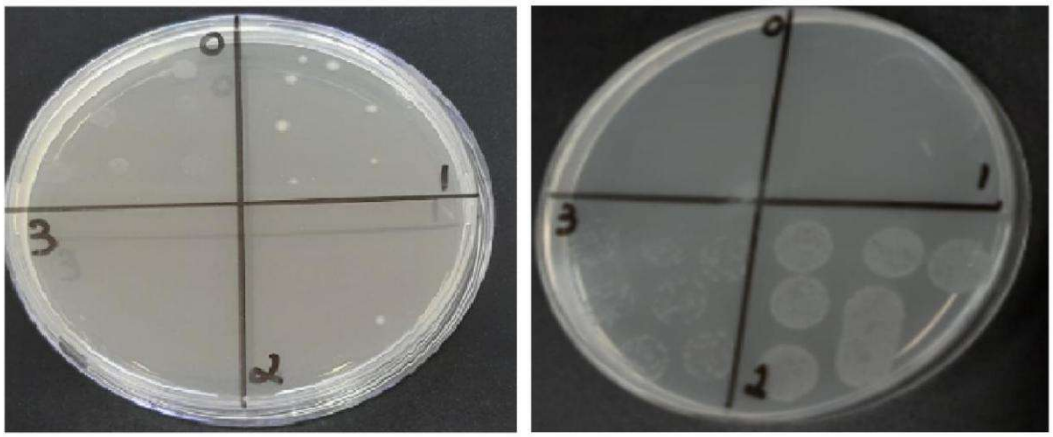
Figura 11: Coloração de endósporos de *B. cereus* 33018 para os tratamentos (a) controle, (b) OR + RL CIM 14 h e (c) OR + RL CIM 24 h. Os endósporos são visíveis nas imagens (b) e (c) como regiões sem coloração no interior das células (setas). Magnificação 1000x.



Fonte: Autoria própria.

A inconsistência com os valores de CBM descritos na Tabela 5 pode ser explicado pelo método de contagem utilizado. Foi observado que durante as diluições seriadas para a contagem de células viáveis, a primeira amostra sem diluição não apresentava crescimento após o período de incubação. No entanto, nas diluições subsequentes da amostra, o crescimento de diversas colônias foi observado (Figura 12). Este fato se deve a redução da concentração do antimicrobiano, dessa forma, na amostra sem diluição a concentração da droga foi capaz de evitar o crescimento enquanto, após algumas diluições, células remanescentes ou até mesmo endósporos podem crescer. Como o CBM foi observado após 24 e 48 h de incubação aplicando a amostra original no ágar sem diluição, a concentração do antimicrobiano no local foi suficiente para inibir tanto o crescimento quanto possivelmente a germinação dos endósporos.

Figura 12: Imagens das placas de Petri utilizadas para contagem de células viáveis nos experimentos de curva de sobrevivência. Na amostra sem diluição não foi observado crescimento após incubação, entretanto, após diluição da amostra, diversas colônias foram observadas. (a) LN + RL; (b) RL.



(a) (b)

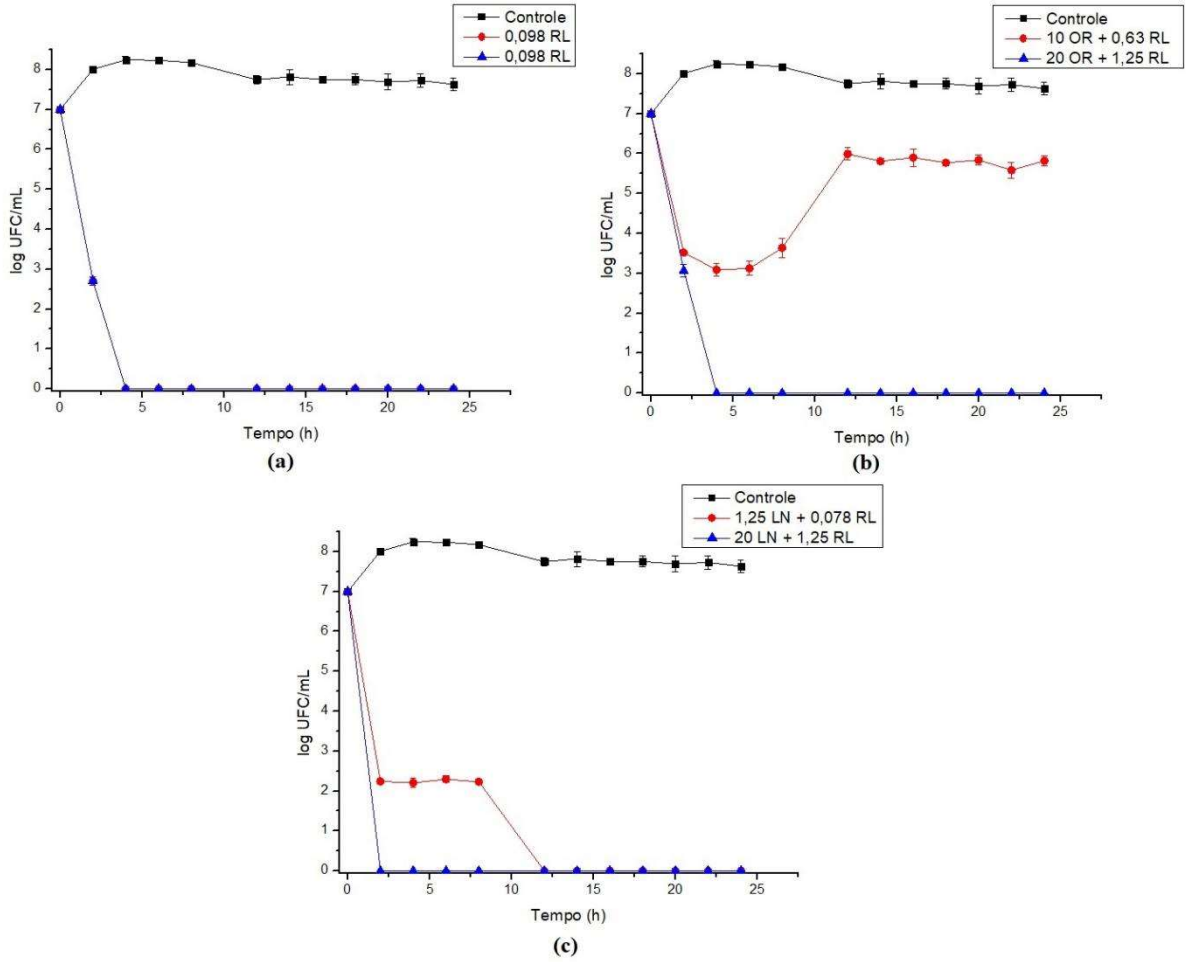
Fonte: Autoria própria.

Na sequência, foram avaliadas as curvas de sobrevivência da linhagem 0426 para o RL, OR + RL e LN + RL (Figura 13).

Ao contrário da linhagem 33018, para a linhagem 0426 foi possível observar que os valores encontrados para o CBM foram capazes de eliminar completamente as células bacterianas, sugerindo maior sensibilidade desta linhagem. Com RL na concentração de 0,098

mg/ml foi possível observar erradicação da população após 4 h de contato com o antimicrobiano (Figura 13a). Para as concentrações de CBM de OR + RL e LN + RL esse tempo foi, respectivamente de 4 h e 2 h (Figuras 13b e 13c). Para a curva CIM de OR + RL é interessante observar que houve inicialmente uma queda de aproximadamente 5 log, porém entre 8 h e 12 h as células tornaram a crescer. Já para o CIM de LN + RL, 2h após a inoculação ocorre uma queda de 6 log que se mantém até 8 h seguida da completa eliminação das células inoculadas. Sendo assim, foi possível concluir que a combinação de 1,25 mg/ml LN + 0,078 mg/ml RL tem efeito bactericida para a linhagem 0426.

Figura 13: Curva de sobrevivência de *B. cereus* CCGB 0426 na presença de (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), CIM (vermelho) e CBM (azul). As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.



Fonte: Autoria própria.

Outro fato que merece destaque é que, para ambas as linhagens, apesar do RL ter melhorado a ação da OR, esta por sua vez, aparenta ter interferido a ação do RL em inibir o

crescimento das células; uma vez que quando utilizado isoladamente, o CIM observado foi de 0,098 mg/ml e aumentou para 0,625 mg/ml (0426) e 0,156 mg/ml (33018) quando combinado com a OR. Já para o CBM da linhagem 0426, apesar do valor de RL ser maior quando combinado com a LN, o tempo necessário para completa eliminação das células diminuiu de 4 h para 2 h.

A atividade antimicrobiana contra *B. cereus* têm sido relatada na literatura para o RL (FERREIRA; VIEIRA; NITSCHKE, 2019; NDLOVU et al., 2017), limoneno (DE MARTINO et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2019) e óleo essencial de aipo (NDLOVU et al., 2017), no entanto, não foram encontrados relatos do uso de OR de aipo e/ou componentes do seu óleo essencial associado ao RL. Em trabalho anterior, foi demonstrado que o óleo essencial de aipo (100% v/v) apresentou zona de inibição de 33 mm contra células de *B. cereus* (HASSANEN; EISSA; HAFEZ, 2015). Em outro estudo, a concentração de 250 µg/ml de limoneno foi capaz de inibir o crescimento de *B. cereus*, mas não foi observado CBM (GUIMARÃES et al., 2019). Zonas de inibição de 6,3 - 6,7 mm com 420 µg de limoneno foram observadas para duas linhagens de *B. cereus* (DE MARTINO et al., 2009). O RL também foi utilizado para inibir linhagens de *B. cereu*s com CIM de 19,5 µg/mL (FERREIRA; VIEIRA; NITSCHKE, 2019) e zonas de inibição variando de 13 a 22 mm (NDLOVU et al., 2017). Estes exemplos, justamente com os dados apresentados anteriormente, apontam para o fato de que a atividade antimicrobiana observada pode ser influenciada pela sensibilidade/resistência da linhagem, metodologia utilizada, pureza dos compostos e suas formulações; dificultando a comparação de resultados.

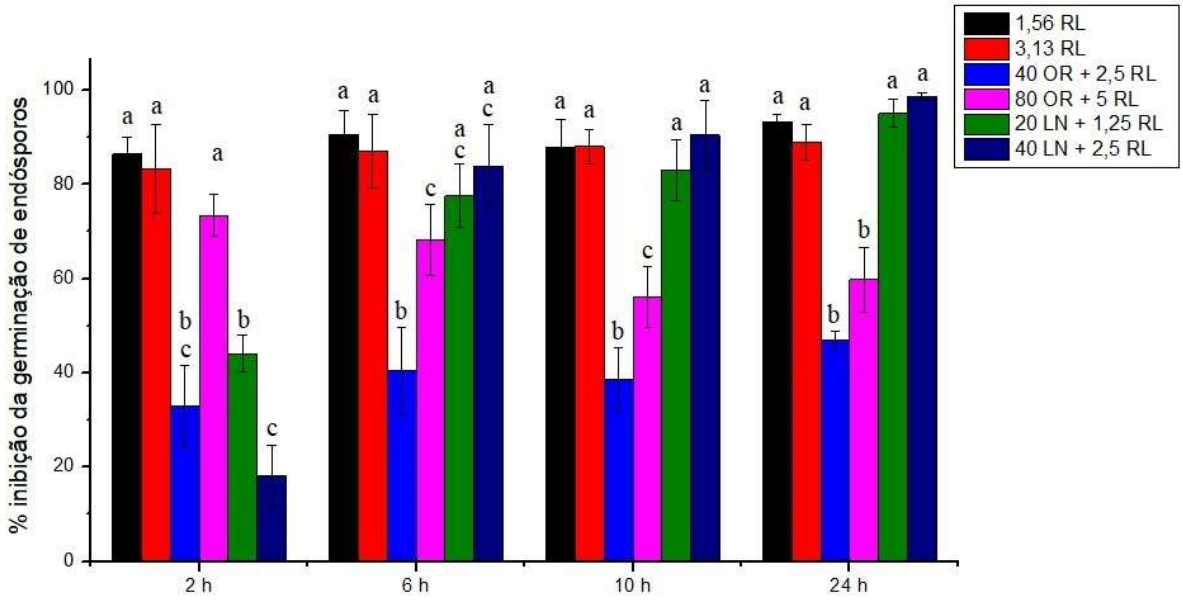
Considerando que o mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana de ambos, RL e LN, está relacionado com a perturbação na permeabilidade/integridade da membrana celular bacteriana (ESPINA et al., 2013; LI et al., 2019; ORTIZ et al., 2006; SOTIROVA et al., 2008), é possível inferir que a combinação do biossurfactante e os compostos hidrofóbicos ativos pode aumentar sua solubilidade, favorecendo assim sua interação com as células.

Conforme observado, a presença de RL e sua combinação com OR e LN pode inibir o crescimento das células vegetativas e também induzir a esporulação do *B. cereus* (Figura 11). Por outro lado, foi demonstrado que, em determinadas condições na presença dos antimicrobianos, a população celular se manteve relativamente constante (Figura 10), o que sugere que poderiam também inibir a germinação. Com o objetivo de testar esta hipótese, foram realizados ensaios para avaliar o potencial dos antimicrobianos na inibição de germinação de endósporos de *B. cereus*.

5.3. Inibição da germinação de endósporos

Os endósporos de *B. cereus* foram tratados tanto com RL quanto com suas respectivas misturas com OR e LN. A porcentagem de inibição da germinação e redução log do crescimento foram calculadas após diferentes tempos de exposição (Figura 14).

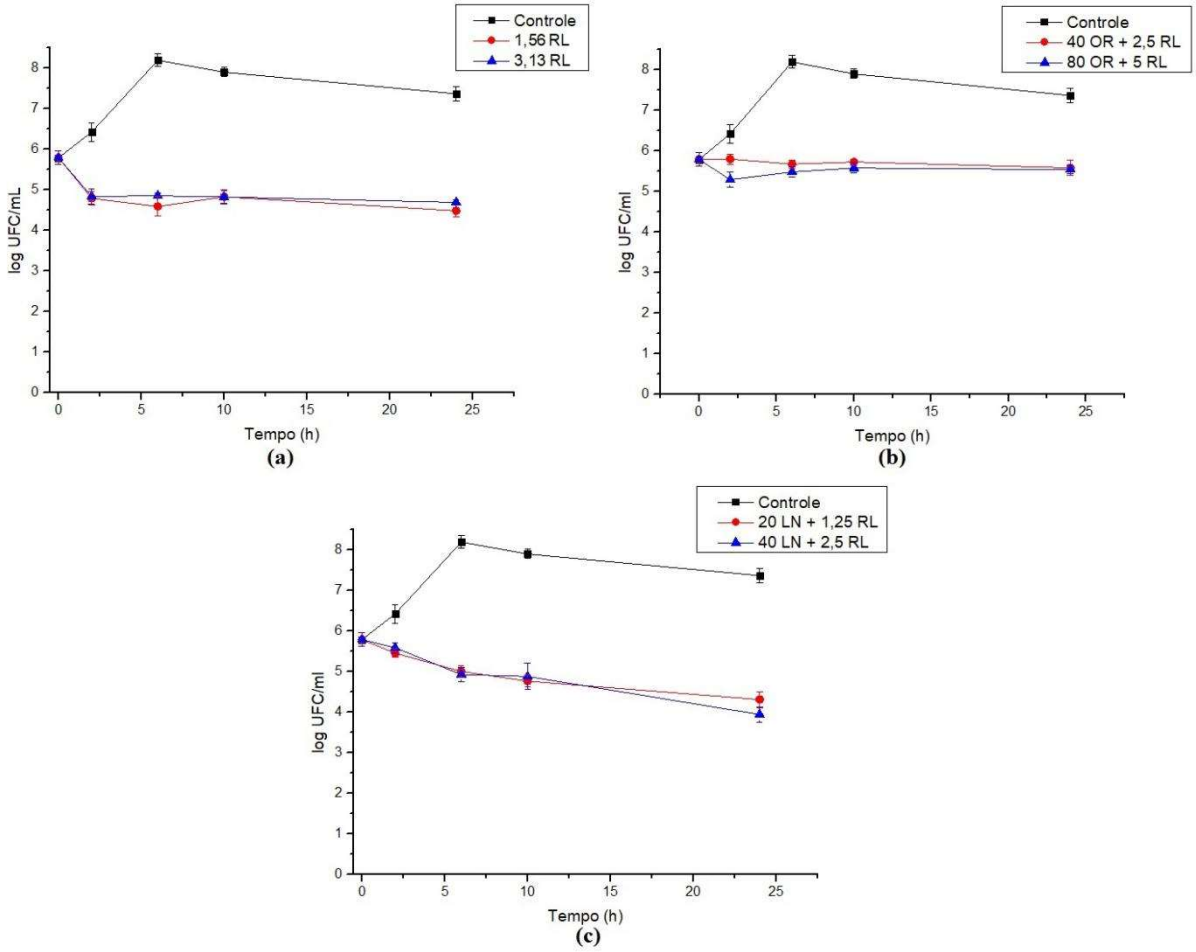
Figura 14: Porcentagem de inibição da germinação de endósporos de *B. cereus* 33018 para os tratamentos contendo RL, OR + RL e LN + RL. As concentrações utilizadas para este experimento foram 16x e 32x CIM. As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).



Fonte: Autoria própria.

Para a linhagem 33018, as amostras contendo somente RL mostraram uma redução em torno de 93% na germinação após 24 h. Adicionalmente, o aumento da concentração de RL e do tempo de exposição não aumentou significativamente o percentual de inibição (Figura 14). Também foi observado redução máxima de 3,6 log na germinação dos endósporos (Figura 15a). Quando o RL foi combinado com a OR, a maior porcentagem de inibição (73%) e o maior valor de redução log (2,8) foram obtidos na maior concentração testada. Conforme pode ser observado na Figura 10b, o aumento de concentração melhorou a atividade da mistura OR + RL, provavelmente devido ao aumento da concentração dos compostos ativos presentes na OR (MAYER, 2017).

Figura 15: Redução Log da germinação de endósporos de *B. cereus* 33018 após tratamento com (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), 16xCIM (vermelho) e 32x CIM (azul). As barras de erros representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.

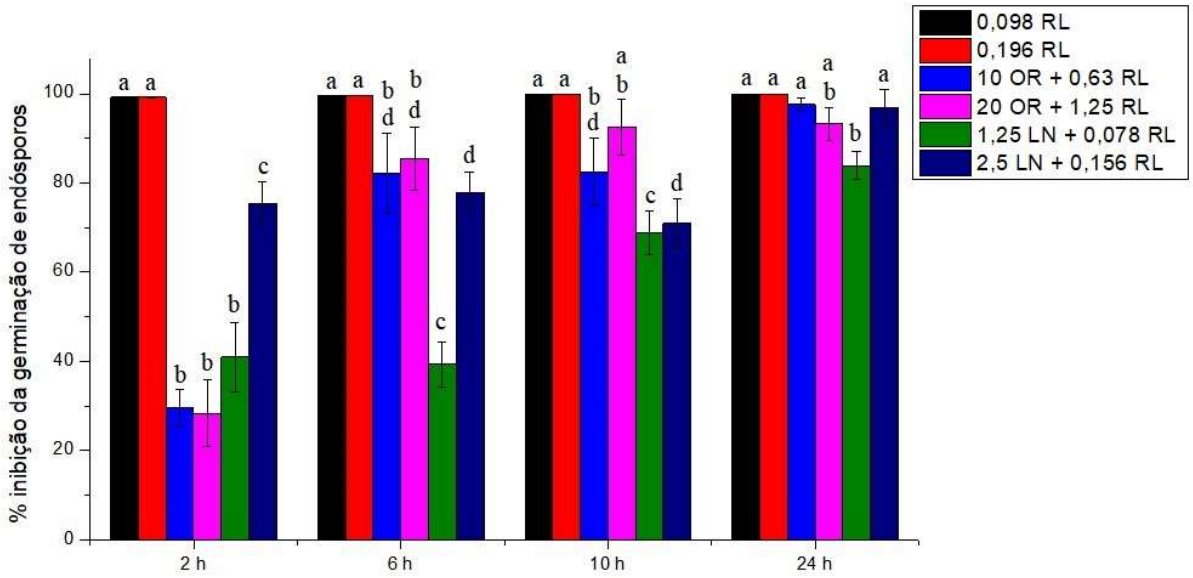


Fonte: Autoria própria.

Já a combinação LN + RL apresentou os maiores valores de inibição de germinação de endósporos após 24h de exposição, alcançando o máximo de 98% de inibição. Uma importante queda na contagem celular no decorrer do tempo também foi observada, atingindo redução de 3,3 log conforme observado na Figura 15c. Conforme previamente discutido, um dos maiores componentes da OR é o LN (em torno de 9.5%) (MAYER, 2017) que, assim, pode ser o responsável (pelo menos em parte) pelo efeito antimicrobiano observado para a OR. Esse fato pode explicar por que, quando em sua forma purificada, o LN apresenta maior potencial antimicrobiano quando comparado com as amostras de OR.

Para a linhagem 0426, as amostras contendo somente RL mostraram uma redução de mais de 99% na germinação de endósporos após 2 h de exposição, mesmo com concentrações menores do antimicrobiano. Como também foi observado para a linhagem anterior, o aumento da concentração de RL e do tempo de exposição à droga não aumentou significativamente a inibição da germinação de endósporos (Figura 16). O valor máximo de redução de 5,5 log no crescimento dos endósporos também foi observado após 24 h de exposição ao RL (Figura 17a). Para a combinação de RL + OR, a maior porcentagem de inibição observada foi de 97,5% e o maior valor de redução log (3) foram obtidos com o maior tempo de exposição (24 h) (Figura 17b). Foi possível notar também que o aumento da concentração da mistura OR + RL não apresentou diferença significativa para nenhum dos tempos de exposição testados (Figura 16).

Figura 16: Porcentagem de inibição da germinação de endósporos de *B. cereus* 0426 para os tratamentos contendo RL, OR + RL e LN + RL. As concentrações utilizadas para este experimento foram CBM e 2x CBM. As barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).

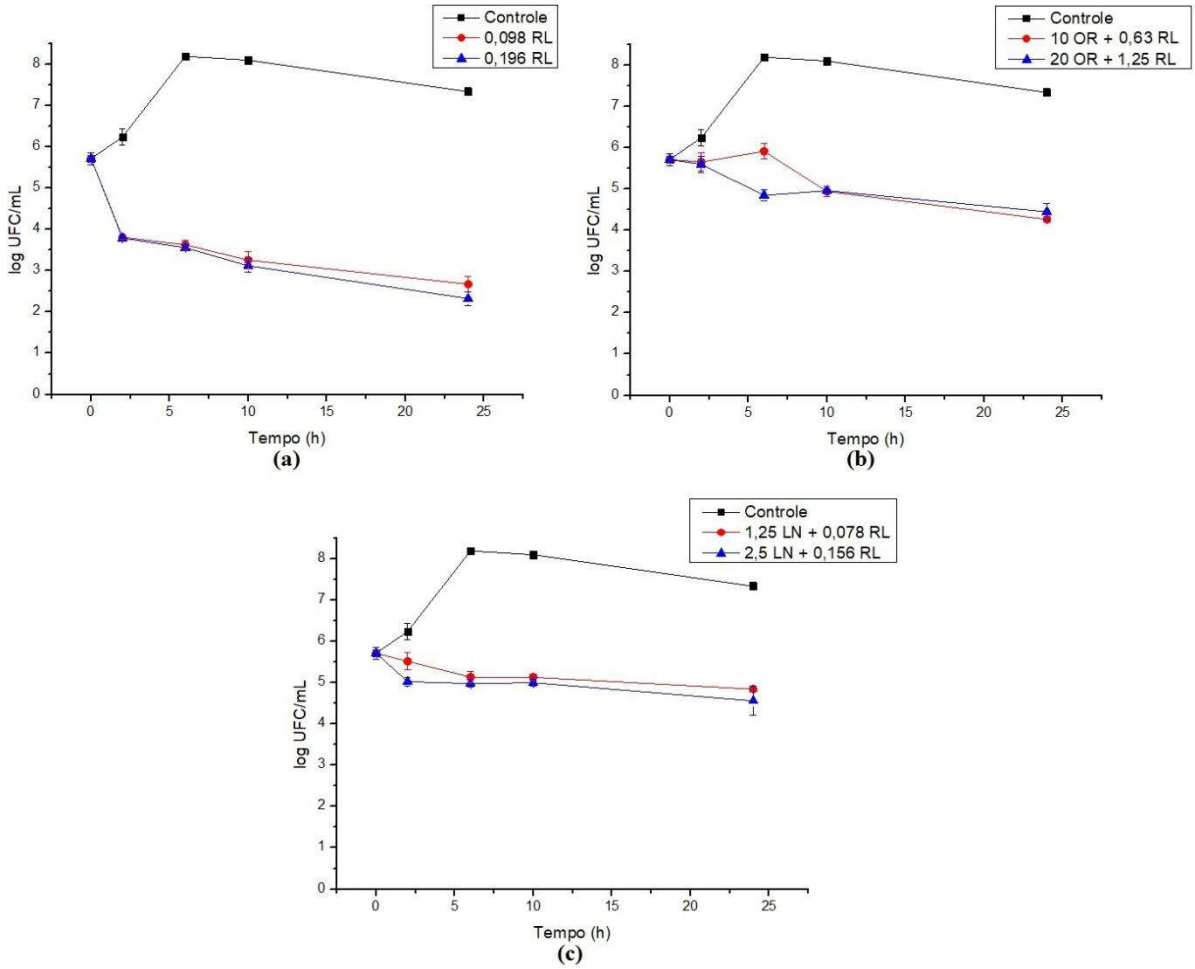


Fonte: Autoria própria.

Já para o tratamento LN + RL, a porcentagem de inibição de germinação de endósporos foi de até 96,8% após 24 h de exposição, na concentração de 2,5 LR + 0,156 RL. Uma importante queda na contagem celular no decorrer do tempo também foi observada,

atingindo redução de aproximadamente 2,8 log, conforme observado na Figura 13c. Também foi possível observar maior efeito tanto com o aumento do tempo de exposição quanto da concentração, sendo o único tratamento que apresentou diferença estatística significativa com o aumento da concentração (Figura 16).

Figura 17: Redução Log da germinação de endósporos de *B. cereus* 0426 após tratamento com (a) RL, (b) OR + RL e (c) LN + RL. Controle (preto), CBM (vermelho) e 2x CBM (azul). As barras de erros representam o desvio padrão de pelo menos três repetições independentes.



Fonte: Autoria própria.

Apesar da ação antimicrobiana do RL e dos óleos essenciais, como o LN, ser bem documentada para células vegetativas de *B. cereus,* trabalhos que avaliam sua ação sobre os endósporos são escassos na literatura. Huang et al. (2007) avaliaram o potencial de um BS produzido por *B. subtilis* para inativar os endósporos de *B. cereus*. O lipopeptídeo mostrou

CIM de 156,25 µg/ml e os autores propuseram que sua combinação com calor poderia reduzir a germinação dos endósporos. Uma redução de 2 log foi observada na população de endósporos de *B. cereus* após tratamento de 7,6 h na temperatura de 29,6 °C com 3,46 mg/ml do lipopeptídeo. Nessas condições foi observada também a ruptura na estrutura, mais precisamente, na capa do endósporo. Os autores inferiram que a natureza surfactante do lipopeptídeo favorece sua ligação às lipoproteínas e sua consequente internalização, resultando assim em danos estruturais ao endósporo.

O aumento do caráter lipofílico de ácidos orgânicos e álcoois, que faz com que estes compostos se acumulem na membrana interna, foi reportado como fator primordial na inibição da germinação de endósporos de *B. cereus*. Os autores levantaram duas hipóteses para este fato: (1) seu acúmulo na membrana interna pode romper as camadas de fosfolipídeo, afetando assim sua integridade, ou (2) alterações no volume e saturação da membrana devido à acúmulo de compostos pode impactar as interações entre as proteínas (VAN MELIS et al., 2012).

Outros estudos têm demonstrado que a natureza anfifílica dos surfactantes, mais precisamente seu balanço hidrofílico-lipofílico (HBL), pode ser correlacionado com o potencial de inativação dos endósporos. Compostos hidrofóbicos como citral, *p*-cimeno e acetato de bornila foram mais eficientes em inibir os endósporos de *B. subtilis* do que compostos hidrofílicos como o 2,3 dihidrobenzofurano e o β-pineno (CHO et al., 2015). A média dos valores de HBL dos compostos que causaram redução significativa de 1 a 2 log nos endósporos foi de 9,3, valor similar a diversos surfactantes químicos conhecidos. De acordo com os autores, as proteínas estruturais da capa do endósporo podem ser alteradas devido à ligações de seus grupos polares e apolares aos grupos funcionais hidrofílicos e hidrofóbicos dos surfactantes.

Amostras de polifenóis de chá verde, incluindo extrato total, epigallacatequina-3-gallato e seus respectivos derivados lipofílicos foram capazes de prevenir a germinação de endósporos em diferentes espécies do gênero *Bacillus*. Os quatro tipos de polifenóis testados inibiram a germinação de endósporos de *B. cereus* em torno de 94-100%, com redução log variando de 1,27 a 3,0. Ruptura e alterações na morfologia da capa, além de agregação dos endósporos foram observadas após tratamentos com os polifenóis (ALI et al., 2017).

Assim, apesar do mecanismo envolvido na inibição dos endósporos ser desconhecido, existe um consenso de que a natureza lipofílica dos compostos exerce influência em sua atividade. Uma vez que a superfície dos endósporos é hidrofóbica, moléculas com esta

característica podem facilmente interagir com estruturas presentes nas capas interna e externa, córtex, membranas e núcleo (CHO; CHUNG, 2020).

O HLB do RL é dependente, entre outros fatores, da pureza e composição dos compostos homólogos presentes na mistura e vários valores diferentes têm sido reportados na literatura, variando de 6,5 até 24 (DÍAZ DE RIENZO et al., 2016; XIE; LI; YE, 2005). Assim, o caráter anfifílico apresentado pelos ramnolipídeos poderia contribuir para os resultados observados neste estudo. A combinação do RL com os compostos hidrofóbicos OR e LN pode melhorar a solubilidade e consequente interação tanto com as estruturas dos endósporos quanto com as células vegetativas.

5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de endósporos de *B. cereus*

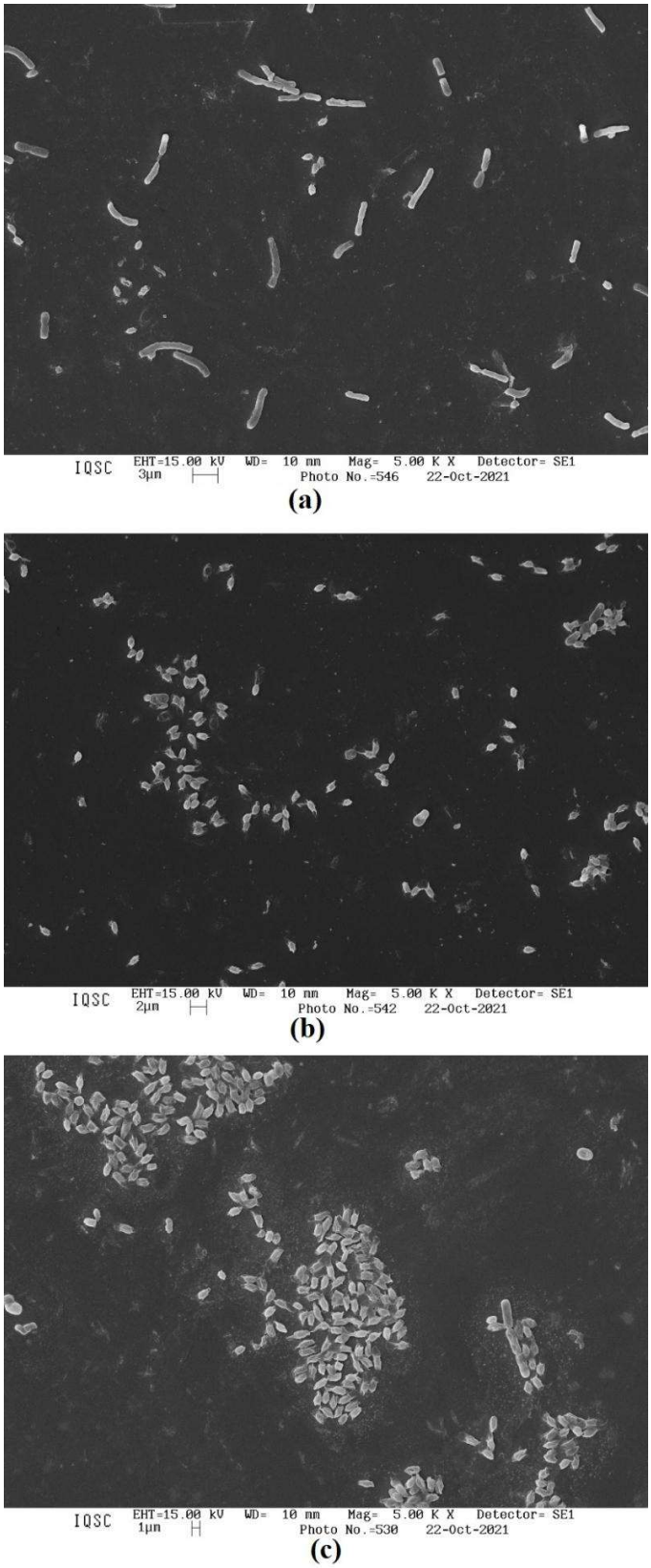
Para evidenciar o efeito do RL, os endósporos foram observados com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura.

Na Figura 18a é possível observar que apenas 2 h após serem transferidas para meio de cultura sem antimicrobiano, grande parte dos esporos foi capaz de germinar. É interessante notar que são necessários vários dias em meio com privação de nutrientes para promover a esporulação enquanto em apenas algumas horas em condições ótimas já é observada grande porcentagem de germinação. Na literatura também existem relatos mostrando que 2 h é o suficiente para a germinação completa de endósporos de *B. cereus* (BROUSSOLLE et al., 2008; SHAHEEN, 2009). No entanto, populações super-dormentes, que demoram muitas horas ou até dias para germinar, também já foram descritas (SETLOW, 2014; SHAHEEN, 2009). Este fato poderia explicar a presença dos endósporos remanescentes na figura 18a.

Já nas figuras 18b e 18c, que mostram os tratamentos com RL de 2 h e 24 h, se observa predominância de esporos. A imagem corrobora os dados da tabela 3, uma vez que, a concentração utilizada foi o CIM determinado para os endósporos dessa linhagem. Além disso, mesmo não sendo capaz de eliminar os endósporos, a presença de RL na concentração de 0,098 mg/ml impede a germinação e, consequentemente, a contaminação e produção de toxinas.

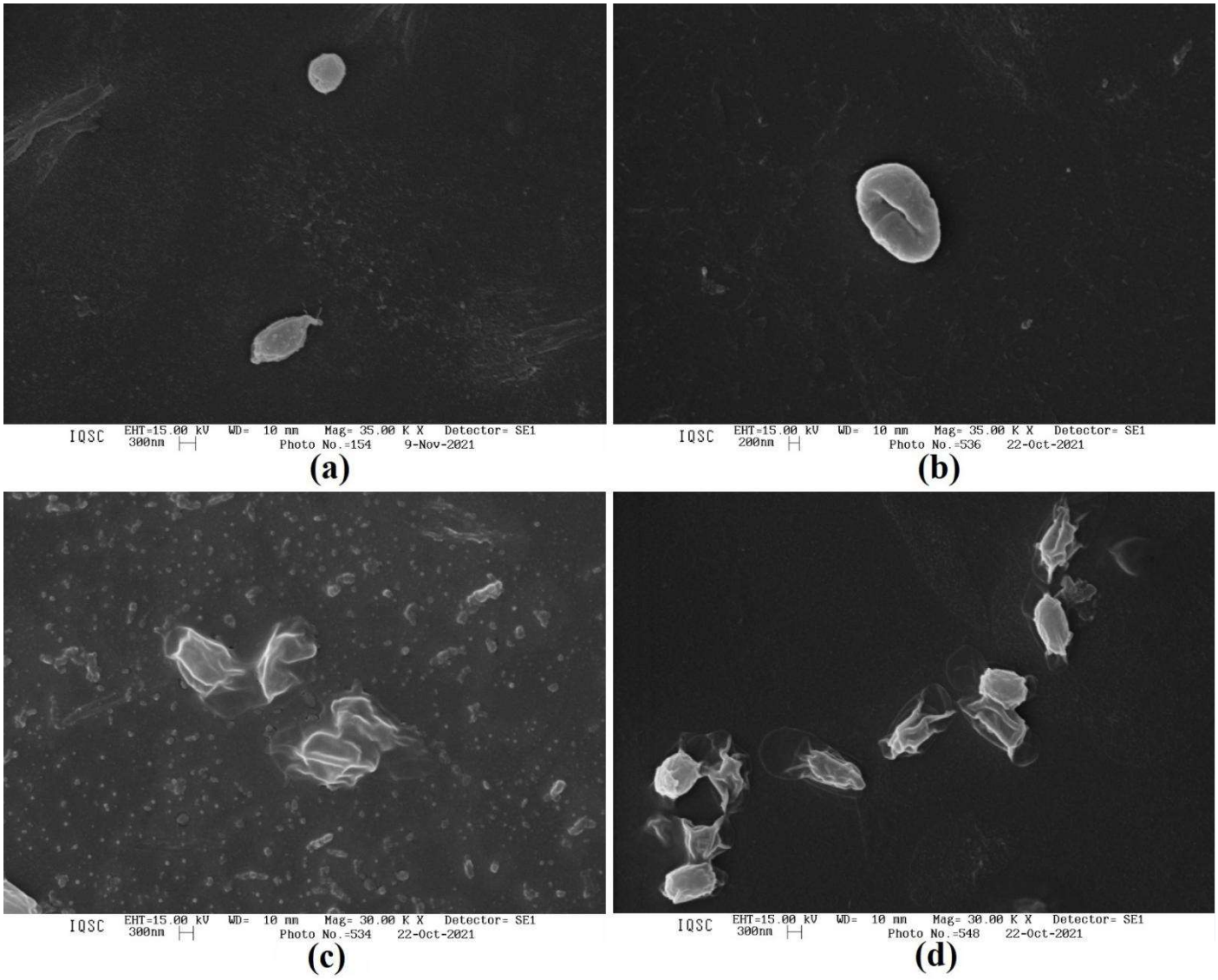
A Figura 19 ilustra em maiores detalhes os efeitos promovidos pelo RL na estrutura dos endósporos. Observa-se que o controle apresenta endósporos íntegros (Figuras 19a e 19b) e superfície relativamente lisa, porém após o tratamento, nota-se alguns esporos disformes e exospório (camada mais externa) mais enrugado. Alguns esporos também parecem ter sofrido lise (Figuras 19c e 19d).

Figura 18: Imagens de MEV ilustrando o efeito do RL na inibição da germinação de endósporos de *B. cereus* 0426. A presença de RL não permite que as células germinem. (a) Controle sem RL 2 h; (b) RL 2 h; (c) RL 24 h.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19: Imagens de MEV de endósporos da *B. cereus* 0426 submetidos a tratamento com RL. A presença de RL modificou a superfície dos endósporos e, em alguns casos, promoveu a lise celular. (a) e (b) Controle sem RL 0 h; (c) e (d) RL 24 h.



Fonte: Autoria própria.

Ali et al. (2017) também relataram que polifenóis de chá verde modificaram a superfície dos esporos *B. cereus* passando de lisa para mais irregular e, em alguns casos, com lise celular. Os autores sugeriram que a alteração na integridade dos endósporos promovidas pelo tratamento seria responsável pelas altas taxas de inibição da germinação observadas.

Da mesma forma, Ryang et al. (2016) observaram enrugamento na superfície externa de endósporos de *B. cereus* após tratamento com calor úmido (105 °C por 60 segundos). Outros grupos também demonstraram a capacidade do calor em inativar e provocar alterações

na morfologia, seja com o enrugamento da camada externa, ou até mesmo com a presença de rachaduras e orifícios na superfície de endósporos de *B. cereus* (LIAO et al., 2020).

Apesar dessas modificações serem um grande indicativo de que os endósporos perderam sua capacidade de germinação e, consequentemente, sua infectividade, existem trabalhos que demonstraram a inatividade dos endósporos mesmo sem modificações visíveis (KULIKOVSKII[7] 1979 *apud* RYANG et al., 2016) na estrutura. Por isso, a combinação de diferentes técnicas de análise se faz necessária.

5.5. Avaliação do crescimento de células vegetativas e esporos da linhagem *B. cereus* 0426 em modelo alimentar (leite desnatado reconstituído)

O potencial antimicrobiano do RL para controle de *B. cereus*, utilizando leite desnatado reconstituído como modelo experimental, foi avaliado com o objetivo de estudar a sua aplicabilidade a nível industrial.

Foram realizados testes de CBM para as células vegetativas e endósporos da linhagem 0426 na temperatura de 30 °C. O teste de CIM não foi realizado uma vez que o corante MTT também tem sua coloração alterada pelo leite, dificultando a determinação das concentrações onde houve ou não crescimento celular. Para as células vegetativas, foi encontrado um CBM de 3,13 mg/ml para o RL, enquanto para os endósporos não foi encontrado valor de CBM entre as concentrações testadas (CBM > 50 mg/ml).

Mesmo sem apresentar valor de CBM para os endósporos, foi realizada uma curva de crescimento a 30 °C com inóculo de endósporos e utilizando a concentração de 2x CBM das células vegetativas (6,25 mg/ml) com o objetivo de avaliar se a presença do RL no leite é capaz de inibir a germinação (Figura 20).

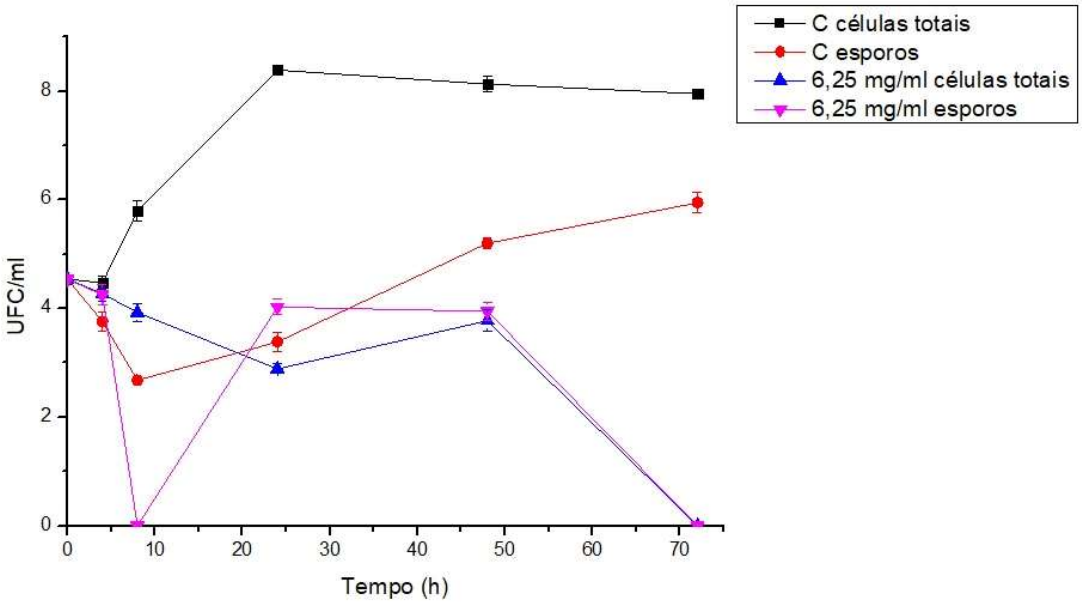
Na figura 20 é possível observar que, para o controle, nas 4 primeiras horas a quantidade de endósporos na amostra começa a cair consideravelmente enquanto o valor das células totais (endósporos + células vegetativas) se mantêm próximo ao número inicial. Essa rápida germinação do controle também pode ser observada na Figura 18, quando após apenas 2 horas em meio de cultura é possível observar grande quantidade de células vegetativas na amostra.

---

[7] Kulikovskiĭ, V. (1979). Structural changes in spores under high temperature exposure. **Zh Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii**, 6,65–67.

É possível observar também que, com o passar do tempo, o número total de células no controle se estabiliza enquanto existe uma tendência de aumento na população de endósporos, o que sugere que as células podem estar respondendo a alguma limitação imposta pelas condições de cultivo ou pelo meio.

Figura 20: Curva de crescimento de endósporos de *B. cereus* 0426 na presença de RL utilizando leite desnatado reconstituído como meio de cultivo na temperatura de 30 °C.



Fonte: Autoria própria.

Para as amostras contendo 6,25 mg/ml de RL, observa-se que a população, tanto de células totais como endósporos, não aumentou além do inoculo inicial. É possível notar também que, com exceção do ponto de 8 horas para os endósporos, as duas curvas na presença de RL seguiram a mesma tendência, o que ilustra sua capacidade de inibir a germinação dos endósporos, além de induzir a erradicação da população após 72 horas.

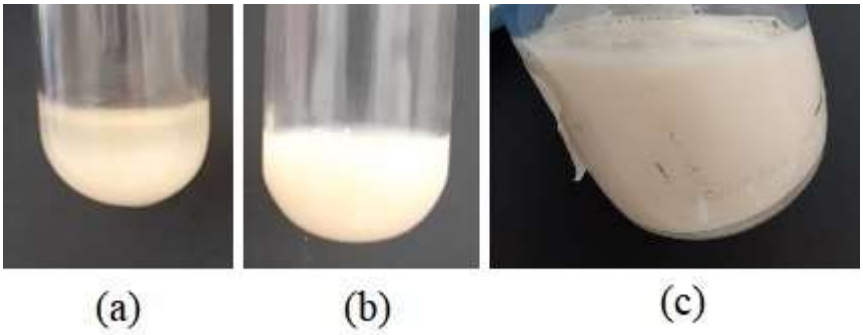
O aspecto visual das amostras de leite após 24 horas de tratamento é mostrado na Figura 21. Enquanto nas amostras controle o leite apresenta separação de fases, nas amostras com RL o leite continua com a mesma aparência anterior à inoculação das bactérias. Estes dados sugerem que o RL poderia ser utilizado para dificultar a proliferação de *B. cereus* no leite.

É interessante notar também a diferença no valor de CBM no leite quando comparado aos valores apresentados na Tabela 3, principalmente para as células vegetativas, que apresentaram CBM de 0,098 mg/ml em TSEYB e CBM de 3,13 mg/ml no leite. Uma hipótese

para isso é a complexidade da matriz quando comparada ao meio de cultura; sendo que a presença de proteínas e minerais pode dificultar a interação do surfactante com a célula, de certa forma, protegendo-a de sua ação.

Na literatura há relatos dos efeitos protetores dos constituintes do leite para bactérias submetidas a tratamentos de alta pressão e ultrassom (BLACK et al., 2007; GERA; DOORES, 2011). No caso do tratamento com alta pressão, as amostras com leite apresentaram valores de sobrevivência na ordem de 2 log acima dos valores observados para as amostras com tampão fosfato. Os autores também investigaram quais compostos do leite poderiam ser os responsáveis por essa diferença e determinaram que a fosfocaseína, além dos minerais fosfato, citrato, cálcio e magnésio, foram capazes de proteger a bactéria *Listeria innocua* do tratamento em questão (BLACK et al., 2007).

Figura 21: Fotos do experimento realizado com endósporos de *B. cereus* a 30 °C após 24 horas de inoculação. (a) Controle; (b) RL 6,25 mg/ml; (c) Leite antes da inoculação dos endósporos.



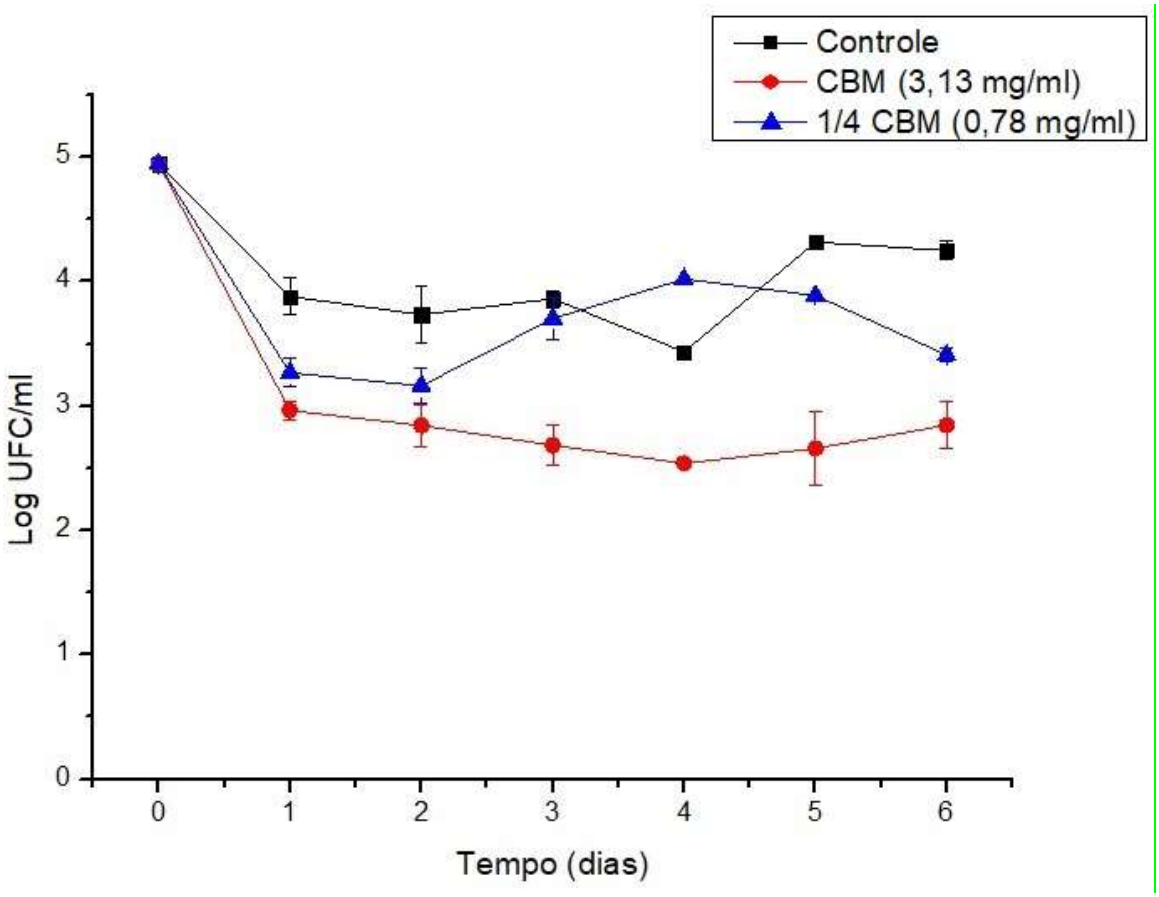
Fonte: Autoria própria.

Visando estudar o efeito do RL em uma condição de armazenamento, foi avaliado o comportamento da população de *B. cereus* em temperatura de refrigeração (4 °C).

Na Figura 22 é possível observar que no primeiro dia houve uma queda no número de células viáveis para todas as amostras. Sendo cerca de 1 log para o controle e aproximadamente 2 log para os tratamentos. Deve-se considerar que a temperatura foi, de certa forma, limitante para o crescimento das células, uma vez que não foi observado aumento pronunciado da população ao longo dos 6 dias. Esse fato é condizente com o apresentado na literatura, que indica que células de *B. cereus* podem crescer em temperaturas entre 4 e 48 °C (FDA, 2012). Assim, é esperado que as células se multipliquem em menor velocidade quando expostas à baixas temperaturas.

Ao avaliar o efeito da temperatura no crescimento de *B. cereus* em substratos vegetais refrigerados, Valero, Fernández e Salmerón (2003) demonstrou que, das 6 linhagens testadas, apenas 1 apresentou crescimento na temperatura de 8 °C, enquanto todas apresentaram crescimento quando armazenadas a 12 °C. Ubong et al. (2019) também relataram que na temperatura de 8 °C a linhagem ATCC 33019 não apresentou crescimento para células vegetativas e para endósporos de *B. cereus.*

Figura 22: Curva de crescimento de *B. cereus* 0426 na presença de RL utilizando leite desnatado reconstituído como meio de cultivo a 4 °C.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 22 também permite concluir que, com o decréscimo da temperatura, o valor que anteriormente foi encontrado como concentração bactericida, se tornou bacteriostático. Isso pode ter ocorrido devido a possibilidade da baixa temperatura levar à indução da esporulação, tornando as células mais resistentes à ação do RL. Ainda assim, as amostras contendo RL demonstraram menor sobrevivência, ilustrando o potencial do RL em controlar o crescimento bacteriano no leite.

Sun et al. (2021) avaliaram o comportamento de células vegetativas de *B. weihenstephanensis* em ambiente refrigerado (7 °C) durante 3 semanas utilizando um BS do tipo glicolipídeo. Os resultados mostraram que a presença do glicolipídeo foi capaz de retardar o crescimento bacteriano no leite, aumentando assim seu tempo de prateleira.

O cinamaldeído, um dos principais componentes do óleo essencial de canela, também foi utilizado juntamente com refrigeração (temperaturas ≤ 8 °C) para o controle de *B. cereus* em caldo de cenoura (VALERO; FRANCÉS, 2006). A nisina comercial também já foi utilizada em combinação com refrigeração (6 °C) para dificultar o crescimento de *B. cereus* no leite por 21 dias, sendo capaz de controlar o crescimento das células vegetativas e a germinação de seus endósporos (MARTINEZ et al., 2016).

Outros glicolipídeos, como o manosileritritol lipídeo-A (MEL-A), tem sido utilizado para controle de *B. cereus* em massas de pão, eliminando 99,97% das células vegetativas e 75,54% dos endósporos após um processo simulado de fermentação da massa (SHU et al., 2022).

Silva (2016) avaliou como a temperatura pode influenciar na agregação micelar dos RL e relatou diferenças na distribuição e tamanho das micelas a 10, 25 e 37 °C evidenciando que com o aumento da temperatura há tendência de aumento no tamanho das micelas de RL em solução. Essa diferença no tamanho das micelas em temperaturas diferentes, pode influenciar na solubilização das mesmas no meio (RAZA et al., 2010; SILVA, 2016), o que afetaria sua disponibilidade para interagir com as células e, consequentemente, seu efeito antimicrobiano. Esse fato também poderia explicar o porquê uma concentração bactericida a 30 °C se torna bacteriostática a 4 °C.

5.6. Atividade antimicrobiana de RL frente a endósporos de *B. cereus*

Para melhor visualizar o potencial dos RL no controle específico de células esporuladas, foram realizados ensaios de CIM e CBM de endósporos obtidos de todas as linhagens *B. cereus* estudadas (Tabela 7).

Observa-se que cerca de metade das linhagens testadas apresentaram valores de CBM menores para os endósporos do que para células vegetativas (Tabela 3). Esse fato vai contra o esperado já que os endósporos são descritos como estruturas de resistência, tolerando condições de crescimento desfavoráveis e estresses ambientais (HUANG et al., 2021; RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015; TURNBULL, 1996). São escassos os estudos que reportam concentrações de CIM ou CBM menores para esporos do que para células vegetativas frente a um mesmo antimicrobiano (ABABOUCH; BOUQARTACHA; BUSTA,

1994; CHAIBI; ABABOUCH; BUSTA, 1996), no entanto, os motivos pelos quais esse fato pode ocorrer não foram explorados.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana do RL frente à endósporos de diferentes linhagens de *B. cereus*.

Linhagem	CIM (mg/ml)	CBM 24h (mg/ml)
10876	0,098	0,78
11778	0,098	1,56
33018	0,098	>25
33019	0,098	3,13
0426	0,098	>25
0477	0,098	6,25
0524	0,098	6,25
0534	0,098	1,56
0547	0,098	3,13
1217	0,098	6,25
1223	0,098	1,56
1224	0,098	3,13
1517	0,098	25
1734	≤0,049	6,25

As placas de petri foram incubadas por mais 24 h para confirmar os valores de CBM

Fonte: Autoria própria.

Os eventos envolvidos no processo de esporulação sofrem influência de fatores como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e íons divalentes (principalmente o Ca^{2+}); por esse motivo é plausível assumir que esporos formados em condições diferentes terão estabilidade e resistência ao calor, radiação e produtos químicos também diferentes (TURNBULL, 1996). Os esporos utilizados neste estudo foram induzidos à esporulação por carência nutricional, após diversos dias na incubadora. Na sequência, foram colocados em contato com o RL em meio com quantidades ótimas de nutrientes. Por se tratar de situações adversas diferentes, é de se esperar que o comportamento necessário para sobreviver à falta de nutrientes seja diferente do comportamento necessário para se evadir da ação antimicrobiana

de um surfactante. Por este motivo, os esporos podem se apresentar mais sensíveis ao RL, uma vez que é possível que cada estímulo para esporulação use um caminho celular diferente.

Esse raciocínio é corroborado quando se observa o processo de germinação, onde Setlow (2014) esclarece que, em *B. subtilis*, vários fatores podem desencadear a germinação dos endósporos e que os componentes celulares recrutados neste processo também variam de acordo com o agente que gerou o estímulo.

Faz-se necessário também considerar como ocorre o processo de germinação dos endósporos, uma vez que para observarmos o crescimento nas placas de CBM, os endósporos devem voltar a forma vegetativa. Madigan et al. (2016), esclarece que, apesar dos endósporos serem capazes de permanecer dormentes por anos, o processo de germinação é relativamente rápido e passa for 3 etapas: ativação, germinação e extrusão. Essa ativação ocorre em taxas maiores quando os endósporos são aquecidos em alta temperatura por alguns minutos (LUU et al., 2015; MADIGAN et al., 2016); no entanto, neste trabalho, os endósporos apenas passaram por aquecimento para eliminação de possíveis células vegetativas antes de serem inoculados no meio contendo RL. A falta de uma segunda etapa de aquecimento pode ter dificultado a germinação desses endósporos para a realização do CBM posteriormente. Dessa forma, mesmo sem ter sido eliminados pelo antimicrobiano, os endósporos permaneceriam em estado de dormência, o que pode levar a erros na realização da leitura da concentração bactericida.

6. PRINCIPAIS RESULTADOS

- Ação Antimicrobiana do RL frente a células vegetativas e endósporos de 14 linhagens de *B. cereus* revelou valores de CIM de 0,098 mg/ml para quase todas as linhagens e CBM variando entre 0,098 e > 25 mg/ml.
- A linhagem 0426 se apresentou mais sensível e baixas concentrações de RL foram capazes de eliminar todas as células inoculadas no período de até 6 h.
- A presença dos antimicrobianos induziu a esporulação de *B. cereus* e inibiu a germinação de endósporos.
- O RL potencializou a ação antimicrobiana do limoneno e da óleo resina de aipo frente a células vegetativas e endósporos.
- O tratamento com RL promoveu danos na estrutura externa dos endósporos.
- O RL é capaz de inibir o crescimento de células vegetativas de *B. cereus* no leite.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram avaliadas 14 linhagens de *B. cereus* majoritariamente isoladas de alimentos quanto à sua sensibilidade ao surfactante Ramnolipídeo.

O RL demonstrou grande potencial como antimicrobiano frente à células de *B. cereus*. Apesar de em alguns casos não ter sido possível encontrar a concentração bactericida, a presença do RL é capaz de inibir tanto as células vegetativas quanto os endósporos dessa bactéria, tanto em meio de cultura quanto no leite. Além disso, o RL promoveu aumento da ação antimicrobiana de óleo resina de aipo e limoneno.

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que utiliza RL e sua combinação com moléculas hidrofóbicas como limoneno e óleo resina de aipo com o objetivo de inibir de endósporos de *B. cereus*. A combinação destes compostos juntamente com métodos físicos (calor, radiação, pressão) ou o desenvolvimento de micro/nanoemulsões explorando RL e componentes da OR ou óleos essenciais pode resultar em novas estratégias para o controle deste importante patógeno alimentar. Novos estudos são necessários com o objetivo de compreender o mecanismo envolvido na inibição de endósporos por estes compostos.

REFERÊNCIAS

ABABOUCH, L. H.; BOUQARTACHA, F.; BUSTA, F. F. Inhibition of bacillus cereus spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. **Food Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 327–336, 1994.

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.

ABURJAI, T. et al. Hypolipidemic effects of seed extract of celery (Apium graveolens) in rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 5, n. 20, p. 301, 2009.

ADETUNJI, C. O. et al. Prolonging the shelf life of 'Agege Sweet' orange with chitosan–rhamnolipid coating. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 59, n. 5, p. 687–697, 2018.

AGATA, N. et al. A Novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from bacillus cereus causes vacuole formation in HEp-2 cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, n. 1, p. 31–34, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de alimentos e vigilância sanitária**. Brasília: ANVISA, 2016.

AL-ASMARI, A. K.; ATHAR, M. T.; KADASAH, S. G. An Updated phytopharmacological review on medicinal plant of Arab region: apium graveolens linn. **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 21, p.13-18, Jan./June 2017. DOI: 10.4103/phrev.phrev_35_16.

ALI, B. et al. Modified green tea polyphenols, EGCG-S and LTP, inhibit endospore in three bacillus spp. **Advances in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 175–187, 2017.

ANDERSSON, M. A. et al. Toxicological profile of cereulide, the bacillus cereus emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 351–367, 2007.

ANDRADE, B. F. M. T. et al. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 34–40, 2014.

ARAUJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin: anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171–178, 2016.

ARSHAD, H. et al. Effect of microencapsulation on antimicrobial and antioxidant activity of nutmeg oleoresin using mixtures of gum Arabic, OSA, and Native Sorghum Starch. **Starch/Staerke**, v. 70, n. 7–8, p. 1–12, 2018.

ASBAHANI, A. El. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

BACILLUS cereus and other bacillus species. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. 2nd ed. Maryland: FDA, 2012. p. 92-95.

BEISL, J. et al. Combinatory effects of cereulide and deoxynivalenol on in vitro cell viability and inflammation of human caco-2 cells. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 833–844, Mar. 2020.

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

BLACK, E. P. et al. Baroprotection of vegetative bacteria by milk constituents: a study of listeria innocua. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 2, p. 104–110, 2007.

BÖHM, M. E. et al. Comparative bioinformatics and experimental analysis of the intergenic regulatory regions of bacillus cereus hbl and nhe enterotoxin operons and the impact of CodY on virulence heterogeneity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–16, May 2016.

BOZUE, J. A.; WELKOS, S.; COTE, C. K. The Bacillus anthracis exosporium: what's the big "hairy" deal?. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 5, 2015. DOI: https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0021-2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília: MS/SVS, 2017. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentaçao-Surtos-DTA-2017.pdf. Acesso em: 8 jan. 2022.

BROUSSOLLE, V. et al. Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the bacillus cereus group. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1081–1090, 2008.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: quo vadis?. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 284–295, 2015.

CARROLL, L. M. et al. Characterization of emetic and diarrheal Bacillus cereus strains from a 2016 foodborne outbreak using whole-genome sequencing: addressing the microbiological, epidemiological, and bioinformatic challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, Feb. 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00144.

CHAIBI, A.; ABABOUCH, L. H.; BUSTA, F. F. Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 716–722, 1996.

CHO, W. IL et al. Sporicidal activities of various surfactant components against bacillus subtilis spores. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 6, p. 1221–1225, 2015.

CHO, W. IL; CHUNG, M. S. Bacillus spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 1447–1461, 2020.

CLEMENTS, T. et al. Biosurfactants produced by serratia species: classification, biosynthesis, production and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103. p. 589–602, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard** — ninth edition. Wayne: CLSI, 2012. v. 32, n. 2. (CLSI publication, M07-A9).

CORTHOUTS, J.; MICHIELS, C. W. Inhibition of nutrient- and high pressure-induced germination of bacillus cereus spores by plant essential oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 250–258, 2016.

CUFAOGLU, G.; AYAZ, N. D. Potential risk of bacillus cereus in spices in Turkey. **Food Control**, v. 132, Feb.2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108570.

DAVENPORT, E. K.; CALL, D. R.; BEYENAL, H. Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from acinetobacter baumannii and staphylococcus aureus biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4755–4761, 2014.

DE MARTINO, L. et al. Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1741-1750, 2009. DOI: https://doi.org/10.1177/1934578X0900401226.

DEEPIKA, K. V.; RAMU SRIDHAR, P.; BRAMHACHARI, P. V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium pseudomonas aeruginosa strain KVD-HM52. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 608–615, 2015.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm disruption using microbial surfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 868–876, 2016.

DIERICK, K. et al. Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4277–4279, 2005.

DIETRICH, R. et al. The Food poisoning toxins of bacillus cereus. **Toxins**, v. 13, n. 2, Jan. 2021. DOI: 10.3390/toxins13020098.

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

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

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.

ESPINA, L. et al. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2013.

FAZAL, S.; SINGLA, R. Review on the pharmacognostical & pharmacological characterization of apium graveolens linn. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 36–42, 2012.

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, Feb. 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.09.005.

FOGELE, B. et al. Occurrence and diversity of Bacillus cereus and moulds in spices and herbs. **Food Control**, v. 83, p. 69–74, 2018.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 694–705, 2009.

GERA, N.; DOORES, S. Kinetics and mechanism of bacterial inactivation by ultrasound waves and sonoprotective effect of milk components. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 111–119, 2011.

GLASSET, B. et al. Bacillus cereus -induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014 : epidemiology and genetic characterisation. **EuroSurveillance**, v. 21, n. 48, Dec. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.48.30413.

GOHAR, M. et al. The PlcR virulence regulon of bacillus cereus. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, July 2008.

GOMES, M. S. et al. Use of essential oils of the genus citrus as biocidal agents. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2014, n. 5, p. 299–305, 2014.

GRAY, J. A. et al. Novel biocontrol methods for Listeria monocytogenes biofilms in food production facilities. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p.1-12, Apr. 2018.

GUIMARÃES, A. C. et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 1–12, 2019.

GUINEBRETIÈRE, M. H.; BROUSSOLLE, V.; NGUYEN-THE, C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne bacillus cereus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3053–3056, 2002.

GÜLAY KIRBAŞLAR, F. et al. Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 6, p. 3207–3212, 2009.

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. Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against Candida albicans and methicillin-resistant staphylococcus aureus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1, p. 134–141, 2014.

HAMOUDA, T.; SHIH, A. Y.; BAKER, J. R. A Rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 86–90, 2002.

HASSANEN, N. H. M.; EISSA, A. M. F.; HAFEZ, S. A. M. Antioxidant and antimicrobial activity of celery (Apium graveolens) and coriander (Coriandrum sativum) herb and seed essential oils. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 284–296, 2015.

HUANG, Q. et al. SpoVG is an important regulator of sporulation and affects biofilm formation by regulating Spo0A transcription in Bacillus cereus 0–9. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–17, 2021.

HUANG, X. et al. Optimization of inactivation of endospores of Bacillus cereus by antimicrobial lipopeptides from bacillus subtilis fmbj strains using a response surface method. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 454–461, 2007.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p.1-24, Jan. 2012.

ITOH, S. et al. Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin (mixture of c12, c13 and c14 fractions). **The Journal of Antibiotics**, v. 24, n. 12, p. 855–859, 1971.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide produced by pseudomonas aeruginosa. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124–4126, 1949.

JIANG, L. et al. Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10187–10196, 2014.

KING, A. T. et al. Surfactant effects on yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 2, p. 148–153, 1991.

KING, K. Packaging and storage of herbs and spices. In: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of herbs and spices**. New York: Elsevier, 2006. Cap.5, p.86-102. (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition).

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

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

LERECLUS, D. et al. Regulation of toxin and virulence gene transcription in bacillus thuringiensis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.290, p.295-299, 2000.

LI, Z. H. et al. Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from citrus medica L. Var. Sarcodactylis. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1–10, 2019.

LIAO, X. et al. The Application of plasma-activated water combined with mild heat for the decontamination of bacillus cereus spores in rice (Oryza sativa L. ssp. japonica). **Journal of Physics D**: applied physics, v. 53, n. 6, 2020. DOI: https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab573a.

LOTFABAD, T. B. et al. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by pseudomonas aeruginosa MR01: enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v. 81, n. 2, p. 397–405, 2010.

LOTFABAD, T. B.; SHAHCHERAGHI, F.; SHOORAJ, F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous pseudomonas aeruginosa strains. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 29–35, 2013.

LUCERA, A. et al. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–13, Aug. 2012.

LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A New cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254–261, 2000.

LUU, S. et al. The Effects of heat activation on Bacillus spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2927–2938, 2015.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de brock. 14.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

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. 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.

MARTINEZ, R. C. R. et al. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on Listeria monocytogenes and bacillus cereus in refrigerated milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 67–75, 2016.

MASCARENHAS, L. R. S. **Fatores de virulência de bacillus cereus sensu stricto isolados de alimentos**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte, 2018.

MASSON, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (Copaifera langsdorffii) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 664–669, 2013.

MAYER, D. M. D. **Controle de patógenos de importância alimentar utilizando ramnolipídeo e óleoresina 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.

MCCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent advances in the utilization of natural emulsifiers to form and stabilize emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 205–236, 2017.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The Estimation of the bactericidal power of the blood. **Epidemiology and Infection**, v. 38, n. 6, p. 732–749, 1938.

MURTEY, M.; RAMASAMY, P. Sample preparations for scanning electron microscopy – life sciences. In: JANECEK, M.; KRAL, R. (Ed.). **Modern electron microscopy in physical and life sciences**. London: IntechOpen, 2016.

NAGARAJAN, R. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 4, p. 605–609, 1991.

NDLOVU, T. et al. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by bacillus amyloliquefaciens and Pseudomonas aeruginosa isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express**, v. 7, n. 1, May 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0363-8.

NIELSEN, L. E. et al. Survey of extreme solvent tolerance in Gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in Staphylococcus haemolyticus grown in toluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5171–5176, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 252–259, 2007.

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.

OKUNOWO, W. O. et al. Essential oil of grape fruit (citrus paradisi) peels and its antimicrobial activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2013, p. 1–9, July 2013.

ORTIZ, A. et al. Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1–2, p. 99–107, 2006.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of bacillus subtilis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 579–586, 2004.

PÓSFAY-BARBE, K. M. et al. Food poisoning as a cause of acute liver failure. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, p. 846–847, 2008.

PRABAKARAN, G. et al. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from pseudomonas fluorescens (VCRC B426). Acta Tropica, v. 148, p. 24–31, 2015.

PRAKOSO, Y. A. et al. Celery (apium graveolens) as a potential antibacterial agent and its effect on cytokeratin-17 and other healing promoters in skin wounds infected with methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Veterinary World**, v. 13, n. 5, p. 865–871, 2020.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de bacillus e gêneros esporulados correlatos**. Brasília: Ministério da Saúde; Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

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

RODRIGUES A. I. et al. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13424-x.

ROSSI, G. A. M. et al. Comparative genomic survey of bacillus cereus sensu stricto isolates from the dairy production chain in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 3, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fnx283.

RYANG, J. H. et al. Destruction of Bacillus cereus spores in a thick soy bean paste (doenjang) by continuous ohmic heating with five sequential electrodes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 66–73, 2016.

SABARINATHAN, D. et al. Characterization and application of rhamnolipid from pseudomonas plecoglossicida BP03. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 251–262, 2021.

SAMBANTHAMOORTHY, K. et al. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

SCHRAMM, L. L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G. Surfactants and their applications. **Annual Reports on the Progress of Chemistry** - section C, v. 99, p.3-48, Sept. 2015.

SETLOW, P. Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514–525, 2006.

SETLOW, P. Germination of spores of bacillus species: what we know and do not know. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 7, p. 1297–1305, 2014.

SHAHEEN, R. **Bacillus cereus spores and cereulide in food-borne illness**. 2009. Dissertation (MsC) - Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, 2009.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. **Food Control**, v. 13, n. 6–7, p. 469–477, 2002.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 407–413, 2009.

SHU, Q. et al. The Dough-strengthening and spore-sterilizing effects of mannosylerythritol lipid-A in frozen dough and its application in bread making. **Food Chemistry**, v. 369, Feb. 2022. DOI: https//doi.org/10.1016/j.foodchem.2001.131011.

SHUTTER, M. C.; AKHONDI, H. **Tetracycline**. 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5499005/. Acesso em: 8 jan. 2022.

SIGMA-ALDRICH. (R)-(T)-Limonene. 2022. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/183164?lang=pt&region=BR&gclid=EAIaIQobChMI-8r05f72AIVgwyRCh3Q1gKAEAAYASAAEgIOhPD_BwE. Acesso em: 8 jan. 2022.

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

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

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

SINDHU, R. et al. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – an overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203–215, Dec. 2016.

SINGH, A.; HANDA, S. S. Hepatoprotective activity of apium graveolens and hygrophila auriculata against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 3, p. 119–126, 1995.

SLAMTI, L.; LERECLUS, D. A Cell-cell signaling peptide activates thePlcR virulence regulon in bacteria of the bacillus cereus group. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 17, p. 4550–4559, 2002.

SOTIROVA, A. V. et al. Rhamnolipid – biosurfactant permeabilizing effects on grampositive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 639–644, June 2008. DOI: 10.1007/s00284-008-9139-3.

SOWBHAGYA, H. B. Chemistry, technology, and nutraceutical functions of celery (apium graveolens L.): an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 389-398, 2014. DOI: https://doi.org/ 10.1080/10408398.2011.586740.

SRIVASTAVA, S.; BHARGAVA, A. Biofilms and human health. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 1, p. 1-22, Jan. 2016. DOI: 10.1007/s10529-015-1960-8.

STEPHENSON, K.; HOCH, J. A. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 297–304, 2002.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259-264, Sept. 2007.

SUN, L. et al. Antimicrobial effects of a bioactive glycolipid on spore-forming spoilage bacteria in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4002–4011, 2021.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.
DOI: https://doi.org/10.1155/2016/3012462.

TALLENT, S. M.; KNOLHOFF, A. BAM: quantitative analysis for cereulide in food products. 2020. Disponível em: http://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-quantitative-analysis-cereulide-food-products. Acesso em: 8 jan. 2022.

TURNBULL, P. C. B. **Bacillus**. In: BARON, S. (Ed.). Medical microbiology. 4thed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

UBONG, A. et al. Impact of temperature on bacillus cereus spore germination in ultra-high temperature chocolate milk. **Food Research**, v. 3, n. 6, p. 808–813, 2019.

VALERO, M.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Influence of pH and temperature on growth of bacillus cereus in vegetable substrates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 71–79, 2003.

VALERO, M.; FRANCÉS, E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit bacillus cereus in carrot broth. **Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 68–73, 2006.

VAN MELIS, C. C. J. et al. Germination inhibition of Bacillus cereus spores: impact of the lipophilic character of inhibiting compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 124–130, 2012.

VIEIRA, E. A. Ação antimicrobiana de ramnolipídeos sobre células sésseis e planctônicas de staphylococcus aureus: efeito do pH. 2018. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535–2554, 2009.

WATNICK, P. MINIREVIEW biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases**: executive summary. 2015. WHO Executive Summary.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheets**: food safety. 2019. Disponível em: https://www.who.int/news-room/facts-sheels/detail/food-safety. Acesso em: 8 jan. 2022.

WOLSKA, K. I.; GRUDNIAK, A. M.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A. Genetic and physiological regulation of bacterial endospore development. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 11–17, 2007.

XIE, Y. W.; LI, Y.; YE, R. Q. Effect of alcohols on the phase behavior of microemulsions formed by a biosurfactant - rhamnolipid. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 455–461, 2005.

ZHOU, Y. et al. A Novel compound from celery seed with a bactericidal effect against helicobacter pylori. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1067–1077, 2009.

Capítulo II

Citotoxicidade e atividade leishmanicida do Ramnolipídeo

RESUMO

Ramnolipídeos são biossurfactantes produzidos principalmente por linhagens de *Pseudomonas aeruginos*a e que apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de atividade demonstrada frente a diversos organismos. Com isso, o RL recebe o status de "tensoativos verdes", obtidos a partir de substratos renováveis, contribuindo para a bioeconomia circular. Nesse estudo, foi avaliada a citotoxicidade do RL em queratinócitos e sua atividade leishmanicida contra *Leishmania infantum chagasi*. Os testes em células humanas mostraram que o efeito citotóxico do RL é dose e tempo dependente, promovendo cerca de 70% de morte celular após 72 h de exposição nas concentrações testadas. Concentrações acima de 0,39 mg/ml de RL promoveram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo danos ao DNA das células. O tratamento com RL reduziu 90% da população de leishmania após 24 h de exposição na concentração de 1,56 mg/ml e após 48 h na concentração de 0,78 mg/ml. Os testes de citotoxicidade revelaram que as leishmanias foram mais afetadas pela presença de RL que os queratinócitos. Esses resultados ilustram o potencial do uso do RL para tratamento da leishmaniose, zoonose negligenciada e com limitadas opções terapêuticas.

Palavras-chave: Ramnolipídeo. Atividade leishmanicidal. Citotoxicidade. ROS. Dose-dependência. Surfactante.

ABSTRACT

Rhamnolipids are biosurfactants primary synthesized by *Pseudomonas aeruginos*a strains which present low toxicity, high biodegradability and have demonstrated activity against several organisms. Thereby, RL achieved the status of "green surfactants", obtained from renewable substrates and contributing to circular bioeconomy. In this study, keratinocytes cytotoxicity and leishmanicidal activity of rhamnolipid against *Leishmania infantum chagasi* were evaluated. The tests performed with human cells showed that the RL cytotoxic effect is dose and time dependent, reaching around 70% of cell death after 72 h exposure in the concentrations tested. The presence of RL at concentrations higher than 0.39 mg/ml increased the production of oxygen reactive species and these results suggests it may cause cell DNA damage at high concentrations. Leishmania population was reduced by 90% after 24 h of exposure with 1.56 mg/ml of RL; after 48h, on the other hand, similar inhibitory values were observed with 0.78 mg/ml. Citotoxicity test revealed that the parasites were more affected by the presence of RL than the keratinocytes. This results illustrates the potential of RL for the treatment of leishmaniosis, a neglected zoonosis with limited therapeutic options.

Keywords: Rhamnolipid. Leishmanicidal activity. Cytotoxicity. ROS. Dose-dependency. Surfactant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida da leishmania e seus estágios de desenvolvimento em humanos e no mosquito-palha.....100
Figura 2: Representação esquemática do protocolo para determinação da Citotoxicidade do RL em células humanas.....106
Figura 3: Representação esquemática do protocolo para avaliação Efeito do RL na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....107
Figura 4: Representação esquemática do protocolo para determinação da atividade leishmanicida do RL.....109
Figura 5: Viabilidade celular de queratinócitos após exposição ao RL por 24 h, 48 h e 72 h. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).....112
Figura 6: Produção de espécies reativas de oxigênio pela ação do RL em queratinócitos. Tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).....113
Figura 7: Atividade leishmanicida do RL após 24 e 48 horas de exposição. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).....115

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

°C - graus Celsius

µg/ml - Micrograma por mililitro

µl - Microlitro

µm - micrômetro

ANOVA - análise da variância

cm^2 - Centímetros quadrados

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, em Inglês

g/l - Grama por litro

mg/l - Miligrama por litro

mg/ml - Miligrama por mililitro

ml – Mililitro

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

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

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline*, em Inglês

RL – Ramnolipídeo

ROS - *Reactive oxygen species,* em Inglês

rpm - Rotações por minuto

RPMI - *Gibco Roswell Park Memorial Institute medium*, em Inglês

SFB - Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....97
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....99
2.1. Tocixidade celular do RL 99
2.2. Leishmania.....100
3. OBJETIVOS.....103
3.1. Objetivo geral.....103
3.2. Objetivos específicos.....103
4. METODOLOGIA.....105
4.1. Ramnolipídeo.....105
4.2. Citotoxicidade do RL em células humanas 105
4.3. Efeito do RL na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) 106
4.4. Atividade leishmanicida do RL.....108
4.5. Análise estatística.....109
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....111
5.1. Citotoxicidade do RL em células humanas.....111
5.2. Avaliação intracelular da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em células humanas como efeito da ação do RL.....113
5.3. Atividade leishmanicida do RL.....114
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS 117
REFERÊNCIAS.....119

1. **INTRODUÇÃO**

No capítulo anterior foi discutido o potencial do uso de produtos naturais, especialmente o ramnolipídeo, para o controle do patógeno alimentar *Bacillus cereus*. Entre as vantagens de seu uso, pode-se mencionar a baixa toxicidade, biodegradabilidade e possibilidade de produção partir de substratos renováveis (NITSCHKE; COSTA, 2007; NITSCHKE; SILVA, 2018) ou resíduos (LAN et al., 2015; PÉREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2019), o que potencialmente reduziria seu custo de produção além de contribuir para a bioeconomia circular (GAUR et al., 2022).

Entretanto, apesar das vantagens, faz-se necessário avaliar sua toxicidade frente à células animais, tanto para confirmar sua inocuidade quanto para nortear seu uso em futuras aplicações.

Testes de citotoxicidade têm sido tradicionalmente utilizados antes de iniciar as fases dos testes clínicos, onde os custos de investir erroneamente em um composto podem ser enormes. Além disso, métodos que usam animais são demorados, e demandam grande quantidade de trabalho e pessoal qualificado (SLATER, 2001).

Alguns autores têm explorado as diferenças de citotoxicidade do RL tanto em células saudáveis quanto em diversos tipos de células tumorais (JIANG et al., 2014; RAHIMI et al., 2019; SABARINATHAN et al., 2021). No entanto, conforme esperado para compostos naturais, existe uma grande variabilidade nos valores reportados, que dizem respeito à diferença de lotes, fonte de obtenção, porcentagens de mono e di-RL, meio de crescimento das células, linhagem celular, entre outros.

Além dos trabalhos utilizando células animais, existem também relatos na literatura da ação do RL contra fungos, bactérias e pupas de mosquitos (ABALOS et al., 2001; LOTFABAD; SHAHCHERAGHI; SHOORAJ, 2013; NDLOVU et al., 2017; PRABAKARAN et al., 2015). No entanto, não foram encontrados trabalhos que avaliam a ação desse surfactante contra parasitas, especialmente *Leishmania*.

As leishmanias são os parasitas responsáveis pela doença conhecida por Leishmaniose, que é transmitida pelo mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) e pode ser fatal. Essa é uma doença comum de regiões tropicais e subtropicais e, em 2020, o Brasil apresentou 97% dos casos de leishmaniose visceral reportados no continente americano (MADIGAN et al., 2016; WHO, 2022). A leishmaniose acomete principalmente animais domésticos, em sua maioria cães, e uma vez que o cão está infectado as pessoas em seu convívio encontram-se em risco aumentado de adquirir a infecção (TRAVI et al., 2018). Em alguns casos o tratamento não é completamente

eficaz e o cão pode desenvolver a doença novamente, por esse motivo, em muitos países a eutanásia desses animais é recomendada em caso de leishmaniose visceral (TRAVI et al., 2018). Apesar de se tratar de uma medida drástica e muitas vezes questionável, existem estudos relacionando o abate de animais domésticos com a redução da prevalência de leishmaniose na população humana (NUNES et al., 2010).

Por ser classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma das principais doenças parasitárias com potencial de surtos e mortalidade (WHO, 2022), novas alternativas de controle e terapia para esta doença se fazem necessárias.

No Brasil, o Ministério da Saúde distribui como medicamento para o tratamento de leishmaniose, o antimoniato N-metil glucamina, que foi introduzido no mercado na década de 40. Devido ao aparecimento de resistência ao medicamento por parte do parasita, doses cada vez mais altas e tratamentos mais longos estão sendo prescritos, o que também favorece o aparecimento de efeitos adversos (BRASIL, 2006). Por estes motivos, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de alternativas para combate dessa doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Toxicidade celular do RL

Os ensaios *in vitro* de viabilidade celular e citotoxicidade têm sido cada vez mais utilizados para testar produtos químicos e na triagem de potenciais medicamentos, sendo considerados um dos mais importantes indicadores de avaliação biológica. Entre as vantagens de seu uso, é possível citar seu relativo baixo custo, segurança, confiabilidade, reprodutibilidade, eficiência e rapidez para obtenção dos resultados (ASLANTÜRK, 2018). Com isso, a indústria farmacêutica consegue escalabilidade e é capaz de analisar a viabilidade de milhares de compostos de interesse em poucas semanas (SLATER, 2001).

JIANG et al., 2014, estudaram a citotoxicidade do mono e di-RL frente à células tumorais e células saudáveis, sendo que o mono-RL apresentou citotoxicidade com concentrações menores de droga quando comparado ao di-RL. Os autores também avaliaram como a presença de soro fetal bovino (SFB), composto rotineiramente utilizado em meios de cultura para células animais, pode proteger as células do efeito do RL, com os valores de toxicidade do mono-RL aumentando de 10 para 100 mg/l e do di-RL aumentando de 20 para 150 mg/l na presença de SFB.

Mono e di-RL produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* também se apresentaram eficazes frente a células de câncer de mama, com concentração inibitória mínima de apenas 8 μg/ml e 90% de morte celular de com valores de 62 μg/ml para mono-RL e 125 μg/ml para di-RL após 48 horas de exposição à droga. Os autores sugerem que os mono-RL interagem mais fortemente com a superfície das células, provavelmente devido ao fato de serem mais hidrofóbicos do que os di-RL, o que também explicaria sua maior toxicidade. Após o tratamento com RL, as células então começam a expressar o gene p53, sofrem alteração em sua morfologia típica e descolam da superfície de crescimento, claros sinais de que está iniciando o processo de apoptose (RAHIMI et al., 2019).

Assim como observado para outros organismos, o efeito do RL é dose dependente, com 100 μg/ml de RL atingindo até 70% de morte celular em células de sarcoma humano (SABARINATHAN et al., 2021).

A citotoxicidade de nanopartículas de RL/quitosana foi avaliada em células endoteliais de veias do cordão umbilical humano. Os autores demonstraram que, ao

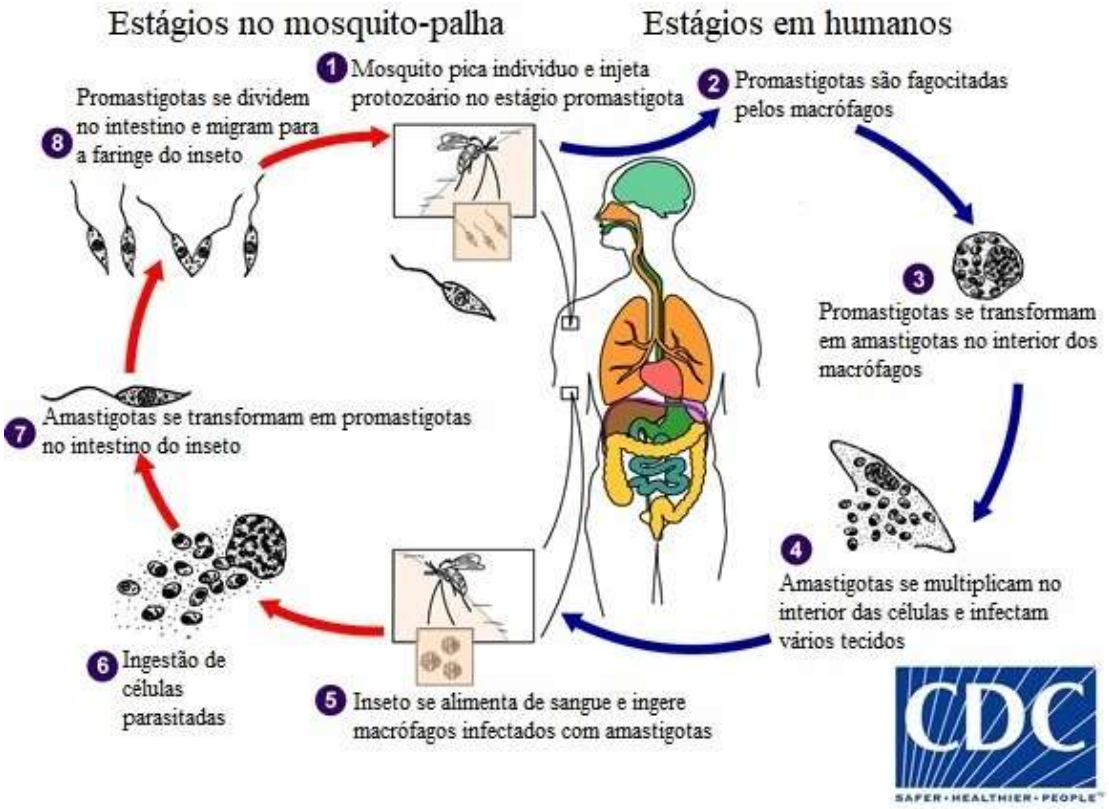
combinar os dois compostos, houve aumento da atividade antimicrobiana das nanopartículas e redução da citotoxicidade (MARANGON et al., 2020).

Os dados reportados por Marangon et al. (2020) é o que idealmente se espera de um composto antimicrobiano, ser eficaz no combate ao organismo alvo e ao mesmo tempo não apresentar alta citotoxicidade para células humanas e/ou outros organismos.

2.2. Leishmania

O gênero *Leishmania* compreende um grupo de protozoários que causam a doença conhecida por Leishmaniose, que afeta principalmente homens e cães. A doença é transmitida pela picada da fêmea do mosquito palha (*Lutzomyia longipalpis*) infectada (BRASIL, 2006; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2020; ZELEDÓN, 1996).

Figura 1: Ciclo de vida da leishmania e seus estágios de desenvolvimento em humanos e no mosquito-palha.



Fonte: Modificado de CDC (2020).

Uma vez no interior do corpo do hospedeiro, as leishmanias são fagocitadas pelos macrófagos, que não conseguem eliminá-las. Estas então se transformam em sua forma amastigota e passam a se replicar, podendo infectar novas células. Ao ingerir o sangue de um indivíduo infectado, o mosquito palha adquire o parasita, que é capaz de sobreviver ao processo de digestão do inseto e se transforma em promastigota, sua forma flagelada. Para fechar o ciclo, o inseto faz o repasto no indivíduo e injeta o protozoário no seu corpo (Figura 1) (CDC, 2020; ZELEDÓN, 1996).

A leishmaniose pode se apresentar de 3 diferentes formas: visceral, cutânea e mucocutânea. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, que pode ser fatal em até 95% dos casos; ela afeta os órgãos internos, principalmente fígado e rins, causando seu aumento e provocando distensão abdominal. A OMS estima que essa forma afete entre 50 e 90 mil pessoas no mundo por ano, sendo que a maioria dos casos acontecem no Brasil, Leste da África e Índia (MADIGAN et al., 2016; WHO, 2022). Entre os grupos com maior risco de apresentar letalidade pela doença, podemos citar maiores de 50 anos, pessoas que convivem com o vírus HIV e aquelas que possuem algum tipo de alteração cardíaca (MADALOSSO et al., 2012). Uma vez que pode acometer diversos órgãos, a leishmaniose visceral pode ser considerada uma doença sistêmica, além disso, alguns autores também descreveram que ela eleva a produção de citocinas pró inflamatórias no corpo (COSTA et al., 2010; NYLÉN et al., 2007; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006) e causa fibrose nos órgãos que acomete, especialmente em cães (SILVA et al., 2013).

Já a leishmaniose cutânea, é a forma mais comum da doença e consiste em lesões na pele que podem se tornar úlceras. Essas lesões contêm os parasitas ativos e geralmente são acompanhadas por infecções bacterianas secundárias, o que dificulta seu tratamento. A OMS estima algo em torno de 600 mil a 1 milhão de novos casos no mundo por ano. Por fim, a leishmaniose mucocutânea pode levar à destruição total ou parcial das mucosas do nariz, boca e garganta (MADIGAN et al., 2016; WHO, 2022).

Atualmente, o tratamento da leishmaniose é realizado com antimoniato pentavalente e, mais recentemente, com anfotericina B. Dentre os efeitos colaterais desses medicamentos, é possível citar insuficiência renal, cardíaca e hepática. O tratamento pode também ser acompanhado pela prescrição de antibióticos para controle das infecções bacterianas secundárias (BRASIL, 2011).

Quando realizada busca na plataforma Scopus Elsevier, utilizando-se as palavras-chave “rhamnolipid e parasites” ou “rhamnolipid e leishmania”, sem delimitação de intervalo de tempo, foram encontrados apenas 2 trabalhos para cada combinação pesquisada. O que ilustra a falta de estudos envolvendo a ação leishmanicida do RL, além de seu ineditismo.

Apesar de não existirem muitos trabalhos que estudem o efeito direto de biossurfactantes sobre parasitas, alguns autores têm explorado seu efeito sobre larvas e pupas de mosquito (FALQUETO et al., 2021; PARTHIPAN et al., 2018; PRABAKARAN et al., 2015; SABARINATHAN et al., 2021). Uma vez que muitos parasitas se utilizam de mosquitos como vetores em seu ciclo de vida, controlar a população destes através do uso do RL, seria também uma forma de reduzir a disseminação dessas doenças (SABARINTHAN et al., 2021).

3. **OBJETIVOS**

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade e o potencial leishmanicida do Ramnolipídeo

3.2. Objetivos específicos

- Avaliação da citotoxicidade do RL frente a queratinócitos humanos
- Avaliação do efeito do RL na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio em queratinócitos humanas
- Avaliação do potencial do RL como agente leishmanicida frente a cepas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*

4. METODOLOGIA

4.1. Ramnolipídeo

Para esse trabalho foi utilizado o Ramnolipídeo Comercial (AGAE Technologies) com 90% de pureza.

4.2. Citotoxicidade do RL em células humanas

Para os testes de determinação da citotoxicidade do RL foi utilizada uma linhagem de queratinócitos humanos (HaCat) adquirida através do Banco de Células do Rio de Janeiro. Os testes foram realizados no Laboratório de Investigação Endócrino Metabólica (LIEM) da UFSCar.

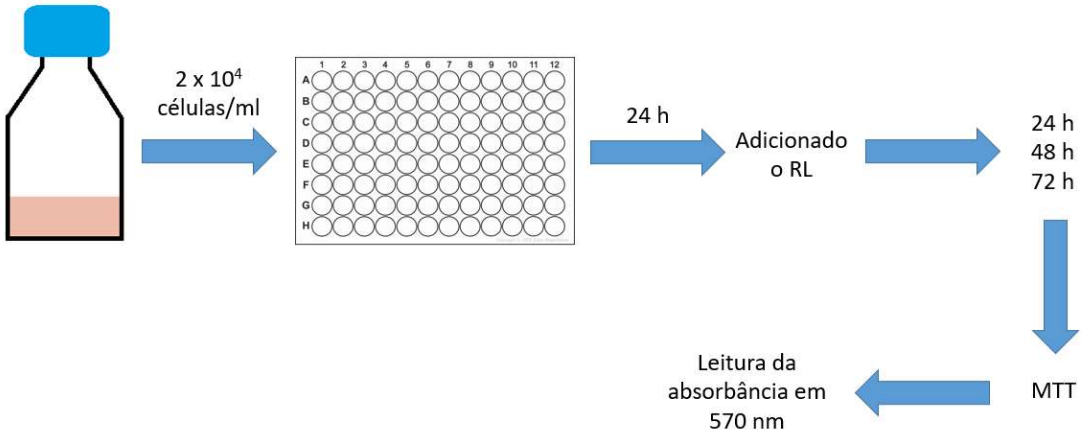
A expansão da linhagem HaCaT foi realizada em meio Gibco Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) suplementado com 10% de SFB, (HyClone, Thermo Scientific, EUA), 2,2 g/l de tampão Hepes (Sigma-Aldrich, EUA), 2 g/l de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA). A linhagem foi mantida em criotubos em nitrogênio a -196 ºC até o momento do uso. Para o descongelamento e ativação das células, a suspensão do criotubo foi transferida para um tubo de 15 ml (BD, EUA) contendo 9 ml de meio de cultura e foi centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O pellet foi então ressuspenso em meio de cultura e transferido para o frasco T (Greiner, EUA) de 75 cm^2. As células foram mantidas em incubadora a 37 ºC e 5% de CO_2 até atingir a confluência (preencher os espaços vazios da garrafa) de 80%. A partir daí, iniciou-se a expansão das células.

Para esta expansão foram necessárias cinco passagens, que consistiram em retirar o meio de cultura da garrafa, lavar a garrafa com as células aderidas com uma solução de PBS estéril e adicionar 4 ml de enzima Tryple (Gibco, EUA) por 7 minutos em incubadora para que as células possam desaderir do frasco. Após esta etapa, foram adicionados 12 ml de meio de cultura para parar a ação da enzima. O conteúdo do frasco T foi então novamente centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Finalmente, as células foram ressuspensas em meio de cultura e transferidas para outros frascos T até atingir a quantidade de células necessária para a realização dos testes.

Para os testes de proliferação celular, o RL foi diluído em meio de cultura e as concentrações finais testadas variaram de 0,098 mg/ml a 1,56 mg/ml.

Foram inoculadas $2x10^4$ células/ml em placas de 96 poços (KASVI, BRA), mantidas em meio de cultivo e incubadas por 24 horas para aderência celular. Após este período, foram adicionados 100 µl das diluições dos compostos aos poços. As placas foram mantidas em estufa a 37 ºC e 5% CO_2, por 24, 48 e 72 horas e após cada período, foi utilizado o método colorimétrico pelo 3- (4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) para quantificação das células metabolicamente ativas. Após a adição do MTT nas placas, aguardou-se 4 horas e, após o período de incubação, foi adicionada a solução de solubilização e realizada a leitura da absorbância em leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983). A figura 2 mostra de forma esquemática o protocolo acima descrito.

Figura 2: Representação esquemática do protocolo para determinação da Citotoxicidade do RL em células humanas.



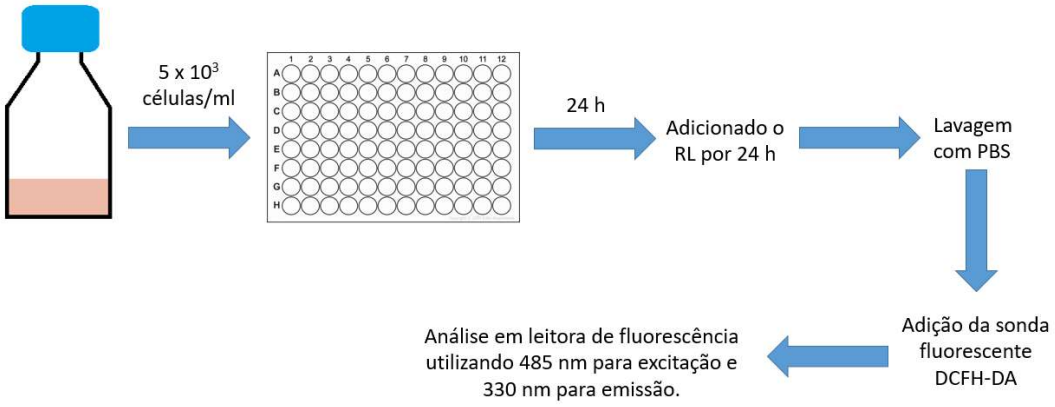
Fonte: Autoria própria.

4.3. Efeito do RL na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Com o objetivo de avaliar o efeito do RL na produção das ROS em células humanas, foi utilizada a sonda fluorescente DCFH-DA (2',7'-

Diclorodiidrofluoresceína Diacetato) (Sigma-Aldrich) (WAN; MYUNG; LAU, 1993). Para a realização destes testes foi utilizada a linhagem HaCaT exposta ao RL em concentrações variando de 0,098 mg/ml a 1,56 mg/ml. O meio de cultura utilizado, bem como os procedimentos de descongelamento e expansão celular foram realizados conforme descrito no item 4.2. Foram utilizadas placas de 96 poços pretas com fundo transparente, onde $5x10^3$ células de queratinócitos foram adicionados em cada poço. Após um período de 24 h incubados a 37 ºC e 5% CO_2 para que ocorresse adesão celular, o meio de cultura foi removido e as células expostas ao RL por um período de 24 h. Na sequência, os poços foram lavados com PBS por 2x e foram adicionados 100 µl da sonda DCFH-DA diluído em meio DMEM sem fenol e protegido da luz por 30 minutos. Finalmente, os poços foram lavados novamente com PBS e adicionados 100 µl de PBS em cada poço para leitura. A análise foi feita em leitora de fluorescência para microplacas (Spectra MAX i3 (Molecular Devices) utilizando 485 nm para excitação e 330 nm para emissão (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática do protocolo para avaliação Efeito do RL na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).



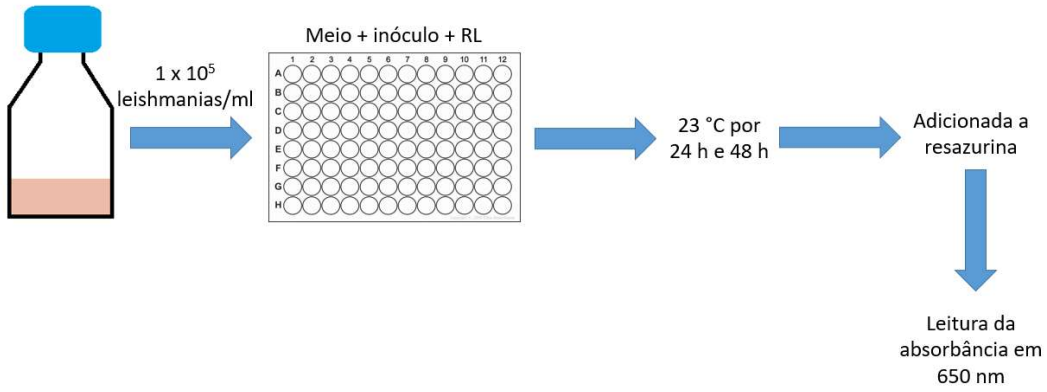
Fonte: Autoria própria.

4.4. Atividade leishmanicida do RL

As cepas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* sensíveis a óxido nítrico (NO), foram cedidas pelo Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os testes de atividade leishmanicida foram realizados em parceria com o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), do DMP da UFSCar.

Para crescimento da cepa de *Leishmania*, foi utilizado o meio de cultura 199 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (LGC, BR), 5% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Gibco, EUA) e 100 mg/l de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram cultivadas em frascos T para cultura celular (Kasvi, BR) de 75 cm^2, onde foram adicionados 5 ml de meio suplementado e as cepas de *L. infantum chagasi*. O frasco T foi então acondicionado em local escuro à 23 °C e o crescimento celular e viabilidade foram avaliados pela contagem com o corante vital Tripan Blue (Sigma-Aldrich, EUA) e pela observação em microscópio durante o tempo necessário para a troca do meio e passagens até atingir a quantidade celular desejada. A concentração celular utilizada foi de $1x10^5$ células/ml. Para a montagem da placa de 96 poços, 100 µl de meio 199 foram adicionados em todos os poços seguida da adição de 100 µl de RL na concentração de 50 mg/ml nos poços da primeira fileira. O RL foi previamente diluído em meio 199 e esterilizado em filtro 0,22 µm. Na sequência, foi realizada uma diluição seriada, transferindo 100 µl do conteúdo da coluna anterior para a coluna seguinte. Para o controle positivo, foram adicionados apenas 100 µl de meio 199 e *Leishmania* e para o controle negativo utilizou-se hipoclorito de sódio a 3%. As placas foram então incubadas a 23 °C (SIFAOUI et al., 2014) por 24 e 48 horas. Após o primeiro período de 24 horas, 20 µl do corante resazurina diluído em PBS na concentração de 1,5 mM foram adicionados em cada um dos poços da placa. O mesmo procedimento foi realizado com a segunda placa após 48 horas. As placas foram mantidas em recipiente de alumínio protegido da luz com a concentração de CO_2 mantida entre 5 e 10% com o auxílio de uma vela. A leitura da absorbância das placas foi feita utilizando um espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 650 nm (Figura 4). Este ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 4: Representação esquemática do protocolo para determinação da atividade leishmanicida do RL.



Fonte: Autoria própria.

4.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três repetições independentes. A análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias foram realizados com o auxílio do software OriginPro, versão 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Citotoxicidade do RL em células humanas

Para a realização dos testes de citotoxicidade foi utilizada uma linhagem de queratinócitos, que constituem o principal tipo celular presente na pele humana. A pele atua como uma barreira entre o organismo e o meio externo, protegendo-o de diferentes tipos de estresse. Trata-se, portanto, de um tipo celular relativamente robusto, que responde e resiste a diversos tipos de estímulos. No entanto, quando o dano sofrido por essas células não é passível de resolução, elas são eliminadas com o objetivo de restaurar a barreira epidérmica (SILVA, R.A., 2013).

As células foram então submetidas à presença do RL por 24 h, 48 h e 72 h. De forma geral, é possível observar que a ação do RL é dose e tempo dependente, sendo que a condição que causou maior morte celular (em torno de 70%) foi a concentração de 1,56 mg/ml de RL por 72 h (Figura 5). É possível também observar que a concentração de 0,098 mg/ml manteve a viabilidade celular em torno de 80% durante todo o tempo do experimento. Esse fato se faz interessante quando notamos que 0,098 mg/ml é o valor de inibição para a maioria das linhagens de *B. cereus* testadas no capítulo 1, podendo algumas vezes, inclusive, ser a concentração bactericida. Idealmente se espera que um composto antimicrobiano apresente concentração efetiva baixa frente ao organismo-alvo, e ausência de toxicidade para células humanas.

Stipcevic, Piljac e Isseroff (2005) estudaram o efeito do di-RL em queratinócitos por 2 semanas e determinaram que a concentração de 200 µg/ml de RL em meio com SFB e de 100 µg/ml de RL em meio sem SFB é capaz de gerar efeitos citotóxicos. Além disso, a concentração de 1 mg/ml foi o suficiente para causar rompimento da membrana celular logo após o tratamento com o surfactante.

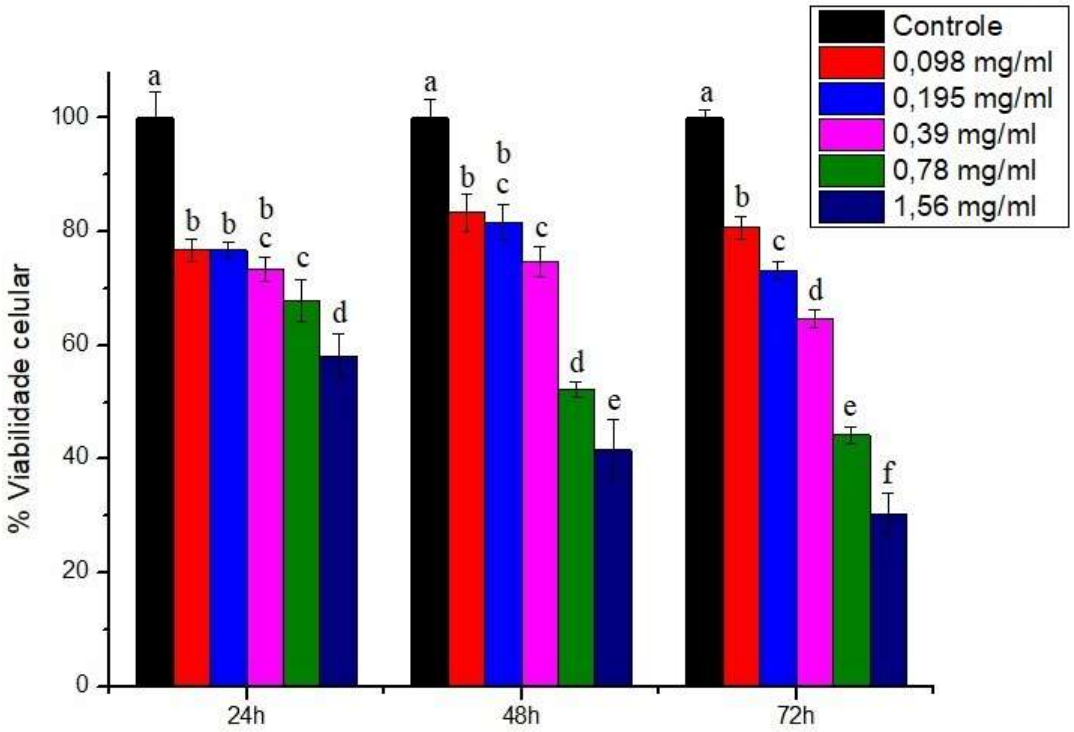
Giugliano et al. (2021) também observaram uma redução significativa da viabilidade celular de queratinóticos com 100 µg/ml e 200 µg/ml de RL, com viabilidades em torno de 45% e 20%, respectivamente.

Maragon et al. (2020) testaram a toxicidade de nanopartículas de RL em células de cordão umbilical e observaram que as mesmas eram tóxicas a partir da concentração de 150 µg/ml. Os autores então combinaram RL com quitosana em nanopartículas o que reduziu a citotoxicidade das mesmas.

É interessante notar que o RL utilizado nesse trabalho apresentou valores significantemente maiores (ordem de mg/ml) para toxicidade do que outros trabalhos

da literatura (ordem de µg/ml). Além das diferenças esperadas devido á diferenças entre as linhagens utilizadas, como tempo de cultivo, tempo de exposição à droga, fonte de isolamento e meio de cultura utilizado, é importante notar também que existem diferenças entre os biossurfactantes testados. Por se tratar de produtos naturais, é esperado que ocorram diferenças devido ao microrganismo produtor, lotes de produção, meio de cultura e tempo de cultivo utilizado; o que dificulta a comparação dos resultados.

Figura 5: Viabilidade celular de queratinócitos após exposição ao RL por 24 h, 48 h e 72 h. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).



Fonte: Autoria própria.

Foi relatado também que o surfactante pode atuar "enganando a resposta imune inata do organismo" para favorecer a infecção por *P. aeruginosa*, especialmente em lesões na pele (DÖSSEL et al., 2012). Os autores estudaram como a presença de RL é capaz de "atrapalhar" a resposta contra patógenos, diminuindo a expressão da beta-defensina 2 (hDB-2), proteína antibacteriana secretada pelas células

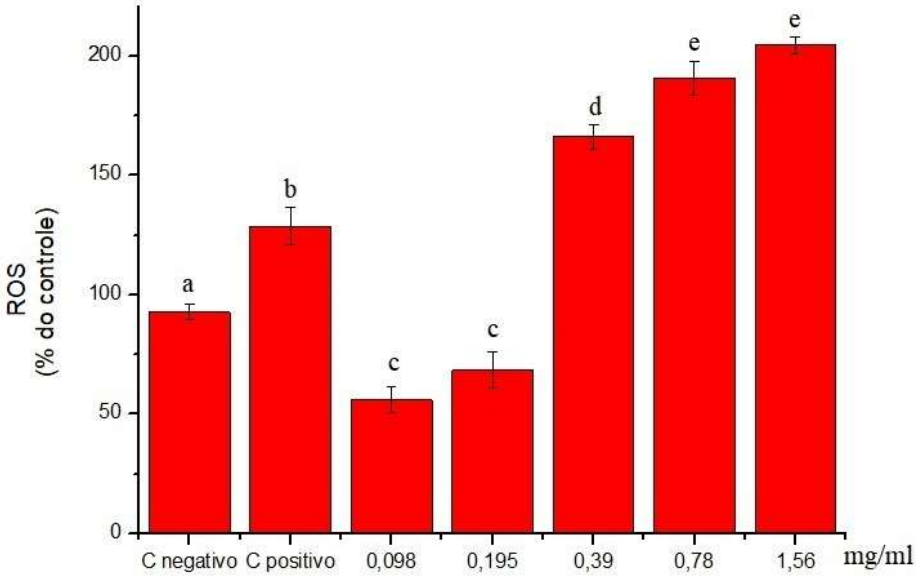
humanas epiteliais em resposta à presença de bactérias flageladas. O grupo sugere que o RL dificulta a ativação das vias reguladas por cálcio e da proteína kinase C no interior das células, o que então bloqueia a ação da hDB-2, facilitando a colonização inicial do ferimento por *P. aeruginosa* (DÖSSEL et al., 2012).

5.2. Efeito do RL na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) faz parte da resposta imune inata do corpo humano contra vírus e bactérias. No entanto, quando ocorre uma produção excessiva desses compostos, as células podem sofrer com stress oxidativo (GÓRSKI et al., 2012), o que levaria à danos no seu DNA e perda da integridade de sua membrana nuclear (ALLEN, 2016). Não sendo possível corrigir esses danos nas fitas do DNA, acontece a morte celular (PONATH; KAINA, 2017).

Dessa forma, avaliar a quantidade de ROS gerada a partir da ação do RL pode auxiliar na compreensão de como as células reagem em contato com esse composto. A figura a seguir (Figura 6) ilustra a quantidade de ROS produzida em comparação ao controle pelos queratinócitos após exposição ao RL.

Figura 6: Produção de espécies reativas de oxigênio pela ação do RL em queratinócitos. Tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).



Fonte: Autoria própria.

Na figura 6 é possível observar a diferença nas taxas de produção de ROS de acordo com a concentração de RL em relação ao controle negativo (meio e células). O controle negativo mostra a quantidade de ROS que as células produzem durante seu crescimento normal, no entanto, as concentrações de 0,098 e 0,195 mg/ml de RL mostraram valores significativamente menores que o controle. Isso se deve provavelmente ao fato da presença de RL ter reduzido a velocidade de crescimento dos queratinócitos. Quando avalia-se as concentrações maiores que 0,39 mg/ml de RL, é possível observar que os valores de ROS quase dobraram em relação ao controle negativo; sendo significativamente maiores inclusive que o controle positivo (meio, células e peróxido de hidrogênio).

Rahimi et al. (2019), demostraram que, após o tratamento com RL, células de câncer de mama passam a expressar o gene p53, sugerindo início de apoptose. Entre os eventos que podem desencadear a expressão aumentada de p53, é possível citar os danos à molécula de DNA (MAYA et al., 2001).

Stipcevic, Piljac e Isseroff (2005), também estudaram o efeito promovido pelo RL sobre queratinócitos e fibroblastos sendo que, na presença de RL, a atividade das proteínas caspases aumentou de forma significativa, o que indica novamente que as células estão entrando no processo de morte programada (apoptose).

Outros autores também relataram que o RL é capaz de aumentar a produção de ROS em outros organismos, como na bactéria *S. aureus* (CHANDANKERE et al., 2020) e na planta *Arabidopsis thaliana* (LUZURIAGA-LOAIZA et al., 2018).

5.3. Atividade leishmanicida do RL

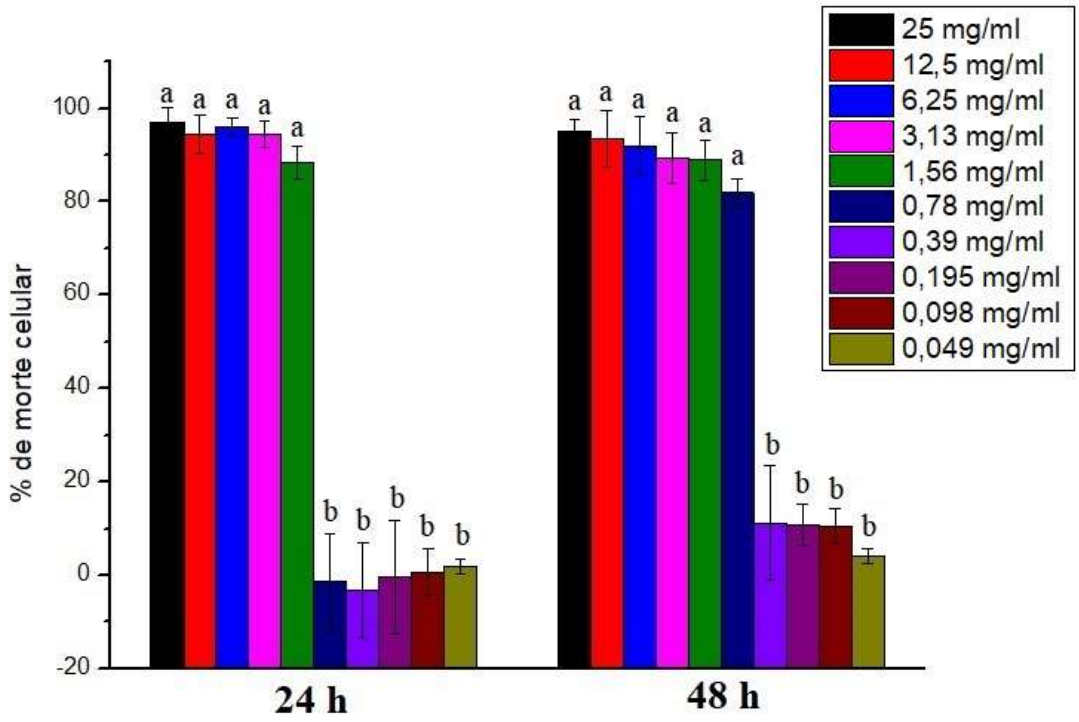
A atividade leishmanicida do RL foi avaliada contra formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* (Figura 7).

Após exposição de 24 horas, foi possível observar que concentrações acima de 1,56 mg/ml de RL foram capazes de eliminar mais de 88% das leishmanias da amostra, chegando ao máximo de 97% de morte celular na concentração de 25 mg/ml. Já para 48 horas de exposição, observou-se 82% de morte celular com concentrações acima de 0,78 mg/ml; atingindo máximo de 95% de morte com 25 mg/ml (Figura 7). Com o aumento do período de exposição, de 24 h para 48 h, foi possível reduzir pela

metade a concentração de RL necessária para obter percentual considerável de morte celular.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que analisam a atividade leishmanicida do RL, no entanto, o uso do RL já foi explorado como veículo para entrega de medicamentos contra leishmaniose (DRAGALZEW et al., 2017), assim como outros surfactantes.

Figura 7: Atividade leishmanicida do RL após 24 e 48 horas de exposição. Para cada tempo de exposição, tratamentos com letras idênticas não apresentaram diferença estatística significante ($P < 0.05$).



Fonte: Autoria própria.

Vesículas contendo o surfactante não iônico estibogluconato de sódio e o medicamento anfotericina B foram utilizadas com o objetivo de aumentar a concentração do medicamento em seu local de ação diminuindo seus efeitos colaterais. Os autores também relataram que esta forma de administração da droga potencializou a redução de parasitas presentes do fígado (ALSAADI et al., 2012). É possível especular que a combinação de RL e anfotericina B também traria resultados

promissores, uma vez que os resultados aqui apresentados sugerem que o RL possui atividade leishmanicida. Uma vez combinados, seria possível então diminuir a dosagem desse medicamento, reduzindo assim seus efeitos colaterais.

Surfacen®, um surfactante natural utilizado para tratamento de recém-nascidos com Síndrome do desconforto respiratório agudo, demonstrou atividade contra formas amastigotas de leishmania presente no interior de macrófagos com IC_{50} de 17,9 µg/ml. O surfactante foi capaz de reduzir a porcentagem de macrófagos infectados nas amostras e o número de amastigotas por macrófago, no entanto, o mesmo não apresentou atividade contra a forma promastigota do parasita (BLANCO et al., 2011). A proteína surfactante A também teve sua atividade leishmanicida testada contra as formas promastigotas e amastigotas, com IC_{50} de 34 e 33,6 µg/ml respectivamente (LUGONES et al., 2012).

Quando comparados aos valores de citotoxicidade, é possível observar que as leishmanias (Figura 7) foram mais afetadas pela presença de RL que os queratinócitos (Figura 5), sendo que, em 24 h, a concentração de 1,56 mg/ml eliminou 88% dos parasitas com 20% de morte celular. Para os testes realizados com 48 h de exposição com 0,78 mg/ml de RL, houve 80% redução na população de parasitas e 48% de redução de queratinócitos.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nesse capítulo foram avaliados os efeitos citotóxicos e o potencial leishmanicida do Ramnolipídeo.

O efeito citotóxico do RL se mostrou dose e tempo dependente, sendo que presença de RL foi capaz de reduzir a viabilidade celular de queratinócitos a partir de 24 h de exposição ao biosurfactante. No entanto, valores expressivos de morte celular somente foram observados com altas concentrações de RL e maior tempo de exposição.

Em altas concentrações, o RL também induziu significativamente a produção de ROS nas células, fato que pode ter causado danos ao seu DNA, o que contribuiu para seu maior efeito citotóxico.

Quando comparados aos valores de inibição obtidos para a bactéria *B. cereus* (CIM de 0,098 mg/ml) é possível observar que, mesmo tendo possivelmente reduzido a velocidade de crescimento dos queratinócitos, essa concentração não foi proibitiva para as células animais.

Os testes com leishmania também mostraram uma resposta tempo dependente, com a concentração tóxica sendo reduzida pela metade com aumento do tempo de exposição. Quando comparados aos valores de citotoxicidade, é possível observar que as leishmanias foram mais sensíveis à presença de RL do que os queratinócitos.

Em nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo referente a utilização de RL para controle de formas promastigostas de leishmania. A escassez de trabalhos dedicados a este tema, juntamente com os resultados de atividade leishmanicida aqui descritos, ilustram o potencial deste biossurfactante para desenvolvimento de alternativas ao tratamento da leishmaniose. No entanto, mais testes são necessários para determinar se o RL também possui ação contra as formas amastigotas, além de capacidade para penetrar nos macrófagos infectados e eliminar o parasita.

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.

ALLEN, L. A. H. **Microbicidal mechanisms. encyclopedia of cell biology**. New York: Elsevier, 2016. v. 2.

ALSAADI, M. et al. The efficacy of aerosol treatment with non-ionic surfactant vesicles containing amphotericin B in rodent models of leishmaniasis and pulmonary aspergillosis infection. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 3, p. 685–691, 2012.

ASLANTÜRK, Ö. S. In Vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In: LARRAMENDY, M.; SOLONESKI, S. (Ed.). **Genotoxicity** - a predictable risk to our actual world. Deutschland: bOd – Books on Demand, 2018. p. 1–18.

BLANCO, O. et al. Actividad in vitro de surfactante pulmonar clínico Surfacen® frente a Leishmania amazonensis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 4, p. 235–238, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasilia: MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Leishmaniose visceral** - recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília: MS, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. 2020. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/leishimaniasis/index.html. Acesso em: 8 jan. 2022.

CHANDANKERE, R. et al. Conversion of agroindustrial wastes to rhamnolipid by enterobacter sp. UJS-RC and its role against biofilm-forming foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 52, p. 15478–15489, 2020.

COSTA, C. H. N. et al. Is Severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? - A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010.

DÖSSEL, J. et al. Pseudomonas aeruginosa -derived rhamnolipids subvert the host innate immune response through manipulation of the human beta-defensin-2 expression. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 1364–1375, May 2012.

DRAGALZEW, A. C. et al. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo ramnolipídio para a incorporação de ciclopaladados para o estudo frente a Leishamania amazonensis. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 38, 2017.

FALQUETO, S. A. et al. Bacillus spp. metabolites are effective in eradicating Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 179, Fev. 2021. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107525.

GAUR, V. K. et al. Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: an overview. **Bioresource Technology**, v. 343, Jan. 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059.

GIUGLIANO, R. et al. Antiviral activity of the rhamnolipids mixture from the antarctic bacterium pseudomonas gessardii M15 against herpes simplex viruses and coronaviruses. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, Dec. 2021. DOI: 103390/pharmaceutics13122121.

GÓRSKI, A. et al. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. **Advances in Virus Research**, v. 83, p.41-71, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5.

JIANG, L. et al. Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10187–10196, 2014.

LAN, G. et al. Rhamnolipid production from waste cooking oil using pseudomonas SWP-4. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 44–54, 2015.

LOTFABAD, T. B.; SHAHCHERAGHI, F.; SHOORAJ, F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous pseudomonas aeruginosa strains. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 29–35, 2013.

LUGONES, Y. et al. In vitro activity of Surfactant Protein A against Leishmania amazonensis. **Biotecnología Aplicada**, n. 29, p. 35–37, 2012.

LUZURIAGA-LOAIZA, W. P. et al. Synthetic Rhamnolipid Bolaforms trigger an innate immune response in Arabidopsis thaliana. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

MADALOSSO, G. et al. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012. DOI: https://doi.org/10.1155/2012/281572.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de brock**. 14.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

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.

MAYA, R. et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. **Genes & Development**, v. 15, n.9, p. 1067–1077, 2001. DOI: 10.1101/gad886901.

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

NDLOVU, T. et al. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by bacillus amyloliquefaciens and Pseudomonas aeruginosa isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express**, v. 7, n. 1, May 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0363-8.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 252–259, 2007.

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.

NUNES, C. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 131–133, May 2010.

NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4 +CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–817, Apr. 2007.

PARTHIPAN, P. et al. Biosurfactants produced by bacillus subtilis A1 and pseudomonas stutzeri NA3 reduce longevity and fecundity of anopheles stephensi and show high toxicity against young instars. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10471–10481, 2018.

PÉREZ-ARMENDÁRIZ, B. et al. Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using Pseudomonas aeruginosa. **AMB Express**, v. 9, May 2019. DOI: https://doi.or/10.1186/s13568-019-0784-7.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-α+ monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to leishmania chagasi infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 124–132, Oct. 2006.

PONATH, V.; KAINA, B. Death of monocytes through oxidative burst of macrophages and neutrophils: killing in trans. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2017.

PRABAKARAN, G. et al. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from pseudomonas fluorescens (VCRC B426). **Acta Tropica**, v. 148, p. 24–31, 2015.

RAHIMI, K. et al. Cytotoxic effects of mono- and di-rhamnolipids from pseudomonas aeruginosa MR01 on MCF-7 human breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B**: Biointerfaces, v. 181, p. 943–952, Feb. 2019.

SABARINATHAN, D. et al. Characterization and application of rhamnolipid from pseudomonas plecoglossicida BP03. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 251–262, 2021.

SIFAOUI, I. et al. Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of leishmania species and their correlation with the antioxidant activity. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 106–111, 2014.

SILVA, L. C. et al. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 2, p. 133–143, Apr. 2013.

SILVA, R. A. et al. Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares. **Saúde em Revista**, v. 13, n. 35, 2013.

SLATER, K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 70–74, 2001.

STIPCEVIC, T.; PILJAC, T.; ISSEROFF, R. R. Di-rhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa displays differential effects on human keratinocyte and fibroblast cultures. **Journal of Dermatological Science**, v. 40, n. 2, p. 141–143, 2005.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2018.

WAN, C. P.; MYUNG, E.; LAU, B. H. S. An Automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 159, n. 1–2, p. 131–138, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 8 jan. 2022.

ZELEDÓN, R. A. Hemoflagellates. In: BARON, S. (Ed.). **Medical microbiology**. 4thed. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996.