

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**HEITOR SUYAMA
MICHEL ZAMPIERI FIDELIS**

**EFEITO DE BIOSSURFACTANTES NA ADESÃO DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM SUPERFÍCIE DE FILMES FLEXÍVEIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

**PONTA GROSSA
2016**

**HEITOR SUYAMA
MICHEL ZAMPIERI FIDELIS**

**EFEITO DE BIOSURFACTANTES NA ADESÃO DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM SUPERFÍCIE DE FILMES FLEXÍVEIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCCII do Curso de Engenharia Química do Departamento Acadêmico de Engenharia Química - DAENQ - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Milléo Almeida

**PONTA GROSSA
2016**



TERMO DE APROVAÇÃO

Efeito de biossurfactantes na adesão de bactérias patogênicas em superfície de filmes flexíveis

por

Heitor Suyama

Michel Zampieri Fidelis

Monografia apresentada no dia 06 de junho de 2016 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Efeito de biossurfactantes na adesão de bactérias patogênicas em superfície de filmes flexíveis:

Prof. Dr. Cesar Arthur Martins Chornobai
(UTFPR-PG)

Prof. Dr. Giovana de Arruda Moura Pietrowski
(UTFPR-PG)

Profa. Dra. Denise Milleo Almeida
(UTFPR-PG)
Orientador

Profa. Dra. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

RESUMO

Na indústria de alimentos há uma grande preocupação com contaminação de alimentos por bactérias, já que pequenas brechas podem levar a exposição e consequente contaminação da produção. As bactérias uma vez que encontram uma superfície adequada podem se fixar e começar a formação de biofilme bacteriano. Uma vez formado o biofilme, sua remoção se torna difícil. Para que isto não ocorra podem ser utilizadas algumas substâncias antimicrobianas com o intuito de não permitir que esses micro-organismos se fixem na superfície dos filmes flexíveis das embalagens. Duas dessas substâncias são a surfactina e o ramnolípideo que agem quebrando as células bacterianas causando assim a sua morte. A surfactina e o ramnolípideo foram testados para diversos tipos de micro-organismos em superfícies de filmes flexíveis utilizados nas indústrias de alimentos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus Cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*. Foram realizados teste de adesão, teste de caracterização físico química da superfície celular, teste de adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis, aderência em microplacas de poliestireno e a microscopia eletrônica de varredura. Na análise da atividade microbiana a surfactina mostrou melhores resultados do que o ramnolípideo, com exceção para tratamentos em *Staphylococcus aureus* onde o ramnolípideo apresentou maior eficiência, notou-se também que a *Pseudomonas aeruginosa* se mostrou resistente para os dois biossurfactantes não formando nenhum halo de inibição. Os resultados para adesão em superfícies plásticas apontaram que os tratamentos foram altamente efetivos para todos os micro-organismos com exceção da *P. aeruginosa* que apresentou redução na adesão bacteriana menor do que 50%. Na aderência em microplacas de poliestireno a surfactina e o ramnolípideo se mostraram eficientes, mas com o passar do tempo essa eficiência foi diminuindo o que pode apontar uma baixa eficiência em casos onde se necessite um alto tempo de atividade antimicrobiana.

Palavras chaves: Surfactina, ramnolípideos, biofilmes microbianos, filmes flexíveis.

ABSTRACT

In the food industry there is a big concern about food contamination by bacterias, since small breaches can turn into a exposure and consenquently into a production contamination. Once the bacteria finds an adequate surface, it can settle and start the formation of bacterial biofilm. When the biofilm is formed, its removal becomes difficult. To prevent this to happen some antimicrobial substances can be used such as surfactin and rhamnolipid, they act breaking the bacterial cell killing it. Surfactin and rhamnolipid were tested against several microoganisms in different plastics used in the food industry: *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Sthaphylococcus aureus*, *Salmonella sp* and *E. coli*. This way, were realized adhesion tests, physical and chemical cell surface characterization tests, pathogenic microoganisms adhesion in plastics test, polystyrene microplates adhesion test and scanning electron microscopy. The microbial activity test showed that surfactin had better results than rhamnolipid, except for the treatment in *S. aureus* where rhamnolipd were more efficient, in the *P. aeruginosa* treatments there were no inhibition zone that proves its resistance against both surfactin and rhamnolipid. The pathogenic microoganisms adhesion in plastics test showed high efficiency against all microorganism except *P.aeruginosa*, which had less than 50% microbial adhesion reduction. In the polystyrene microplates adhesion test surfactin and ramnolipid showed its efficacy, but in a long-term experimentation the efficient dropped, showing that in cases where long time activity of surfactin and rhamnolipid are needed they will have low efficiency.

Key words: Surfactin, rhamnolipids, bacterial biofilm, flexible films

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- FASES DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	15
FIGURA 2 ETAPAS DE COMBATE AOS BIOFILMES.....	20
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA SURFACTINA.....	24
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS RAMNOLIPÍDEOS	25
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO POLIPROPILENO	28
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO POLIETILENO	29
FIGURA 7 - EXEMPLIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE HALO DE INIBIÇÃO	34
FIGURA 8 - CINÉTICA DE ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM PLACAS DE POLIESTIRENO REVESTIDAS COM SURFACTINA 0,1% E RAMNOLIPÍDEO 0,45%.	48
FIGURA 9 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIPROPILENO, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM SALMONELLA SP.	51
FIGURA 10 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIPROPILENO, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM E. COLI.	53
FIGURA 11 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIPROPILENO, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM P.AERUGINOSA.....	55
FIGURA 12 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIPROPILENO, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM S. AUREUS.....	57
FIGURA 13 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIPROPILENO, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM BACILLUS CEREUS	59
FIGURA 14 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM SALMONELLA SP.....	61
FIGURA 15 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM E.COLI	63
FIGURA 16 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE, TRATADOS COM E SEM BLOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM P. AERUGINOSA.....	65

FIGURA 17 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE, TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM S. AUREUS.....	67
FIGURA 18 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE, TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM B.CEREUS.....	69
FIGURA 19 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (0,05MM),. TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM SALMONELLA SP.....	71
FIGURA 20 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (0,05MM), TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM E. COLI	73
FIGURA 21 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (0,05MM), TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM P. AERUGINOSA.....	75
FIGURA 22 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (0,05MM), TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM S. AUREUS.....	77
FIGURA 23 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FILMES DE POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (0,05MM), TRATADOS COM E SEM BIOSSURFACTANTES, IMPREGNADOS COM B. CEREUS.....	79

LISTA DE TABELAS

QUADRO 1 PRINCIPAIS CLASSES DE BIOSSURFACTANTES E MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES	22
QUADRO 2 FUNÇÕES E CAMPOS DE APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES.....	23
TABELA 3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSSURFACTANTES SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	38
TABELA 4 AFINIDADE DA ADESÃO DE BACTÉRIAS A DIFERENTES SOLVENTES.....	39
TABELA 5 ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FILMES FLEXÍVEIS COM SURFACTINA 0,1%	41
TABELA 6 ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FILMES FLEXÍVEIS COM RAMNOLIPÍDEOS 0,45%.....	42
TABELA 7 PORCENTAGEM MÉDIA DA REDUÇÃO DA ADESÃO BACTERIANA EM FILMES FLEXÍVEIS.....	44

LISTA DE SIGLAS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
MgSO_4	Sulfato de magnésio
ZnSO_4	Sulfato de zinco
MnSO_4	Sulfato de manganês ou manganoso
FeSO_4	Sulfato de ferro ou ferroso
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CoCl_2	Cloreto de cobalto II ou cobaltoso
CuSO_2	Sulfito cúprico
H_3BO_3	Ácido bórico
KMnO_4	Permanganato de potássio
Na_2HPO_4	Fosfato básico de sódio
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
NH_4NO_3	Nitrato de amônio

LISTA DE ABREVIATURAS

nm	Nanômetro
mN L ⁻¹	Micronewtons por litro
mg L ⁻¹	Miligramas por litro
g L ⁻¹	Gramas por litro
Mol L ⁻¹	Mol por litro
mL	Mililitros
µL	Microlitros
cm	Centímetros
EPS	Exopolissacarídeos
UFC	Unidades formadoras de colônia
PCA	Plate Count ágar
UV	Ultra violeta
rpm	Rotações por minuto
MATS	Microbial adhesion to solvents
PVC	Policloreto de vinila
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
PET	Politereftalato de etileno
PS	Poliestireno
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PEAD	Polietileno de alta densidade
MYP	Ágar manitol gema de ovo polimixina
MPE	Material polimérico
EMB	Ágar eosina azul de metileno
SS	Ágar Salmonella-Shigella
PE	Material polimérico extracelular
E. coli	Escherichia coli
B. cereus	Bacillus cereus
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
S. aureus	Staphylococcus aureus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 PROBLEMA	14
1.2 OBJETIVO GERAL	14
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1.4 JUSTIFICATIVA	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 BIOFILMES BACTERIANOS	15
2.2 RESISTÊNCIA E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES	19
2.3 PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILMES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	21
2.4 BIOSURFACTANTES	22
2.4.1 Surfactina	24
2.4.2 RAMNOLÍPÍDEOS	25
2.5 APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE BIOFILMES	26
2.6 MATERIAIS FLEXÍVEIS	27
2.6.1 Polipropileno	27
2.6.2 Polietileno	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA	30
3.2 LOCAL DA PESQUISA	31
3.3 CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES	31
3.4 ORIGEM DOS MICRO-ORGANISMOS	31
3.5 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE	31
3.5.1 Preparo dos inóculos	31
3.5.2 Processo fermentativo para a produção de surfactante	32
3.5.3 Extração de biosurfactante bruto	32
3.6 PREPARAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	32
3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES	33

3.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE CELULAR	34
3.9 PREPARAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES FLEXÍVEIS	35
3.10 APLICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES EM FILMES FLEXÍVEIS	35
3.11 TESTE DE ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FILMES FLEXÍVEIS	35
3.12 ADERÊNCIA EM MICROPLACAS DE POLIESTIRENO.....	36
3.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES	38
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE CELULAR	39
4.3 ANÁLISE DO TESTE DE ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS EM FILMES FLEXÍVEIS.....	40
4.4 ANÁLISE DA ADERÊNCIA EM MICROPLACAS DE POLIESTIRENO.....	45
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	49
5. CONCLUSÃO	80
6. REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são ecossistemas microbiológicos aderidos em diversos tipos de superfícies, produzido por células de micro-organismos que interagem com a superfície e se multiplicam, produzindo colônias que reúnem nutrientes e um envoltório polimérico protetor.

Nas indústrias de alimentos brechas nas etapas de higienização ou ausência delas em equipamentos e/ou embalagens são fontes de contaminação, pelo acúmulo de nutrientes e células microbianas disponíveis, promovendo a formação de biofilmes.

Os biofilmes são resistentes à remoção e sua presença pode ocasionar infecções de grande risco a saúde humana. Desta forma, as indústrias de alimentos procuram manter um rígido controle sobre a aderência dos micro-organismos às superfícies nos processos de fabricação, algumas vezes pela adição de agentes antimicrobianos nos alimentos, equipamentos e embalagens.

De acordo com o órgão norte-americano “*National Institutes of Health*”, aproximadamente 80% das infecções médicas no mundo estão associadas aos biofilmes (NIH, 2007).

Uma alternativa para reduzir a adesão de micro-organismos patogênicos em superfícies são os biossurfactantes, compostos anfipáticos produzidos por micro-organismos, que de modo geral, possuem propriedades antibióticas, hidrofóbicas, alta biodegradabilidade e baixa toxicidade. São produzidos a partir de processos fermentativos utilizando substratos renováveis, o que reduz custos de produção, com atuação em uma ampla faixa de temperatura e pH. Entre os biossurfactantes mais estudados estão a surfactina, produzida por bactérias do gênero *Bacillus* e os ramnolipídeos sintetizados pelas *Pseudomonas*, devido às características de redução da tensão superficial da água e elevada atividade antimicrobiana.

A adesão bacteriana em superfícies abióticas depende da hidrofobicidade e da carga da superfície celular do micro-organismo (colonizador primário). As alterações destas propriedades nas superfícies podem ser proporcionadas pelos biossurfactantes que, aliado as características antibióticas, são os principais responsáveis pela inibição da adesão dos micro-organismos patogênicos em superfícies abióticas.

1.1 PROBLEMA

A utilização dos biossurfactantes como camada protetora antimicrobiana proporciona redução da formação de biofilmes microbianos em filmes flexíveis?

1.2 OBJETIVO GERAL

- Analisar o efeito de biossurfactantes na adesão de bactérias patogênicas em superfície de filmes flexíveis.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biossurfactantes do tipo surfactina e ramnolipídeos a partir de cepas de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da surfactina e do ramnolipídeo.
- Caracterizar a superfície celular dos micro-organismos patogênicos de interesse alimentar, quanto a natureza hidrofóbica ou hidrofílica.
- Avaliar a adesão de micro-organismos patogênicos de interesse alimentar em filmes flexíveis adicionados de biossurfactantes.

1.4 JUSTIFICATIVA

Sendo a maioria das embalagens de alimentos oriundas de materiais poliméricos flexíveis e estes susceptíveis a contaminação por micro-organismos patógenos, surge a necessidade do controle da adesão celular microbiana nestes materiais.

A alternativa apresentada neste estudo está relacionada ao tratamento de materiais poliméricos flexíveis com biossurfactantes, com o propósito de reduzir ou eliminar a formação de biofilmes microbianos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOFILMES BACTERIANOS

A maioria dos micro-organismos não se desenvolvem como células individuais, mas em comunidades formando colônias ou biofilmes, estando presentes em quase todos os ecossistemas naturais (LÓPEZ et al., 2010).

A adesão bacteriana, seja em ambiente abiótico (superfície de plásticos, metais e entre outros) ou biótico (tecidos de animais e vegetais) segue estágios como adesão reversível (ou primária), adesão irreversível, crescimento, maturação e dispersão (Figura 1) (DUNNE, 2002).

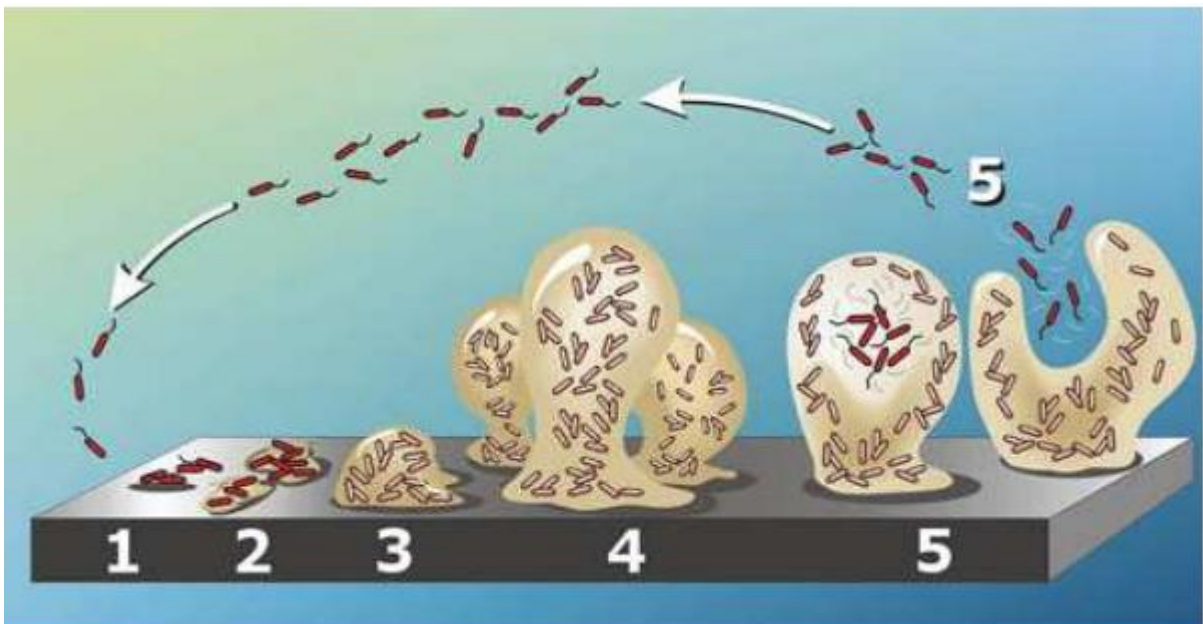


Figura 1- Fases de formação do biofilme

Fonte: (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Nota: 1- Adesão reversível, 2- Adesão irreversível, 3- Crescimento, 4- Maturação, 5- Dispersão.

De modo geral, a adesão de micro-organismos em superfícies envolve a interação de três componentes, como a bactéria, superfície (biótica ou abiótica) e o microambiente em que se encontram.

Araújo e Freire (2013) destacam que em superfícies abióticas o início da ligação bacteriana de vida livre ocorre de forma casual, que pode ser por meio do movimento browniano, força gravitacional, via quimiotaxia, flagelos, cílios ou fímbrias (pili). Estas formas de aproximação das células ao substrato são rápidas e com alta aderência do micro-organismo. Neste estágio inicial há adesão reversível, com interações físico-químicas como forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, forças de Van Der Waals e interações hidrofóbicas (DUNNE, 2002).

Simões et al. (2010) verificaram que com a aproximação da bactéria a uma superfície há o início do desenvolvimento de interações resultantes da atmosfera iônica, que circunda as duas superfícies, substrato e membrana celular. A atração depende da intensidade do potencial elétrico das duas superfícies, da força iônica, da constante dielétrica do meio e da distância entre o micro-organismo e a superfície. Quando a adesão de bactérias atinge a concentração média com comprimento de 1 nm, o final do processo está relacionado a soma de forças de atração ou repulsão entre a bactéria e a superfície abiótica, o que favorece a repulsão, pois a maioria das bactérias e superfícies são carregadas negativamente.

Simões et al. (2010) relatam que as interações hidrofóbicas se mostram mais influentes sobre a adesão primária. Neste início, a repulsão entre duas superfícies pode ser superada por interações do tipo ligações de hidrogênio ou por interações moleculares específicas como o pili e flagelos. O pili tem a função de facilitar a adesão da célula em partículas inorgânicas e em outras células bacterianas, e os flagelos são responsáveis pela movimentação da bactéria, superando as forças repulsivas.

Segundo Chae et al. (2006) a ligação se torna reversível quando a distância entre a célula e a superfície for maior que 50 nm. Em distância próxima de 20 nm, há atuação de forças de Van der Waals e eletrostática (forças de longo alcance) e ligações químicas e interações hidrofóbicas (forças de curto alcance), podendo ser esta fase reversível, mas ao longo do tempo se mostra irreversível. Em distâncias menores que 15 nm outras forças reforçam a adesão, como a produção de polímeros adesivos que conduzem a adesão irreversível, mas vai depender da capacidade do micro-organismos em produzir material polimérico extracelular (MPE).

Após a adesão das bactérias em superfícies abióticas ocorre aumento celular, liberação e detecção de moléculas autoindutoras induzindo a transcrição de genes

específicos que regulam a motilidade, virulência e produção de MPE, que regulam a formação dos biofilmes (KATSIKOIANNI et al., 2004).

Cooper et al. (1999) destacam que o segundo estágio do processo, adesão irreversível, ocorre por mecanismos moleculares de “ancoragem” de apêndices, como flagelo, adesina e pili e, ainda, pelo início da produção de MPE (matriz contendo polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, fosfolipídios e substâncias húmicas), favorecendo o fortalecimento das ligações célula-superfície e a agregação com outras células e seus resíduos, colonizadores secundários, ao biofilme. O ancoramento dos apêndices da bactéria com o substrato inclui ligações covalentes e iônicas, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo.

Estudos apontam que esta segunda etapa do processo de adesão pode iniciar após 20 minutos e até no máximo 4 horas depois do contato. Posterior à etapa de adesão irreversível, se inicia o processo de crescimento (terceiro estágio) e maturação do biofilme (quarto estágio) que, nesta fase, apresenta um aumento da atividade metabólica devido a multiplicação celular, formando micro colônias envoltas de MPE (MEDONLINE, 2015).

No terceiro e quarto estágio ocorre de forma intensa a formação dos biofilmes, onde 97% da matriz tem como composição água e de 2 a 5% são de células microbianas. No entanto, essa concentração pode variar de acordo com o micro-organismo, a temperatura e a disponibilidade de nutrientes (FLEMMING et al. , 2010; OULAHAL et al., 2008).

Na maturação do biofilme, quarto estágio, há aumento da densidade populacional, acentuada produção e deposição de MPE. Com o crescimento da população de micro-organismos, o ambiente no interior do biofilme se torna anaeróbio, promovendo acréscimo na concentração de gases insolúveis e ácidos que enfraquecem a estrutura do biofilme, podendo causar o desprendimento de células de vida livre (BOLES et al., 2005).

No quinto estágio, dispersão do biofilme, há liberação de células livres ou em colônias capazes de contaminar outros ambientes, o que causa grande preocupação na indústria de alimentos, pela possibilidade de deterioração dos alimentos e veiculação de doenças (VERRAN, 2002).

2.1.1 Adesão microbiana em superfícies

As interações hidrofóbicas estão entre as causas de aderência relacionada as estruturas protéicas da parede celular e a superfície (DJORDJEVIC et al., 2002).

Segundo Simões et al. (2010), quanto maior a hidrofobicidade das superfícies envolvidas na produção dos biofilmes, maior será o desenvolvimento deste. No entanto, segundo Chae et al. (2006) a hidrofobicidade e a carga superficial das bactérias podem ser diferentes entre as espécies, linhagens, condições de crescimento, fisiologia celular e meio de cultivo.

Em micro-organismos a hidrofobicidade da parede celular pode estar ligada à adesão, tanto em superfícies hidrofóbicas quanto em superfícies hidrofílicas. As interações hidrofóbicas são as principais forças observadas em superfícies hidrofóbicas e as interações eletrostáticas em superfícies hidrofílicas. As repulsões hidrofílicas e atrações hidrofóbicas estão relacionadas às interações acidobásicas de Lewis e com menor interferência estão às interações de Lifshitz Van der Waals (SOMMER et al., 1999).

Segundo Teixeira et al. (2008) o grau de hidrofobicidade (DG_{iwi}) expressa a energia livre de interação entre dois materiais quando imerso em água. Se a interação entre dois materiais for mais forte do que a interação de cada material com água ($DG_{iwi} < 0$) o material é considerado hidrofóbico, mas se $DG_{iwi} > 0$, o material é hidrofílico. Desta forma, bactérias com altos valores de DG_{iwi} (mais hidrofílicas) são doadoras de elétrons e, bactérias com baixos valores de DG_{iwi} (mais hidrofóbicas/hidrofílicas) são fracas doadoras de elétrons. Normalmente, superfícies hidrofóbicas apresentam baixos valores de ambos os componentes aceptores e doadores de elétrons, podendo ser utilizado para avaliar a adesão microbiana às superfícies.

A temperatura, a composição da parede celular e a fase de vida do micro-organismo, podem influenciar na capacidade hidrofóbica da célula, ou seja, podendo ser aceptora ou doadora de elétrons (CHAVANT et al. 2002).

A hidrofobicidade celular pode afetar a taxa de extensão da adesão microbiana a superfícies, uma vez que interações hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza não polar das superfícies envolvidas no processo de

adesão (SIMÕES et al,2010). Desta maneira, as superfícies hidrofóbicas parecem favorecer a colonização, sugerindo que estas superfícies possam beneficiar a aproximação do micro-organismo pela eliminação da camada de água presente na interface (ZERAİK et al., 2010).

Em superfícies sólidas a taxa de adesão aumenta com a hidrofobicidade da superfície, para grande maioria dos micro-organismos e, ao diminuir a hidrofobicidade da superfície a taxa de adesão de micro-organismos se reduz (NITSCHKE et al., 2009).

Segundo Bellon-Fontaine et al. (1997) a natureza hidrofóbica/hidrofílica da superfície bacteriana pode ser determinada pelo teste Microbial Adhesion to Solventes (MATS), que consiste em avaliar a afinidade das células em um par de solventes polares e apolares. Prokopovich et al. (2009) afirmam que quando a afinidade pelo solvente apolar (acceptor de elétrons) for maior que do solvente polar, a superfície celular apresenta características ácidas, ou seja, hidrofóbicas. Se a afinidade pelo solvente polar (doador de elétrons) for maior que do solvente apolar, a superfície apresenta caráter básico, hidrofílico. Portanto, quanto maior a afinidade pelos solventes apolares, maior será a hidrofobicidade da superfície celular.

2.2 RESISTÊNCIA E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

As bactérias que formam os biofilmes possuem um comportamento coordenado com a formação de estruturas tridimensionais extremamente complexas (BJARNSHOLT et al., 2013).

De acordo com Hall-Stoodley et al. (2009) as bactérias formadoras de biofilmes possuem uma comunicação célula-célula, por meio da secreção de sinais químicos, permitindo respostas fenotípicas às mudanças ambientais, para resistir as condições extremas do meio ambiente.

Djordjevic et al. (2002) relatam que os micro-organismos quando fazem parte de um biofilme se tornam mais resistentes à processos de higienização, do que como células de vida livre. Esse aspecto decorre da dificuldade de difusão das moléculas antimicrobianas através da matriz de biofilme, para conseguir desativar as células encapsuladas. Assim, os materiais poliméricos extracelulares são uma barreira a difusão, influenciando a taxa de transporte de material antimicrobiano para o interior do biofilme. Segundo Trentin et al. (2013) a tática para o combate de

biofilmes pode ser analisada em dois segmentos, como a inibição na formação dos biofilmes e o tratamento para a eliminação dos biofilmes formados. A inibição na formação dos biofilmes pode ocorrer pela barreira a adesão celular a uma superfície ou pelo rompimento da comunicação entre as células do biofilme (Figura 2).

Segundo Davies (2003) outros fatores também podem explicar a baixa suscetibilidade dos biofilmes aos antimicrobianos, como o crescimento lento de células no interior do biofilme, devido ao baixo metabolismo microbiano que ficam na base do biofilme, onde há escassez de oxigênio, garantindo sua resistência, que atuam melhor na fase de logarítmica de crescimento. Outro aspecto está relacionado a falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunológica humana, devido ao MPE que protege da ação de anticorpos e radicais livres.

Testes realizados por Hoyle et al. (1992) demonstraram que células livres eram quinze vezes mais susceptíveis a tobramycim do que células em biofilmes intactos. Em estudo realizado por Suci et al. (1994) foi observado que o ciprofloxin levou vinte e um minutos para penetrar uma superfície contendo biofilmes de *Pseudomonas aeruginosas*.

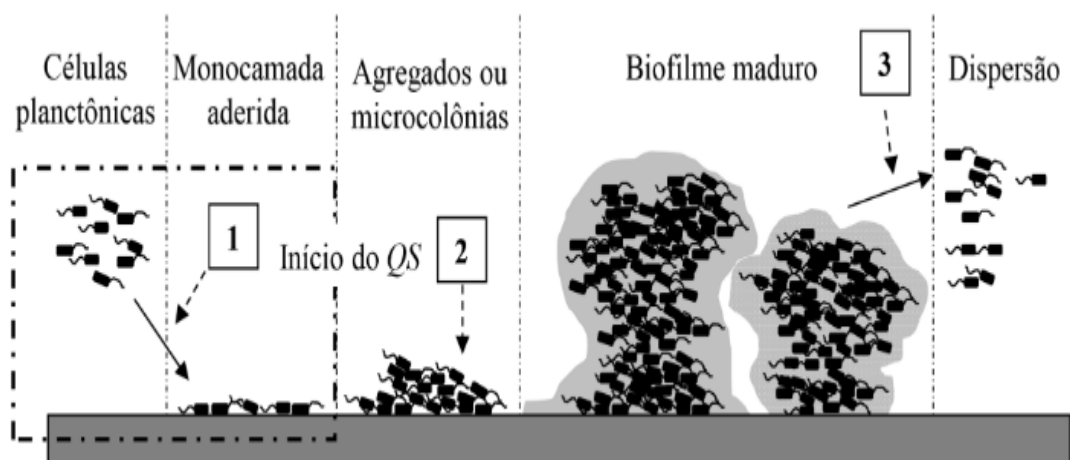


Figura 2 Etapas de combate aos biofilmes

Fonte: Trentin et al.,(2013)

Compostos como os biossurfactantes podem ser utilizados para inibir a adesão microbiana. Eles atuam danificando a membrana plasmática das células a partir da interação com os fosfolípidos dos micro-organismos.

2.3 PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILMES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Micro-organismos deteriorantes podem ser encontrados nas etapas do processamento de alimentos, interferindo na qualidade, causando sua deterioração e colocando em risco a saúde do consumidor (HOOD et al., 1995).

Os principais micro-organismos encontrados nos processos de adesão em equipamentos e embalagens são a *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (NITSCHKE et al., 2002).

Os patógenos alimentares podem ser divididos em dois grupos, os infecciosos (*E.coli*, *Campylobacter sp.* e *Salmonella sp.*) e os intoxicantes (*Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), onde os infecciosos são aqueles que se multiplicam no intestino humano e os intoxicantes liberam toxinas no trato intestinal ou nos alimentos (FORSYTHE, 2013).

Segundo estudo de Stepanovic et al. (2004) a *Salmonella sp.* pode formar biofilmes em filmes flexíveis dependendo da quantidade de nutrientes no meio, ou seja, meios com nutrientes limitantes fazem com que a camada de biofilme desses micro-organismos aumente.

As células de *Staphylococcus sp.* tem certa resistência a antibióticos, assim há uma dificuldade no tratamento de infecções geradas por biofilmes formados em implantes médicos (WALENCKA et al., 2008).

O *Bacillus cereus* pode ser encontrado em baixa concentração nos alimentos, mas altas temperaturas e longo tempo de armazenagem fazem com que este se prolifere até quantidades significativas para contaminação. Uma vez ingeridos podem causar diarreia aquosa, cólicas abdominais, dores, e em alguns casos, náusea, vômitos e cólicas abdominais (FORSYTHE, 2013).

As infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* estão associadas ao ambiente hospitalar e ao alto índice de mortalidade. Possui também alta resistência a antibióticos pois sua membrana externa limita a penetração de pequenas moléculas hidrofílicas e exclui as moléculas maiores (ROCA, 2014).

Pesquisas realizadas por Flach (2006) verificaram maior adesão celular de *Escherichia coli* em pano de algodão, seguido no polipropileno (PP), vidro e aço

inoxidável. A adesão também foi influenciada pelo tempo e pela temperatura, sendo maior com o aumento da temperatura de 10°C para 20°C.

2.4 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana formados por moléculas anfipáticas, apresentando uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção apolar possui uma cadeia hidrocarbonada e a polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera (NITSCHKE et al., 2002).

Os biossurfactantes formam um grupo composto de moléculas com propriedades tensoativas, tendo ampla aplicação industrial, como ação detergente, emulsificante, lubrificante, capacidade espumante e de solubilização e, na dispersão de fases. Podem ser classificados de acordo com sua composição, ou seja, em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos (GEORGIU et al., 1992). Os principais micro-organismos produtores de biossurfactantes estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores

Tipos de biossurfactantes	Micro-organismos
Glicolipídeos	
- Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- Sofrolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Fosfolipídeos	
- Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>

Fonte: Nitschke et al. (2002).

Os biossurfactantes, excretados pelos micro-organismos, consistem em subprodutos metabólicos de algumas bactérias, fungos e leveduras, onde a produção se dá quando há excesso de nutrientes essenciais como carbono e nitrogênio. Uma vez liberados, os biossurfactantes promovem maior competitividade no meio, dificultando a entrada de outros micro-organismos na região delimitada

pelo biossurfactante, ação antimicrobiana e, também, favorecem a difusão de substâncias insolúveis em água para o interior da célula, devido ao caráter hidrofílico e hidrofóbico da sua molécula (WEI et al., 2003; CERQUEIRA, 2007).

A maioria dos biossurfactantes não são corriqueiramente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção, proporcionado pela escolha da fonte de carbono e sua extração do meio fermentativo (NITSCHKE et al., 2003).

Segundo Cooper e Paddock (1999) e Bognolo (1999) os biossurfactantes apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos, como:

- São mais eficientes e efetivos devido a produção de uma menor tensão superficial, com menores concentrações de biossurfactantes.
- Maior estabilidade de pH e temperatura, podendo ser utilizados em locais que apresentam condições restritas.
- Alta biodegradabilidade, o que os torna eficientes para utilização em tratamento de resíduos e, para aumentar a degradação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos ou em processo de biorremediação.

Atualmente os biossurfactantes podem ser utilizados na biorremediação de solos contaminados por derramamento de óleos, na limpeza de reservatórios de óleo, na recuperação melhorada do petróleo, em aplicações terapêuticas como inibidores de formação de coágulos, na agricultura onde entram na formulação de herbicidas e pesticidas, em produtos de higiene e cosméticos e, ainda na indústria de alimentos como emulsificantes (NITSCHKE et al., 2002). O Quadro 2 apresenta algumas funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

Quadro 2 Funções e campos de aplicação dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Emulsionantes e dispersantes	Tintas, cosméticos, biorremediação e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos

Fonte: PIROLLO, 2006.

2.4.1 Surfactina

Como biosurfactante lipoproteico, a surfactina é amplamente estudada devido suas propriedades de redução da tensão superficial. Entre os micro-organismos produtores estão o gênero dos *Bacillus sp.*, que abrangem a surfactina, iturina, fengicina, liquasina, micosubrilsina e a bacilinicina (STELLER et al., 2000).

Arima et al. (1968) constataram a existência de um lipopeptídeo, a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, tendo a tensão superficial da água (20°C) reduzida de 72 para 25 mN/m.

A surfactina contém em sua estrutura 12 a 16 átomos de carbono (Figura 3), sendo um peptídeo cíclico composto de sete aminoácidos (L- aspargina, L- leucina, ácido glutâmico, L- leucina, L- valina e duas D- leucinas). O aminoácido hidrofóbico resíduo de leucina e valina estão localizados nas posições 2,3, 4, 6 e 7, enquanto que os resíduos hidrofílicos glutamilo e aspártico estão nas posições 1 e 5, respectivamente (PEYPOUX et al., 1999).

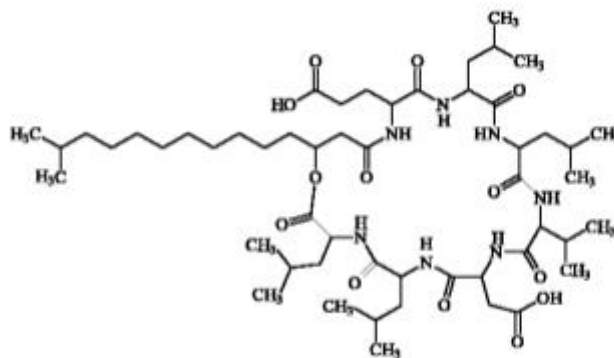


Figura 3 - Estrutura química da surfactina..

Autoria própria, CHEMSKETCH

Fonte: (HALL-STOODLEY et al., 2004).

A surfactina pode ser aplicada em diferentes áreas como a biorremediação de poluentes que aumentam a disponibilidade de compostos hidrofóbicos, pesticidas, alta biodegradabilidade e apresentam propriedades antibacterianas, antibiofilmes, antivirais e antitumorais (WALENCKA et al., 2008).

A atividade antimicrobiana da surfactina está relacionada aos danos que a membrana plasmática de células de outros micro-organismos pode sofrer, onde os oligômeros da surfactina interagem com fosfolipídeos, causando flutuações estruturais sobre a integridade da membrana (NITSCHKE et al., 2002).

2.4.2 Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são glicolipídeos compostos por moléculas de ramnose na sua fração hidrofílica e de ácidos graxos na fração hidrofóbica (Figura 4) (LANG et al., 1999).

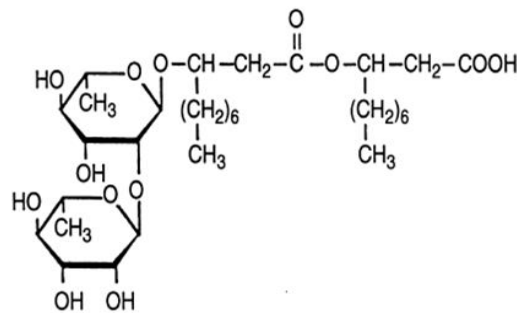


Figura 4 - Estrutura química dos ramnolipídeos

Autoria própria, CHEMSKETCH

Fonte: NITSCHKE et al., 2002

LANG et al. (1999) dizem que o primeiro estudo dos glicolipídeos envolvendo ramnose foi realizado por Jarvis e Johnson em 1949. Os estudos posteriores mostraram serem capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 20 – 30 mN/m em concentrações próximas a 120 mg/L, e, ainda, possuem atividades hemolíticas e antibióticas.

Entre os produtores de ramnolipídeos as *Pseudomonas sp.* se destacam, pela sua alta taxa de produção em diferentes tipos de substratos. Os principais ramnolipídeos secretados pela *Pseudomonas sp.* são o L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e o L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (YAROOD et al., 2004).

Estudos constataram que os ramnolipídeos possuem atividade antiadesiva, inibindo a formação de biofilmes de muitos tipos de bactérias, principalmente as de importância alimentar (ARAUJO et al., 2010).

Stanghellini et al., 1997, observaram que os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* apresentaram atividade antibacteriana contra gêneros de *Pythium*, *Phitophthora* e *Plasmopara*.

2.5 APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE BIOFILMES

Pesquisas indicam que superfícies pré-condicionadas com biossurfactantes são capazes de reduzir notavelmente a contaminação microbiana de materiais e controlar a formação de biofilmes, devido a inibição de adesão à superfície e pela ação antimicrobiana (MEYLHEUC, 2009; NITSCHKE et al., 2007).

Agentes antimicrobianos são substâncias que possuem uma ou mais zonas ativas que estabelecem interações desfavoráveis com estruturas celulares microbianas em sítios-alvo específicos (PEREIRA, 2001).

Mireles et al. (2001) alegaram que a surfactina possui ação antimicrobiana, sendo produzida por *Bacillus subtilis*, não permitindo a formação de biofilmes de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em policloreto de vinila (PVC) e em cateteres polivinílicos.

Dusane et al. (2010) relataram que ramnolipídeos foram capazes de romper quase que totalmente o biofilme de *Bacillus pumilus* em superfície de poliestireno (PS).

Rodrigues et al. (2006) verificaram que a utilização de ramnolipídeos como agente condicionante sobre silicone reduziu a adesão de *Rothiadendo cariosa*, *Streptococcus salivarius* e *Staphylococcus epidermis* em mais de 50%, e a *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Staphylococcus aureus* em mais de 30%.

Irie et al. (2009) mostraram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* teve uma eficiência de mais de 30% na dispersão de biofilmes produzidos por *Bordetella bronchiseptica*.

2.6 MATERIAIS FLEXÍVEIS

O uso de polímeros rígidos e flexíveis nas indústrias de construção civil, automotivas e de embalagens se mostra abrangente e em grandes quantidades. (JORGE, 2013; OLIVEIRA, 1999).

Nas indústrias de embalagens alimentícias a utilização de filmes flexíveis (plásticos) equivale a 30% em peso do total de embalagens produzidas. Estes atendem de maneira eficiente as exigências do consumidor, tanto no acondicionamento e apresentação dos alimentos, quanto no custo que representa ao produto final (OLIVEIRA, 1999; SINO, 1997).

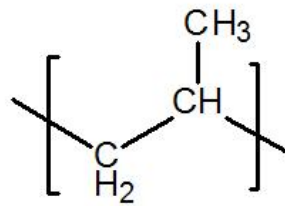
Os tipos de plásticos mais utilizados são os PE, PPs, PS, PVC e os Poliésteres (PET), sendo chamados de commodities devido à grande produção e aplicação destes materiais (ABIPLAST, 2016)

Os polímeros mais empregados na indústria de alimentos variam conforme as propriedades da matéria prima, dos aditivos adicionados e do processo de fabricação. Portanto, podem apresentar características físicas e químicas heterogêneas, como estruturas cristalina, semi-cristalina ou amorfa, dependendo do material e, heterogeneidade da superfície o que favorecem a adesão celular (ARAUJO et al., 2010).

Segundo Darouiche et al. (2009) alguns tipos de plásticos favorecem maior adesão de micro-organismos, como o PVC sobre o teflon, o PE sobre o poliuretano, o látex sobre o silicone, o silicone sobre o politetrafluoretileno (PTFE) e o aço inoxidável sobre o titânio. Segundo Holah et al. (1990), superfícies plásticas são favoráveis à adesão de micro-organismos devido à porosidade do material.

2.6.1 Polipropileno

O polipropileno considerado como termoplástico e semi-cristalino exibe boa resistência a rupturas e propriedades elétricas, porém sua grande característica está na inércia química, além de ser o mais leve de todos os plásticos (SPIETH, 1991). De acordo com a norma DIN D52715 sua absorção de água é $< 0,03\%$, caracterizado como uma baixíssima absorção. A estrutura química do PP está apresentada na Figura 5.



PP (polipropileno)

Figura 5 - Estrutura química do polipropileno

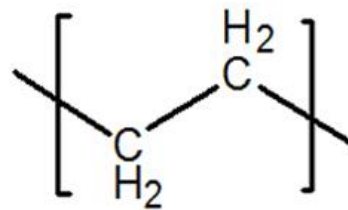
Fonte: SARANTÓPOULOS, 2002

As principais aplicações do PP, nas indústrias de embalagens ocorrem como filmes termoprocessáveis para uso em micro-ondas, filmes termo retráteis que se moldam ao produto quando aquecidos e, embalagens para alimentos sensíveis a umidade, como produtos desidratados e biscoitos (JORGE, 2013).

De maneira análoga aos polímeros sintéticos, o PP possui energia livre superficial baixa e interage com outros resíduos através de ligações de baixa energia (MANO et al., 1999). Esta característica mostra uma reduzida capacidade de formação de biofilmes, sendo um material indicado como embalagens de alimentos (COMYN, 1990).

2.6.2 Polietileno

O polietileno considerado como polímero flexível, parcialmente cristalino, se mostra inerte para a maioria dos produtos químicos comuns e não são tóxicos. Podem ser classificados como PEs ramificados ou lineares e sua estrutura química está apresentada na Figura 6. Devido as suas características, o PE tem sido amplamente usado na indústrias alimentícia e de fármacos (COUTINHO et al., 2003).



PE (polietileno)

Figura 6 - Estrutura química do polietileno

Fonte: SARANTÓPOULOS, 2002

Os tipos de PE mais utilizados são o PE de baixa densidade e o de alta densidade. Os PEs de baixa densidade (PEBD) são obtidos em altas condições de temperatura (100 a 300°C) e pressão (1000 a 3000atm), pela adição de um iniciador. Devido às características de produção a cadeia do PE se torna altamente ramificada, diminuindo assim a cristalinidade e a densidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

O PEBD se mostra flexível, transparente quando usado em filmes finos, possui permeabilidade a gorduras e óleos, apresenta boa resistência a perfuração e tração, mas tem alta permeabilidade a gases (JORGE, 2013), tendo maior solubilidade em solventes orgânicos apolares (COUTINHO et al. 2003)

Os PEs de alta densidade (PEAD) são obtidos em baixas condições de temperatura (abaixo de 100°C) e pressão (10 a 15 ATM), devido a inserção de catalisadores no meio. O polímero se forma com poucas ramificações, o que o torna mais cristalino e denso (COUTINHO et al., 2003). O PEAD não apresenta solubilidade em nenhum solvente conhecido e possui baixa permeabilidade a gases e a água (JORGE, 2013). Comparado com o PEBD, o PEAD possui menor transparência, maior resistência química, menor permeabilidade ao oxigênio e a água e, ainda, menor flexibilidade (JORGE, 2013).

No geral, o PE pode ser usado em forma de filmes e recipientes para alimentos, entre eles garrafas, baldes e sacolas (SANTOS et al., 2011)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O delineamento da pesquisa se mostra de suma importância para o entendimento dos objetivos e tipo de pesquisa apresentado, contribuindo para uma melhor visão do trabalho a ser apresentado.

Em relação a natureza, a pesquisa foi definida como aplicada, pois segundo Kauark et al (2010) a pesquisa aplicada utiliza os conhecimentos obtidos pela pesquisa básica para solucionar ações concretas e solucionar os problemas existentes. Desta forma, neste trabalho a aplicabilidade foi avaliada pela ação dos biossurfactantes para evitar a formação de biofilmes bacterianos em filmes flexíveis.

Em relação a abordagem do problema a pesquisa se define como quantitativa. Segundo Frasson et al. (2009), a pesquisa quantitativa necessita de quantificação em algum momento. No presente trabalho foi avaliado a quantificação dos dados para avaliar a adesão bacteriana em filmes flexíveis aplicados com biossurfactantes.

Do ponto de vista de seus objetivos a pesquisa foi considerada exploratória, pois se busca um entendimento e formulação de novas ideias para uma problemática ainda em estudo. Segundo Frasson et al. (2009), a pesquisa exploratória tenta, de maneira diferenciada, entender e estudar fenômenos com características como a formação de ideias, para o entendimento do conjunto do problema.

Do ponto de vista dos procedimentos técnicos a pesquisa realizada neste trabalho foi experimental, que segundo Gil (2007) determina um objeto de estudo, definindo uma forma de controle e então observando os efeitos que as variáveis produzem no objeto. Desta forma, o trabalho desenvolvido teve como intuito a manipulação dos meios para quantificação de bactérias patogênicas aderida em diferentes superfícies.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

Os experimentos biotecnológicos propostos foram realizados nos Laboratórios de Iniciação Científica, Microbiologia e Bioquímica do Câmpus Ponta Grossa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

3.3 CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES

Para garantir a inocuidade do sistema e posterior risco de contaminação, todos os meios de cultivo, materiais e instrumentos utilizados foram autoclavados (Phoenix) a 121°C por 30 minutos. As sementeiras, manipulação dos filmes plásticos contaminados e análises destes foram feitas em câmara de fluxo laminar (Bioseg 12 da empresa VECO).

3.4 ORIGEM DOS MICRO-ORGANISMOS

As cepas dos micro-organismos *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) utilizadas foram cedidas pela Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos.

3.5 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE

Os micro-organismos *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) foram utilizados para produção dos biossurfactantes, surfactina e ramnolipídeos, respectivamente.

3.5.1 Preparo dos inóculos

Para o preparo dos inóculos foi produzido 100 mL de caldo Luria Bertani (LB) (10 g L⁻¹ NaCl, 10 g L⁻¹ Triptona e 5 g L⁻¹ de extrato de levedura) e esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foi inoculado separadamente os micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de inóculos mãe, em caldo LB, na proporção de 10% (v/v), sendo incubados em estufa (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil) a 37°C, sob agitação a 150 rpm por 48

horas, onde se obteve o primeiro inóculo. Decorrido o tempo, uma alíquota de 15 mL deste primeiro inóculo foi repassado para 150 mL do meio Luria Bertani enriquecido (30g L⁻¹ de Glicose, 30g L⁻¹ de NaCl, 1g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,25 g L⁻¹ de MgSO₄, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de solução de sais [0,10 g L⁻¹ de ZnSO₄, 3 g L⁻¹ de MnSO₄, 0,10 g L⁻¹ FeSO₄, 0,10 g L⁻¹ CaCl₂, 0,10 g L⁻¹ de CoCl₂, 0,01 g L⁻¹ de CuSO₂, 0,01 g L⁻¹ de H₃BO₃ e 0,01 g L⁻¹ de KMnO₄ em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ em pH 7,0]), sendo incubados em estufa (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil) a 37°C, sob agitação a 150 rpm por 48 horas.

3.5.2 Processo fermentativo para a produção de surfactante

Para produção dos biosurfactantes foi utilizado 200 mL do meio de cultivo Salino Mineral complementado com fontes de carbono (0,2 g L⁻¹ de MgSO₄, 7,0 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,7 g L⁻¹ de NH₄NO₃, 10 g L⁻¹ de óleo motor, 10 g L⁻¹ de óleo de soja proveniente de fritura e 10 g L⁻¹ de glicerol em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ em pH 7,0). Neste meio de cultivo foram inoculados 10% (v/v) dos micro-organismos, oriundos do meio Luria Bertani enriquecido, e incubados em estufa (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil) a 37°C, sob agitação a 150 rpm por 120 horas.

3.5.3 Extração de biosurfactante bruto

O meio fermentativo com a produção de biosurfactante foi acidificado com HCl (6 Mol L⁻¹) até pH 2,0 e mantido a 4°C por 24h para precipitação do biosurfactante e segundo Pollack (2000) promover a morte do micro-organismo. Este precipitado foi separado por centrifugação (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil) a 7000 rpm por 30 minutos, seguido de três lavagens sucessivas com água destilada.

3.6 Preparação de micro-organismos patogênicos

Colônias de bactérias patogênicas de origem alimentar como *Salmonella sp.e* *Escherichia coli* (isolado no laboratório de Microbiologia da UTFPR), *Pseudomonas aeruginosa* (UPEDA 416), *Staphylococcus aureus* (TSB 25923) e *Bacillus cereus*

(isolado no laboratório de Microbiologia da UTFPR-PG), foram inoculadas em 100 mL de caldo Nutriente estéril e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até a obtenção de uma suspensão bacteriana com 10^{10} UFC mL⁻¹. O controle do crescimento celular foi verificado por densidade ótica (0,6 nm) em espectrofotômetro UV segundo Gomes, 2011, com comprimento de onda de 600 nm. Esta suspensão bacteriana foi utilizada para a realização dos testes de aderência em polímeros plásticos e avaliar a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes.

3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSSURFACTANTES

A escolha dos biossurfactantes surfactina e ramnolipideo se deu devido as suas elevadas eficiências na redução da adesão de micro-organismos em variadas superfícies.

A atividade antimicrobiana dos biossurfactantes foi avaliada em duplicata, pelo método de Difusão em Ágar (OSTROSKY et al., 2008), por meio de discos de filmes de material celulósico (6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) sendo impregnados com soluções de surfactina 0,1% (p/v) e ramnolipideos 0,45% (p/v) tomando como base pesquisa realizada por Gomes, 2011.

Os filmes foram adicionados na superfície de placas de Petri contendo 4 cm de meios de cultura seletivos, conforme a cepa patogênica usada para o teste (cepas preparadas segundo o Item 3.6), como Ágar Salmonella-Shigella (SS) para *Salmonella sp.*, Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *Escherichia coli*, Ágar Base Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*, Ágar Baird Parker para *Staphylococcus aureus*. Foram inoculados 0,1 mL dos respectivos micro-organismos, previamente armazenados em caldo Nutriente (Item 3.6), e incubadas a 37°C durante 24 horas. Os filmes com os respectivos biossurfactantes também foram colocados na superfície do Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), para o *Bacillus cereus* e incubados a 30°C durante 24 horas.

O critério de seleção foi o diâmetro dos halos de inibição (Sensível (S) ≥ 3 mm; Moderadamente sensível (MS) > 2 mm e < 3 mm; Resistente (R) ≤ 2 mm) de crescimento em relação a sensibilidade e pela sua importância como agente patógeno e contaminante de alimentos. A figura 7 exemplifica a formação do halo de inibição da atividade antimicrobiana para a maioria dos micro-organismos.

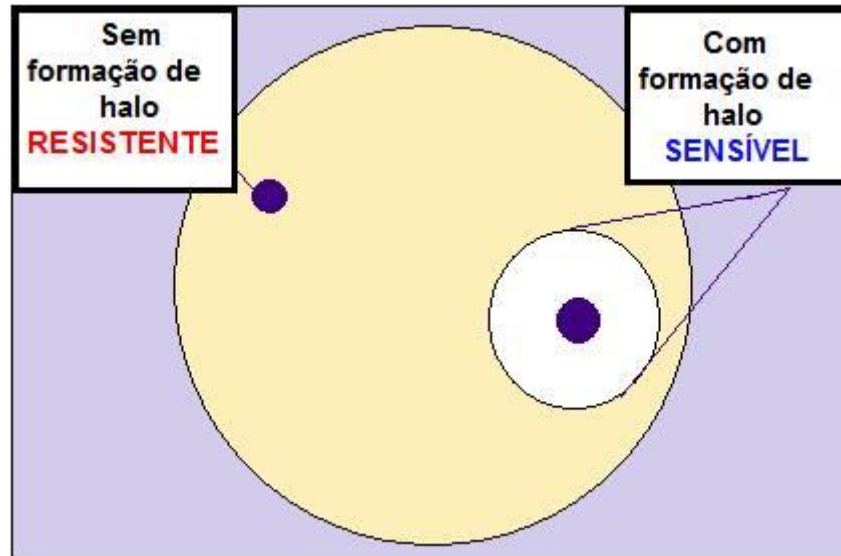


Figura 7 - Exemplificação da formação de halo de inibição

Fonte: Própria

3.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE CELULAR

A natureza hidrofóbica/hidrofílica da superfície bacteriana foi determinada pelo teste Microbial Adhesion to Solvents (MATS) (Bellon-Fontaine et al., 1997), que consiste em avaliar a afinidade das células com auxílio de um par de solventes polares e apolares. Os solventes utilizados neste trabalho foram clorofórmio (polar), n-heptano (apolar), álcool etílico (polar) e éter etílico (apolar).

O teste foi realizado em triplicata, usando 2,4 mL de suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹), 0,15 mol L⁻¹ de NaCl e 0,4 mL dos respectivos solventes, separadamente. A mistura foi agitada em potência máxima em agitador de tubos de ensaio (Vortex Mixer, modelo VX-28 - São Paulo, Brasil) durante 2 minutos para formar uma emulsão. Na sequência, a emulsão permaneceu em repouso durante 15 minutos, para assegurar a separação completa das duas fases. A absorvância da fase aquosa foi medida a 400 nm e a percentagem de células ligadas (% adhesion percentage - ADH) determinada segundo a Equação 1 (MEYLHEUC et al., 2009).

$$\% \text{ ADH} = ((1 - A) / A_0) \quad (\text{Eq.1})$$

Onde: A é a absorvância da suspensão bacteriana depois da mistura e A₀ é a absorvância antes a mistura.

3.9 PREPARAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES FLEXÍVEIS

Corpos de prova de 3 cm² (30 mm x 30 mm x 1mm) de filmes flexíveis de PP, polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD) com 0,05 mm de espessura e PEBD com 0,1 mm de espessura, foram imersos em acetona P.A. (98%) e colocados sob banho de ultrassom durante 10 minutos. Na sequência, foram enxaguados em água destilada estéril, imersos em solução detergente neutro comercial a 2% por 15 minutos e mais um banho de ultrassom durante 10 minutos. Decorrido o tempo, os corpos de prova foram lavados três vezes com água destilada estéril e secos em temperatura de 35°C por 2 horas.

3.10 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES EM FILMES FLEXÍVEIS

Os corpos de prova de 3 cm² dos filmes de PP, PEAD, PEBD com 0,05 mm e 0,1 mm de espessura foram imersos em solução de surfactina 0,1% (p/v) e ramnolipideos 0,45% (p/v), durante 24 horas em temperatura ambiente. Para o controle, os corpos de prova foram mantidos somente em água destilada sob as mesmas condições de tempo e temperatura, conforme ZERAIK et al. (2010).

3.11 TESTE DE ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FILMES FLEXÍVEIS

O teste de adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis foi adaptado de Fernandes et al. (2015).

Os corpos de provas adicionados dos biossurfactantes [surfactina 0,1% (p/v) e ramnolipideos 0,45% (p/v)] e do controle (Item 3.10) foram lavados com 5 mL de água destilada estéril e imersos na suspensão bacteriana (10^{10} UFC mL⁻¹) durante 1 minuto, sem agitação e em temperatura ambiente. Decorrido o tempo, foram lavados com 5 mL de água destilada estéril para remoção das células não aderentes.

Os corpos de provas limpos, mas ainda com possíveis células aderentes, foram colocados em tubos de ensaios contendo 10 mL de solução salina estéril

0,85% e submetidos a agitação máxima em agitador de tubos de ensaio (Vortex - Mixer, modelo VX-28 - São Paulo, Brasil) durante 2 minutos, para remoção das células aderentes. Na sequência, a solução com células liberadas foi diluída até 10^{-8} e inoculadas 0,1 mL em placas de Petri contendo meios seletivos, conforme a cepa utilizada, como SS para *Salmonella sp.*, EMB para *Escherichia coli*, Ágar Base Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*, Ágar Baird Parker para *Staphylococcus aureus* incubadas a 37 °C durante 24 horas e, ainda, MYP para *Bacillus cereus* incubado a 30°C durante 24 horas. As respectivas análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em UFC cm⁻², conforme equação 2.

$$\text{UFC/cm}^2 = (V_D/V_A) \cdot M \cdot D/A \quad (\text{Eq.2})$$

Onde:

UFC/cm² = Unidade formadora de colônias por centímetros quadrados

VD = volume do diluente na rinsagem (mL) (5 mL)

VA = volume da alíquota utilizada no plaqueamento em superfície (mL) (0,1 mL)

M = média da contagem obtida nas placas (UFC)

D = diluição realizada (10^{-8})

A = área do corpo de prova (cm²) (*2,9 cm²)

* A redução de 0,1 cm² na área foi devido a contração do material na secagem.

3.12 ADERÊNCIA EM MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

O teste de adesão de bactérias patogênicas também foi efetuado em microplacas de PS estéril. Foram preenchidas com 200 µL de cada biossurfactante [surfactina 0,1% (p/v) e ramnolipideos 0,45% (p/v)] durante 24 horas. Em seguida, os poços da microplaca foram lavados com água destilada estéril e preenchidos com 180 µL de caldo Nutriente, sendo inoculadas com 20 µL da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹) em cada uma das cavidades. A incubação ocorreu a 35° C durante diferentes intervalos de tempos (2, 5, 7, 10, 12, 25, 27 e 30 horas).

Decorrido os tempos, os poços foram lavados com água destilada estéril e fixados durante 15 minutos com metanol e coradas por 20 minutos com cristal

violeta a 1% (p/v). Após lavagem com água destilada estéril, os poços corados foram descoloridos duas vezes com 200 µL de etanol.

A densidade óptica (550 nm) da solução corada obtida da lavagem com etanol foi utilizada para medir as células aderidas. Poços não inoculados com os micro-organismos foram usados como controle, para determinar a quantidade de micro-organismos (UFC cm⁻²) que se aderiram à placa ao longo do tempo, visto que, quanto maior a quantidade de micro-organismos presentes maior será a absorbância da solução.

A respectiva análise foi realizada em triplicata e os resultados da cinética de adesão foram expressos em densidade ótica por hora (nm h⁻¹).

3.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para avaliar a interação dos micro-organismos à superfície dos filmes flexíveis com e sem biossurfactantes foi realizado análise microscópica eletrônica de varredura.

Os corpos de prova de 3 cm² foram preparados conforme descritos nos itens 3.9, 3.10 e 3.11, sendo posteriormente secas a 35°C por 2 horas e metalizados com ouro usando IC-50 ION COATER (Shimadzu), por 10 minutos. As imagens de superfície topográfica foram obtidas por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (Tescan - modelo VEGA 3) do Departamento de Engenharia Mecânica da UTFPR-PG.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES

A surfactina 0,1% e o ramnolípídeos 0,45% apresentaram atividade antimicrobiana (sensibilidade) para *Salmonella sp.*, *E. coli* e *S. aureus*. No entanto, ambos foram resistentes para *P. aeruginosa*. O *B. cereus* mostrou ser sensível apenas a surfactina 0,1% e moderadamente sensível ao ramnolípídeo 0,45% (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana dos biosurfactantes sobre os micro-organismos patogênicos

Micro-organismos patogênicos	Halo de inibição (mm)/Biosurfactantes		Atividade antimicrobiana
	Surfactina 0,1%	Ramnolípídeos 0,45%	
<i>Salmonella sp.</i>	6,5	3,5	Sensível
<i>E.coli</i>	6,5	3,5	Sensível
<i>P. aeruginosa</i>	0,0	0,0	Resistente
<i>S. aureus</i>	4,5	6,0	Sensível
<i>B.cereus</i>	5,5	2,0	Sensível - Surfactina 0,1% Moderadamente sensível - Ramnolípídeo 0,45%

Nota: Os valores apresentados se referem a média das triplicatas dos halos de inibição. Critério de seleção pelo diâmetro dos halos de inibição: (Sensível (S) \geq 3 mm; Moderadamente sensível (MS) $>$ 2 mm e $<$ 3 mm; Resistente (R) \leq 2 mm)

Fernandes et al. (2007), também confirmam a ação antimicrobiana da surfactina em micro-organismos como a *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e em outras 26 cepas de bactérias.

Dong et al. (2005) e González et al. (2006) mostraram a atividade antimicrobiana do ramnolípídeo para 18 diferentes micro-organismos, entre estes estão a *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *B. cereus*, assim como foi observado neste trabalho. Os mesmos autores destacaram que, algumas das diferenças encontradas na literatura se tratam do percentual de crescimento dos micro-organismos, quando o biosurfactante ramnolípídeo utilizado está na forma bruta ou pura, pois outros componentes podem estar presentes (fatores de virulência e sinais de *quorum sensing*) no meio bruto.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE CELULAR

A Tabela 4 mostra a porcentagem de afinidade da adesão de micro-organismos a diferentes solventes.

Tabela 4 - Afinidade da adesão de bactérias a diferentes solventes.

Micro-organismos	Afinidade das células microbianas a solventes (%)			
	Clorofórmio (polar)	Álcool etílico (polar)	n - heptano (apolar)	Éter etílico (apolar)
<i>Salmonella sp.</i>	16,94	79,66	42,37	13,55
<i>E. coli</i>	65,27	70,83	63,88	90,27
<i>P. aeruginosa</i>	100,00	97,53	40,74	72,83
<i>S. aureus</i>	71,27	54,25	59,57	46,80
<i>B. cereus</i>	22,47	58,42	22,47	43,82

A *Salmonella sp.* apresentou maior afinidade pelo álcool etílico (polar) (79,66%), do que pelo Éter etílico (apolar) (13,55%), portanto, apresenta predomínio de caráter básico (aceptor de elétrons) na superfície celular, sugerindo a presença de cargas negativas na superfície, o que a caracteriza com uma superfície hidrofílica.

A *E. coli* demonstrou maior afinidade pelo éter etílico (apolar) (90,27%) do que pelo Clorofórmio (polar) (65,27%), ou seja, apresenta predomínio de caráter ácido (doador de elétrons) na superfície da célula, apresentando uma superfície hidrofóbica.

A *P. aeruginosa* apresentou uma elevada afinidade pelo clorofórmio (100%) e pelo álcool etílico (97,53%), ambos com propriedades polares. Este aspecto indica que a bactéria apresenta predomínio de cargas negativas na superfície que evidenciam características básicas, sugerindo uma superfície hidrofílica.

O *S. aureus* mostrou alta afinidade pelo clorofórmio (polar) (71,27%), evidenciando características fortemente básicas (aceptor de elétrons), ou seja, a bactéria apresenta de cargas negativas na superfície, indicando um caráter hidrofílica.

O *B. cereus* teve maior afinidade pelo álcool etílico (polar) (58,42%) do que pelo n-heptano (apolar) (22,47%), ou seja, possui um predomínio de cargas negativas na superfície celular, tendo características básicas e hidrofílica.

Portanto, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus* apresentaram uma característica hidrofílica na superfície celular, indicando um maior potencial de adesão em superfícies hidrofóbicas.

O caráter hidrofóbico encontrado na superfície celular da *E. coli* (Gram negativa) pode ser decorrente de alterações do meio de cultivo deste micro-organismo. Segundo Palmer et al. (2007) há indícios que os lipopolissacarídeos da superfície celular de bactérias Gram negativas tornam a célula mais hidrofílica e sua perda mais hidrofóbica. A concentração de oxigênio no meio de cultivo pode promover uma alteração na estrutura do lipopolissacarídeo, resultando num aumento da hidrofobicidade celular. Portanto, a bactéria pode alterar para uma hidrofobicidade da superfície celular, pela mudança do ambiente externo, o que deve ter ocorrido neste trabalho.

4.3 ANÁLISE DO TESTE DE ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FILMES FLEXÍVEIS

4.3.1 Adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis impregnados com surfactina 0,1%

Ao comparar os filmes controles com os adicionados com surfactina a 0,1% foi verificado que em PP houve redução de um (01) ciclo logarítmico na adesão de *Salmonella sp* e *E. coli*. No entanto, não foi verificado eficiência na diminuição de colônias de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus*. Em PEAD foi observado diminuição de um (01) ciclo logarítmico para *E coli*, *P. aeruginosa* e *B. cereus* e, de oito (08) ciclos para *Salmonella sp*, porém sem efeito sobre o *S. aureus*. Em filmes de PEBD 0,05 mm foi verificado decréscimo de um (01) ciclo logarítmico para *E coli* e *B. cereus* e, de oito (08) ciclos para *Salmonella sp*, mas sem eficiência sobre a *P. areruginosa* e *S. aureus*. Nos filmes de PEBD 0,1mm foi verificado apenas redução de um (01) ciclo logarítmico para *Salmonella sp*, não tendo consequência sobre o desenvolvimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus* (Tabela 5).

Entre os filmes de PEBD foi verificado que a menor espessura do plástico (0,05mm) proporcionou maior eficiência na redução da adesão celular. Este aspecto pode estar relacionado a capacidade de fixação e/ou absorção do biossurfactante no plástico.

Tabela 5 Adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis com surfactina 0,1%

Filmes flexíveis	Adesão de micro-organismos patogênicos/UFC cm ⁻² em filmes flexíveis com surfactina 0,1%				
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>
PP	3,8 x 10 ⁷	7,5 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁹	2,8 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁸
PP controle	1,7 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁹	5,1 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁸
PEAD	< 10	3,8 x 10 ⁷	9,4 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁸	9,5 x 10 ⁷
PEAD controle	3,0 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁸	5,7 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁸
PEBD 0,05 mm	< 10	5,5 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁸	6,6 x 10 ⁸
PEBD 0,05 mm Controle	3,0 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁹	4,9 x 10 ⁸	9,2 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁹
PEBD 0,1 mm	3,8 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁸	4,5 x 10 ⁸
PEBD 0,1 mm Controle	1,3 x 10 ⁸	9,1 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸	4,9 x 10 ⁸	9,1 x 10 ⁸

Nota: Os valores apresentados se referem a média das duplicatas dos halos de inibição.

A surfactina possui cargas negativas devido seu grupamento aniônico, mas ao ser aplicada sobre a superfície dos filmes (carga negativa) pode ter promovido uma característica pouco hidrofóbica, ou seja, em um aumento de cargas positivas na superfície do material. Segundo Gang et al. (2010), a surfactina em situações de redução da mobilidade translacional e rotacional podem ajustar o grupo polar (carregado negativamente) para ficar em contato com o meio aquoso e, o grupo apolar com a superfície hidrofóbica, o que levaria a uma redução da hidrofobicidade da superfície do material de contato. No entanto, esta alteração não foi o suficiente para evitar a adesão da *E. coli* (carga positiva) (Item 4.2) nos filmes de PEBD 0,05 mm e 0,1mm (Tabela 5), apesar de ter sido verificado a capacidade antimicrobiana da surfactina 0,1% sobre esse micro-organismo (Tabela 3).

Em relação aos outros micro-organismos analisados, todos apresentaram superfície celular com carga negativa. Neste aspecto, a pouca hidrofobicidade da surfactina na concentração de 0,1% (aumento de carga positiva) não foi suficiente para manter a adesão celular, o que sugere a ocorrência de um efeito antiadesivo, entre a superfície do filme impregnado com o biosurfactante (carga negativa) e os micro-organismos testados (carga negativa). O efeito pode estar relacionado a repulsão eletrostática, redução das interações hidrofóbicas e/ou pela interferência de alguns fatores como a produção de MPE por alguns micro-organismos. Os MPE são na maioria aniônicos podendo alterar a carga da superfície promovendo a repulsão eletrostática (SIMÕES et al., 2010). Outro aspecto deve ser considerado na redução

da adesão celular nos filmes, como a ação antimicrobiana da surfactina, sendo observada em todos os micro-organismos, com exceção da *P. aeruginosa* (Tabela 5).

4.3.2 Adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis impregnados com ramnolipídeos 0,45%

Considerando os filmes controle com os filmes impregnados com ramonolipídeos 0,45%, foi observado que em PP houve redução da adesão de um (01) ciclo logarítmico da *P. aeruginosa* e de oito (08) ciclos para *Salmonella sp*, mas sem efeito sobre *E. coli*, *S. aureus* e *B.cereus*. Em PEAD com ramnolipídeo 0,45% houve decréscimo de um (01) ciclo logarítmico em *Salmonella sp.* e *E coli*. No entanto, não houve influência sobre *P aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus*. A influência do ramnolipídeo 0,45% foi maior nos filmes de PEBD com menor espessura (0,05 mm), sendo verificado redução de um (01) ciclo logarítmico do *B. cereus* e oito (08) ciclos para *Salmonella sp*. Nos filmes de PEBD 0,1 mm foi verificado apenas diminuição de um (01) ciclo logarítmico para a *Salmonella sp.*, não tendo efeito sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B.cereus* (Tabela 6).

Tabela 6 Adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis com ramnolipídeos 0,45%

Filmes flexíveis	Adesão de micro-organismos patogênicos/UFC cm ⁻² em filmes flexíveis com ramnolipídeos 0,45%				
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>
PP	<10	1,5 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸
PP controle	1,7 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁹	5,1 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁸
PEAD	5,6 x 10 ⁷	9,5 x 10 ⁷	2,8 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁸
PEAD controle	3,0 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁸	5,7 x 10 ⁸	7,9 x 10 ⁸
PEBD 0,05 mm	< 10	1,9 x 10 ⁹	2,4 x 10 ⁸	6,6 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸
PEBD 0,05 mm controle	3,0 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁹	4,9 x 10 ⁸	9,2 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁹
PEBD 0,1 mm	1,9 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸
PEBD 0,1 mm controle	1,3 x 10 ⁸	9,1 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸	4,9 x 10 ⁸	9,1 x 10 ⁸

Nota: Os valores apresentados se referem a média das duplicatas dos halos de inibição.

Segundo Raza et al. (2010), devido a presença dos grupos carboxila e ramnosil, os ramnolípídeos são aniônicos (carga negativa). Quando os ramnolípídeos entram em contato com uma superfície hidrofóbica (carga positiva) se organizam em micelas, lamelas ou vesículas dependendo do pH do meio, dirigindo sua parte polar (negativa) para o ambiente externo (meio aquoso) e a parte apolar (carga positiva) em contato com a superfície, tornando a superfície hidrofílica, facilitando a repulsão dos micro-organismos com superfície celular hidrofílica. Porém, de modo geral, a ação do ramnolípídeo não teve efeito antiadesivo sobre a maioria das interações entre micro-organismos e filmes flexíveis, com exceção na interação da *Salmonella sp.* e os filmes flexíveis investigados (Tabela 6).

4.3.3 Comparação entre a adesão de micro-organismos patogênicos em filmes flexíveis impregnados com surfactina 0,1% e ramnolípídeos 0,45%

O PP coberto com ramnolípídeo 0,45% mostrou maior capacidade de redução da adesão celular, mas somente para *Salmonella sp.*. No entanto, a surfactina 0,1% impregnada em PEAD e PEBD 0,05 mm foi eficiente para a maioria dos micro-organismos testados. O PEBD 0,1 mm com ambos os biosurfactantes tiveram a mesma eficiência, mas somente para a *Salmonella sp.*

De modo geral, ambos os biosurfactantes mostraram eficiência na atividade antimicrobiana quando os filmes foram impregnados com *Salmonella sp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. cereus*, não tendo efeito sobre o *S. aureus*.

Entre os filmes, o PP, PEAD e o PEBD 0,05 mm apresentaram maior desempenho na redução da adesão microbiana, quando impregnados com a surfactina 0,1% e ramnolípídeo 0,45% .

Utilizando os valores de adesão de micro-organismos patogênicos (UFC. cm⁻²) das Tabelas 5 e 6 utilizando os valores de controle como 100% foram calculadas as médias na redução da adesão bacteriana apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Porcentagem média da redução em valor absoluto da adesão bacteriana em filmes flexíveis

Micro-organismos	Polímero	Surfactina 0,1%	Média Surfactina	Ramnolipídeo 0,45 %	Média Ramnolipídeo
<i>B. cereus</i>	PEAD	88%	59%	50%	67%
	PP	42%		53%	
	PEBD (0,05 mm)	58%		83%	
	PEBD (0,1 mm)	50%		85%	
<i>S. aureus</i>	PEAD	47%	48%	43%	34%
	PP	44%		37%	
	PEBD (0,05 mm)	80%		29%	
	PEBD (0,1 mm)	23%		27%	
<i>Salmonella sp.</i>	PEAD	100%	87%	81%	91%
	PP	78%		100%	
	PEBD (0,05 mm)	100%		100%	
	PEBD (0,1 mm)	71%		86%	
<i>P. aeruginosa</i>	PEAD	74%	35%	21%	43%
	PP	10%		90%	
	PEBD (0,05 mm)	23%		50%	
	PEBD (0,1 mm)	36%		14%	

Considerando a ação dos biosurfactantes e seus efeitos sobre os micro-organismos, foi observado que a adesão média de *Bacillus cereus* nos filmes flexíveis teve uma redução de 59% quando tratada com surfactina 0,1% e de 67% quando utilizado o ramnolipídeos 0,45%. Para *Staphylococcus aureus* a redução média foi de 48% em filmes com surfactina 0,1% e de 34% em filmes com ramnolipídeos 0,45%. Para *Salmonella sp.* o uso de surfactina 0,1% em filmes mostrou uma redução média de 87% e de 91% quando utilizado ramnolipídeos 0,45%. Para *Pseudomonas aeruginosa* a redução foi de 35% quando utilizado filmes com surfactina 0,1% e de 43% no emprego do ramnolipídeos 0,45%.

4.4 ANÁLISE DA ADERÊNCIA EM MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

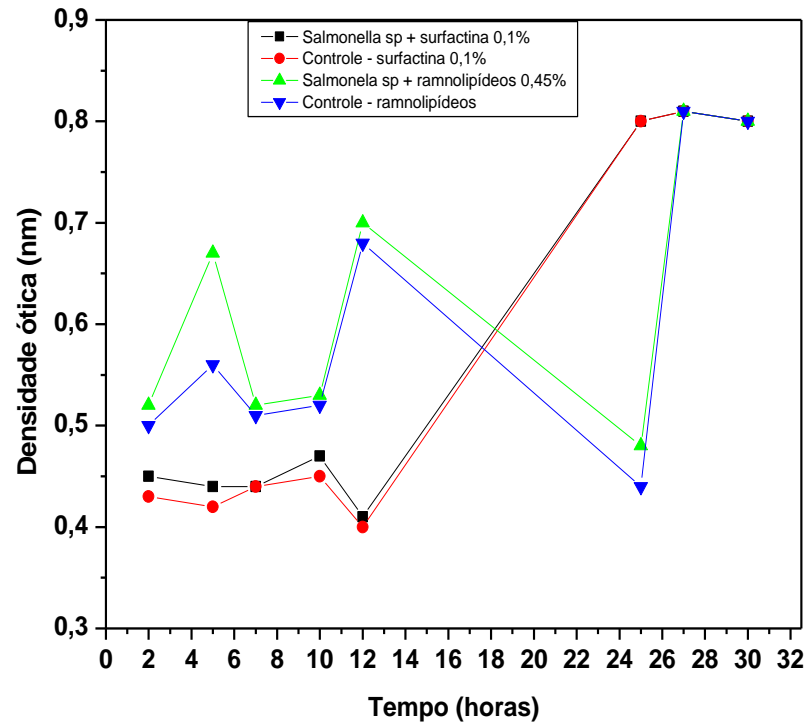
Durante o tempo de aderência dos micro-organismos patogênicos em placas de PS foi observado, de modo geral, que a adesão de *Salmonella sp.*, *E. coli*, *P. aeruginos* e *S. aureus* foi menor quando revestidas com surfactina 0,1%, do que com ramnolípídeo 0,45%. Somente para *B. cereus* a quantidade de células aderidas foram muito próximas, quando submetidas a ambos os biosurfactantes analisados (Figura 8).

A baixa adesão celular dos micro-organismos investigados teve uma eficiência maior em 2 horas (0,5 nm) para ambos os biosurfactantes, para o *B. cereus* e *P. aeruginosa*. *E. coli* mostrou baixa adesão celular em 2h (0,07nm) e *Salmonella sp.* (0,44nm) em 5h, quando aplicada a surfactina 0,1%. *S. aureus* apresentou reduzida adesão celular em 25h (0,38nm) quando utilizado o ramnolípídeo 0,45%.

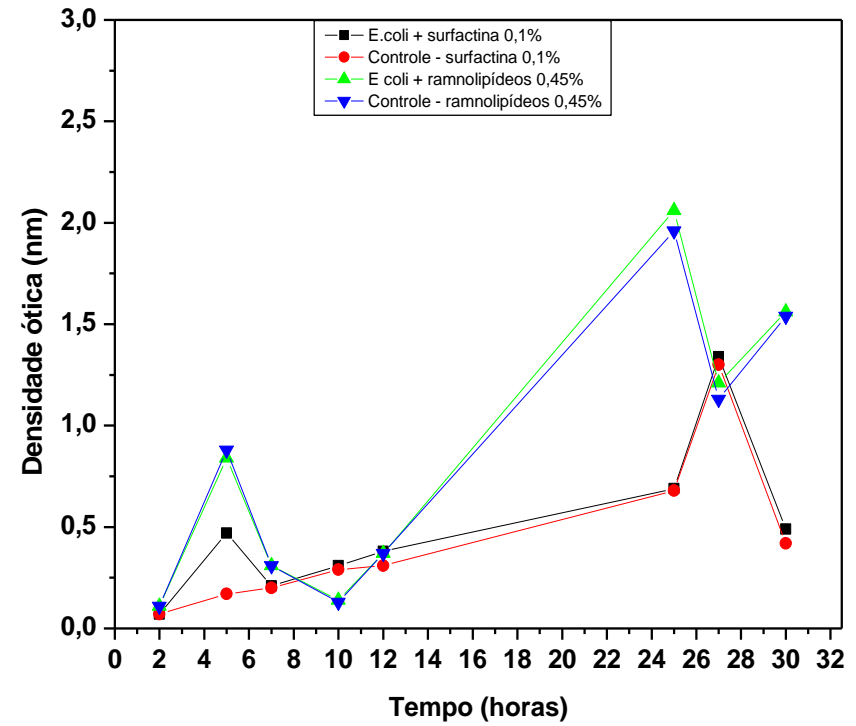
Segundo Zeraik et al. (2010) o PS é considerado hidrofóbico e os ramnolípídeos em contato com uma superfície hidrofóbica podem se organizar em micela, dependendo da sua concentração e do pH do meio. Este aspecto reduz o ângulo de contato da superfície com a água, tornando a superfície hidrofílica, o que conduz na redução da adesão dos micro-organismos (hidrofílicos).

No entanto, não houve eficiência na redução da adesão em PS comparada ao controle, para ambos os biosurfactantes (Figura 8). Desta forma, a concentração do biosurfactantes testados não se mostram adequados para o tratamento como antiadesivo destes patógenos para este tipo de plástico, o PS.

Segundo Rodrigues et al. (2006) a ineficiência destes biosurfactantes pode estar relacionado com a perda de moléculas adsorvidas na superfície após lavagem, uma vez que adsorção da superfície ocorre por interações fracas como forças de Van der Waals e, não com a ineficiência do próprio biosurfactante sobre os patógenos.



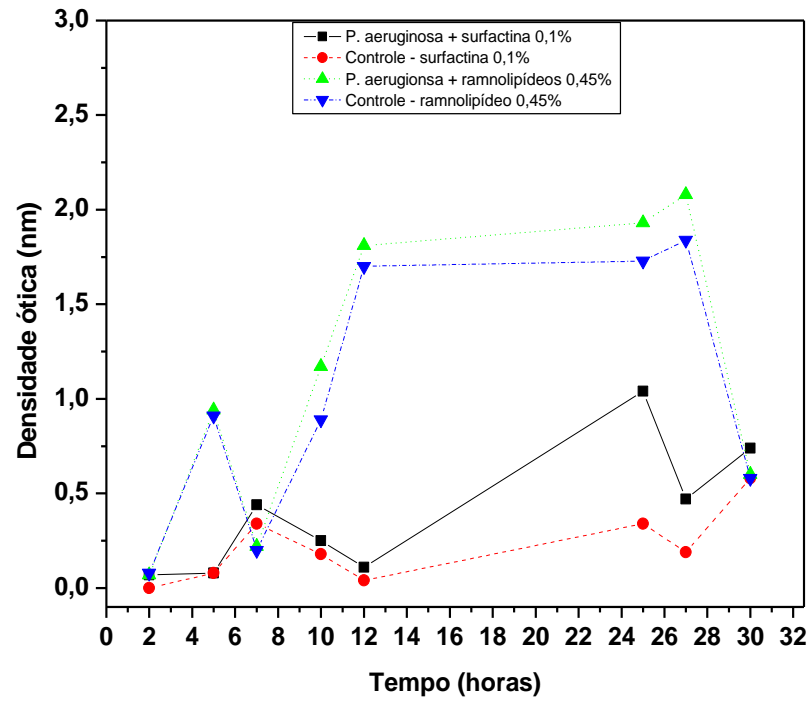
(a)



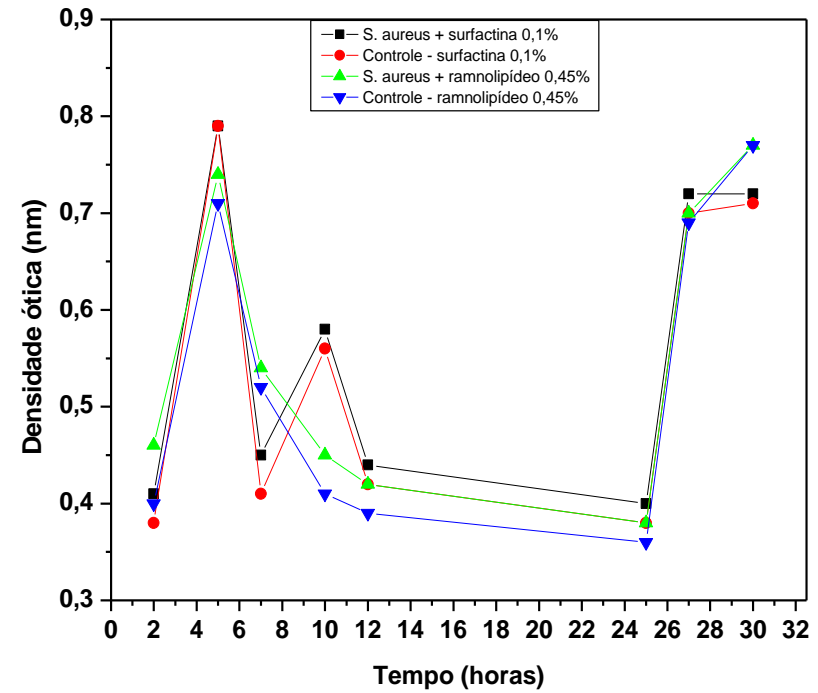
(b)

Figura 8 - Cinética de adesão de micro-organismos patogênicos em placas de poliestireno revestidas com surfactina 0,1% e ramnolípido 0,45%.

Nota: Micro-organismos patogênicos analisados: (a) *Salmonella sp.*, (b) *E. coli*



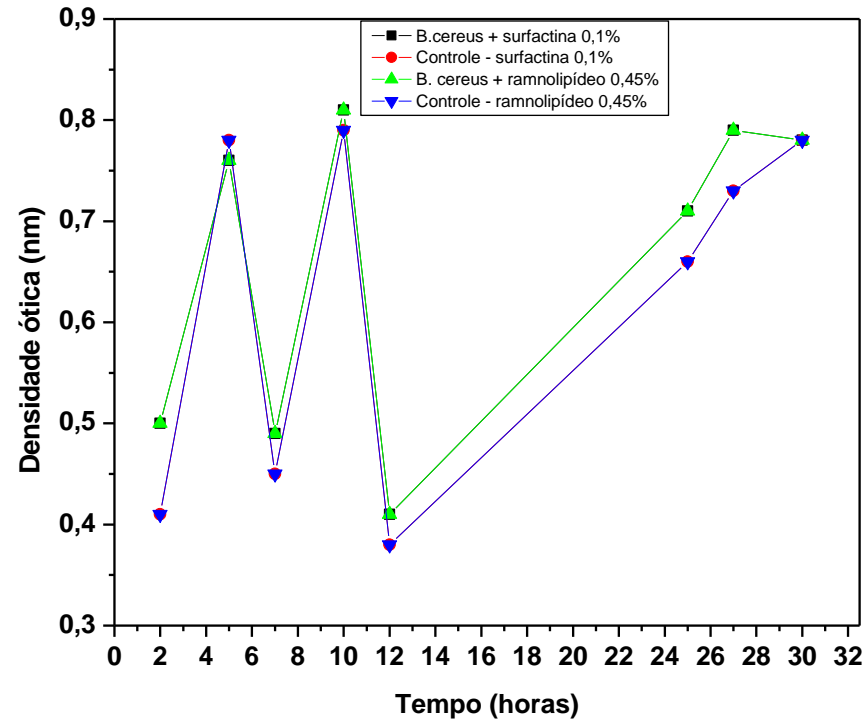
(c)



(d)

Figura 9 - Cinética de adesão de micro-organismos patogênicos em placas de poliestireno revestidas com surfactina 0,1% e ramnolipídeo 0,45%.

Nota: Micro-organismos patogênicos analisados: (c) *P. aeruginosa*, (d) *S. aureus*



(e)

Figura 10 - Cinética de adesão de micro-organismos patogênicos em placas de poliestireno revestidas com surfactina 0,1% e ramnolipídeo 0,45%.

Nota: Micro-organismos patogênicos analisados: (e) *B. cereus*.

Em trabalho desenvolvido por Gomes (2011), a surfactina se mostrou mais eficiente no controle da adesão de *Salmonella sp.*, assim como apresentado neste trabalho (Figura 8 a), do que com o ramnolipídeo. Porém, a surfactina não teve efeito sobre o *Staphylococcus aureus*, como agente inibidor de adesão. No entanto, a autora destaca que o ramnolipídeo promoveu inibição da adesão de *Staphylococcus aureus*, o que também não foi observado neste trabalho (Figura 8 d).

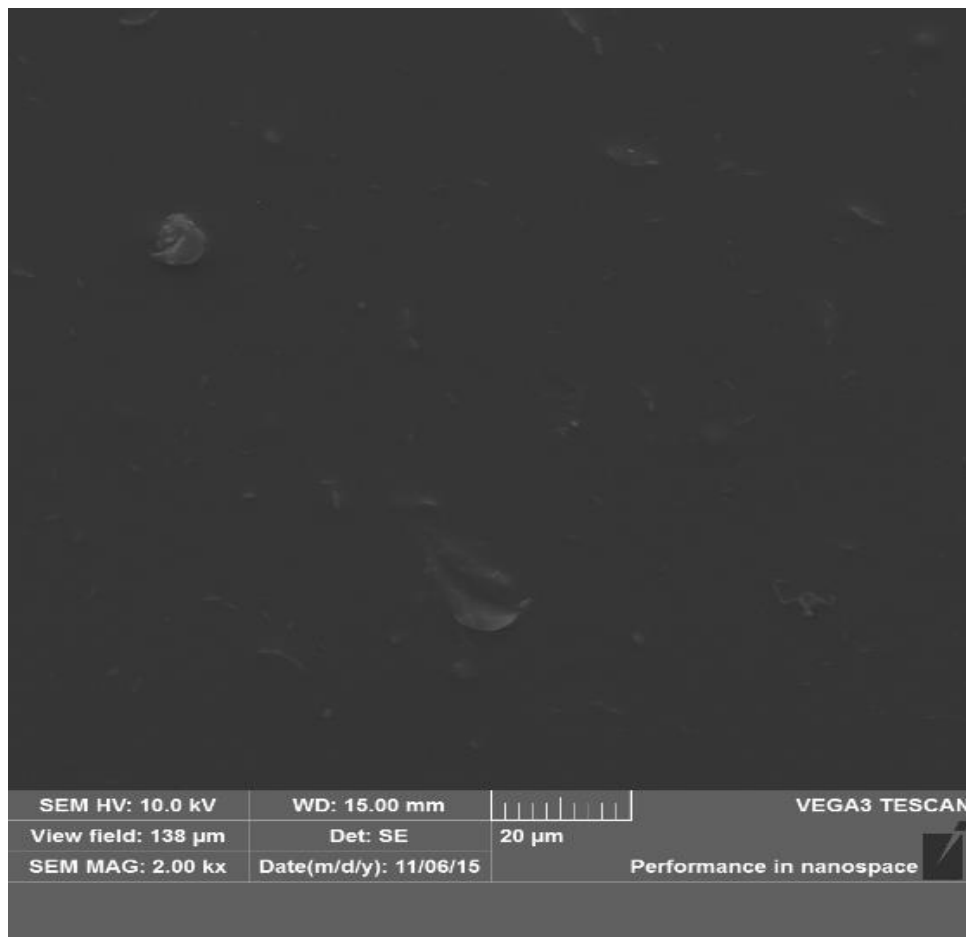
Rodrigues et al. (2006) apontaram que superfícies de PS condicionadas com ramnolipídeos obtiveram inibições de 33,8% na adesão de *Staphylococcus aureus*, porém quando tratadas com surfactina 0,1% a porcentagem de inibição da adesão subiu para 61,2%, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho (Figura 8 d).

Araujo et al. (2011) apontaram que a surfactina foi mais eficiente que o ramnolipídeo bruto, quando condicionadas em superfícies de PS contra a adesão de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Porém, destacam que a eficiência do ramnolipídeo cresce de acordo com a sua pureza, e quando purificado se mostrou mais eficiente que a surfactina, na redução da adesão de *E. coli* em superfícies de PS. Neste trabalho, a surfactina 0,1% foi mais eficiente sobre a *E. coli*, do que o ramnolipídeo 0,45%, no entanto, ambos os biosurfactantes foram pouco efetivos sobre a adesão da *P. aeruginosa* em placas de PS.

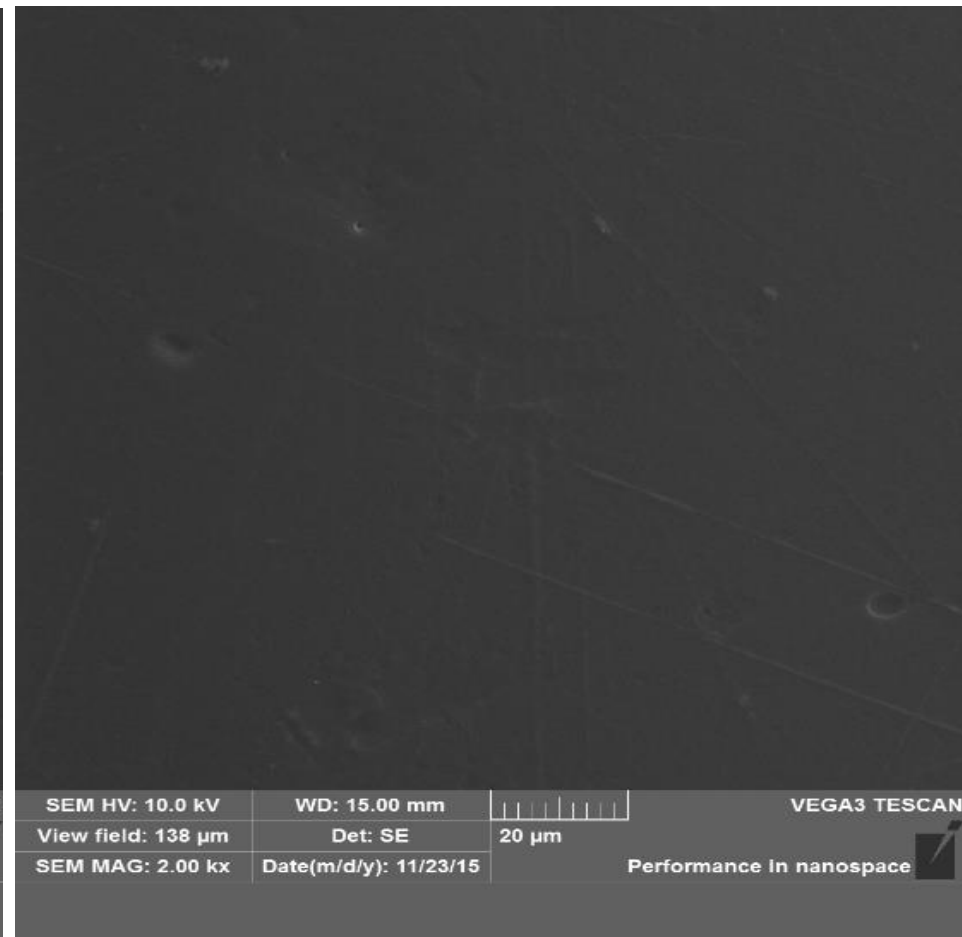
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra a adesão dos microorganismos nos filmes flexíveis com e sem tratamento com biosurfactante (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23).

Assim como nos resultados dos outros testes de adesão, a MEV apresenta imagens que comprovam que a adesão em filmes flexíveis tratados com biosurfactantes foi menor, do que a adesão em filmes sem tratamento.



PP9a



PPSS9b

Nota: **PP9a** - PP controle; **PPSS9b** - PP + *Samonella sp* + Surfactina 0,1%;

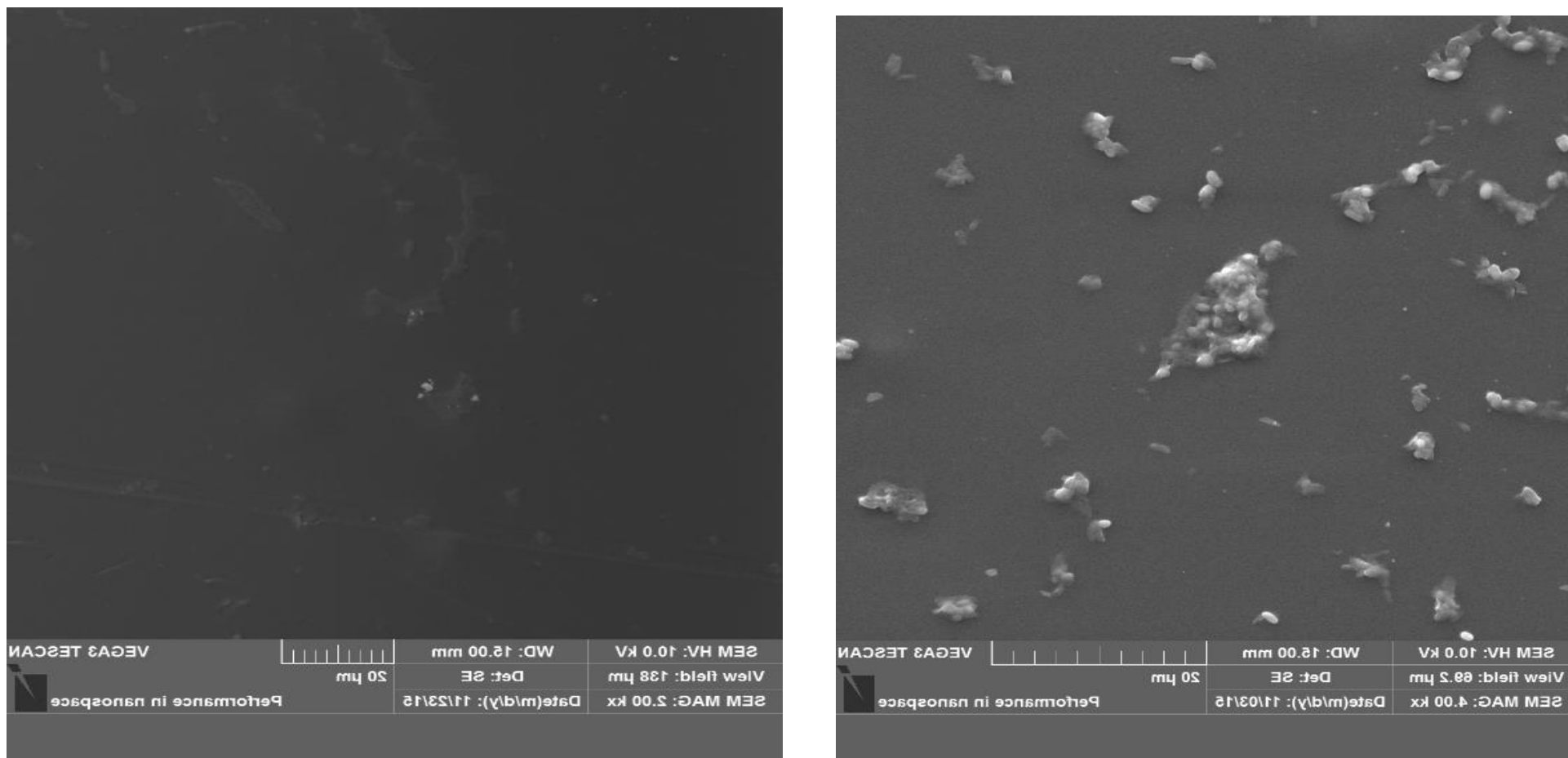
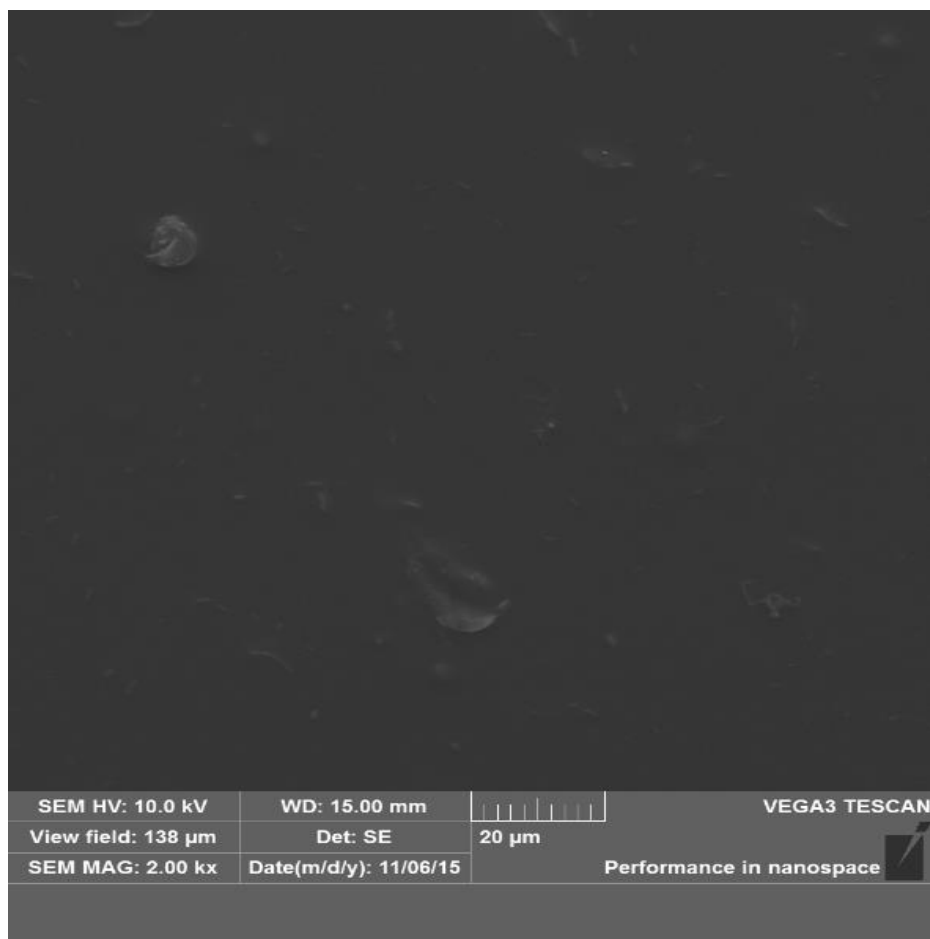
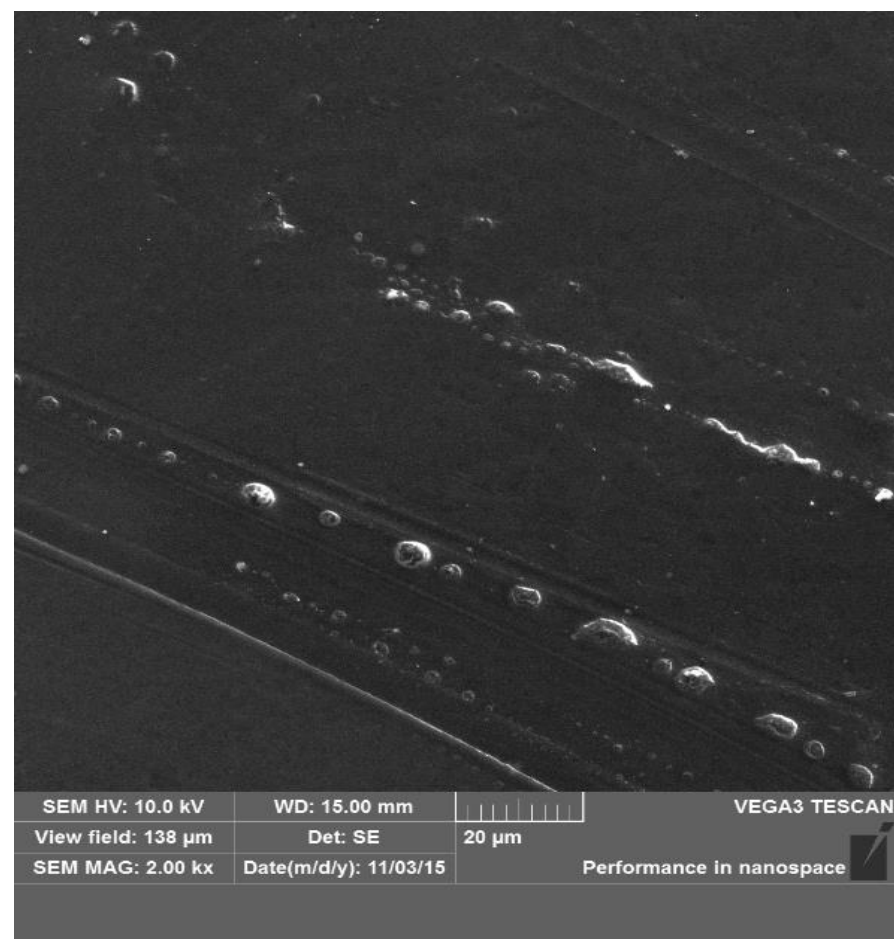


Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polipropileno, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *Salmonella* sp.

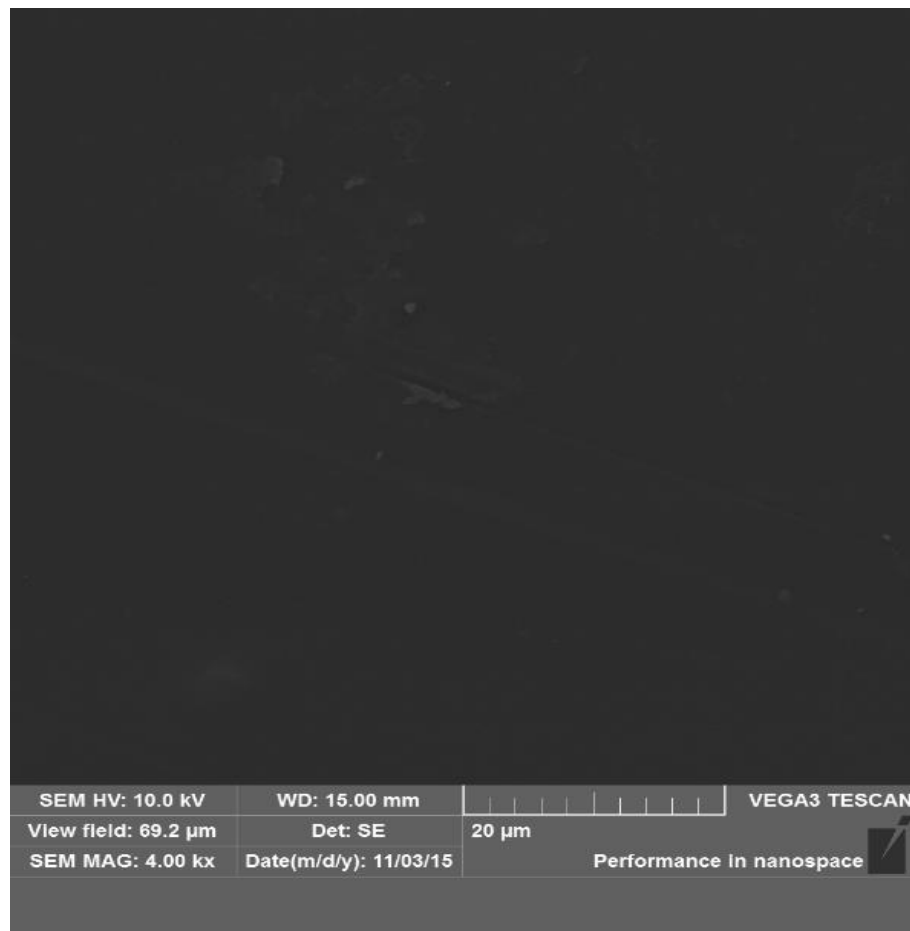
PPSR9c

PPS9d

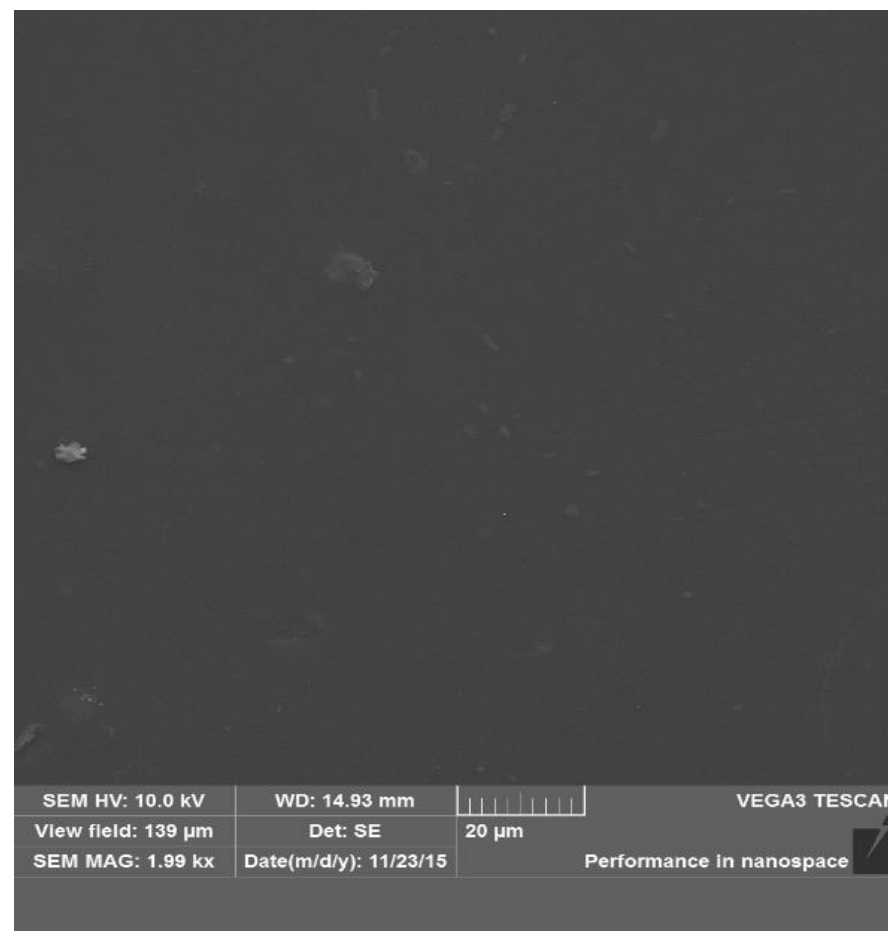
Nota: **PPSR9c** - PP + *Salmonella* sp. + Ramnolípídeo 0,45%; **PPS9d** - PP + *Salmonella* sp.

*PP10a**PPSE10b*

Nota: **PP10a** - PP controle; **PPSE10b** - PP + *E.coli* + Surfactina 0,1%;



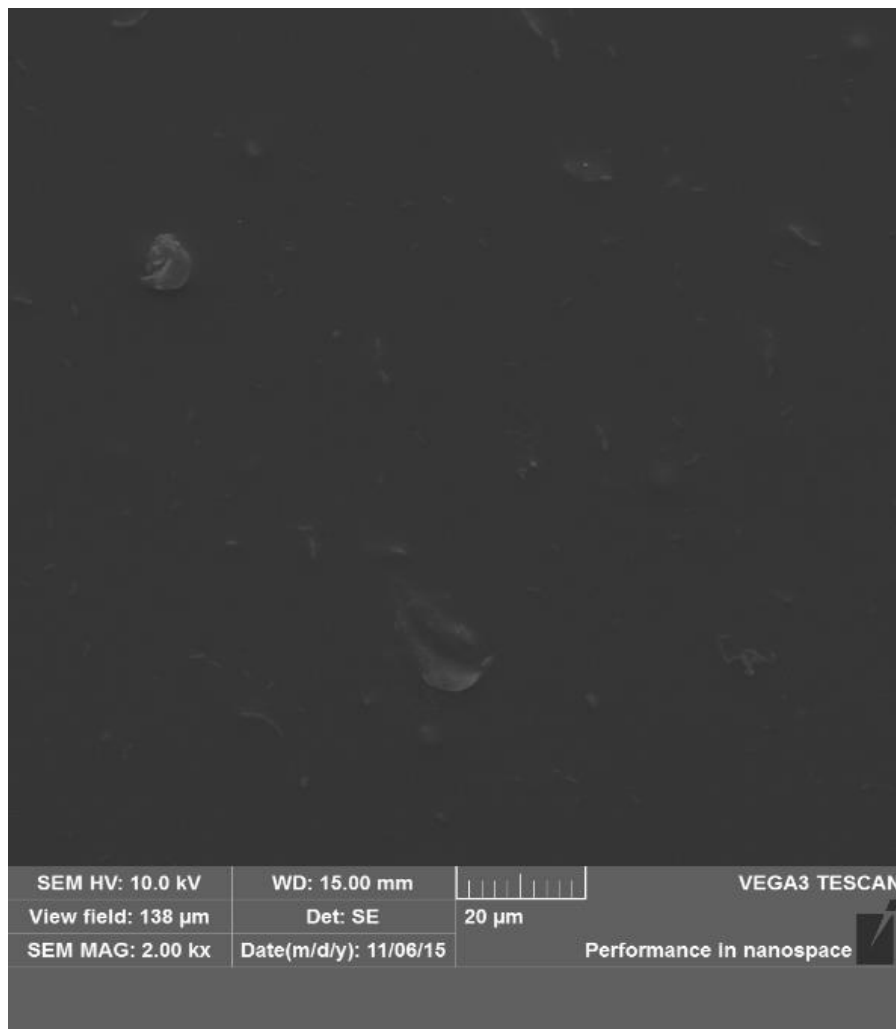
PPER10c



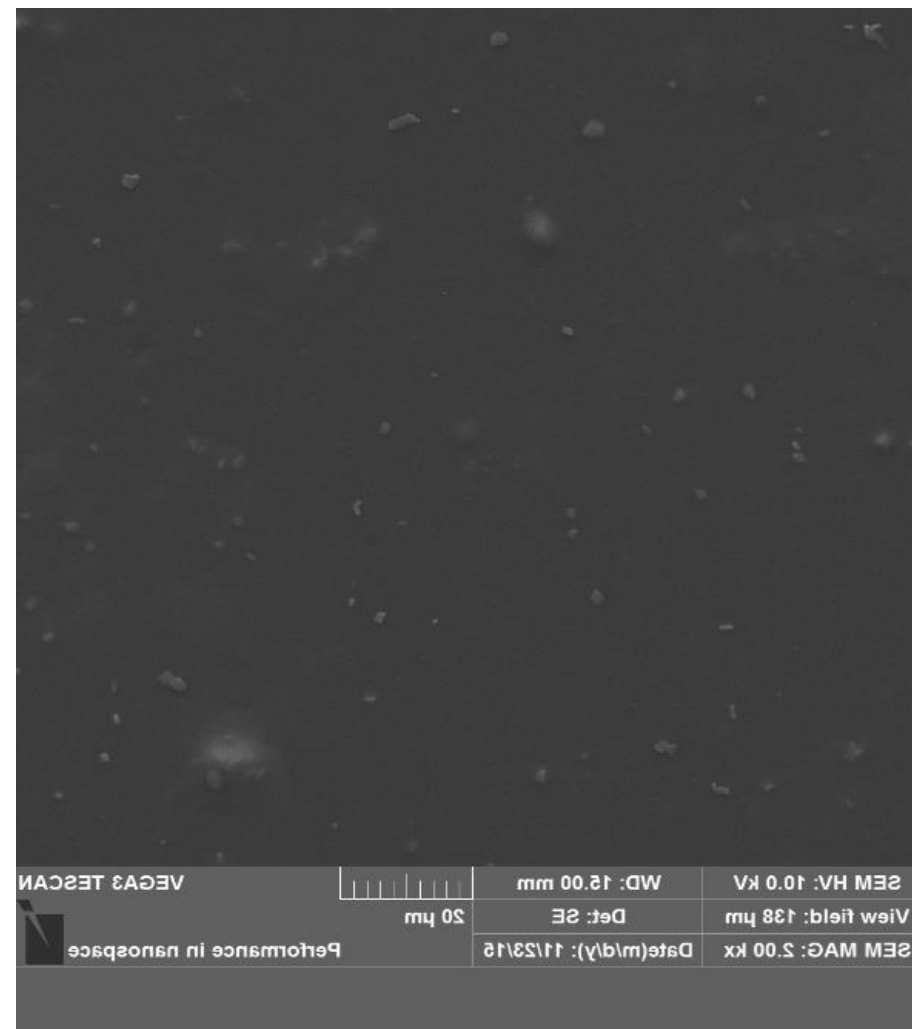
PPE10d

Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polipropileno, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *E. coli*.

Nota: **PPER10c** - PP + *E.coli* + Ramnolipídeo 0,45%; **PPE10d** - PP + *E.coli*



PP11a



PPS11b

Nota: **PP11a** - PP controle; **PPS11b** - PP + *P.aeruginosa* + Surfactina 0,1%;

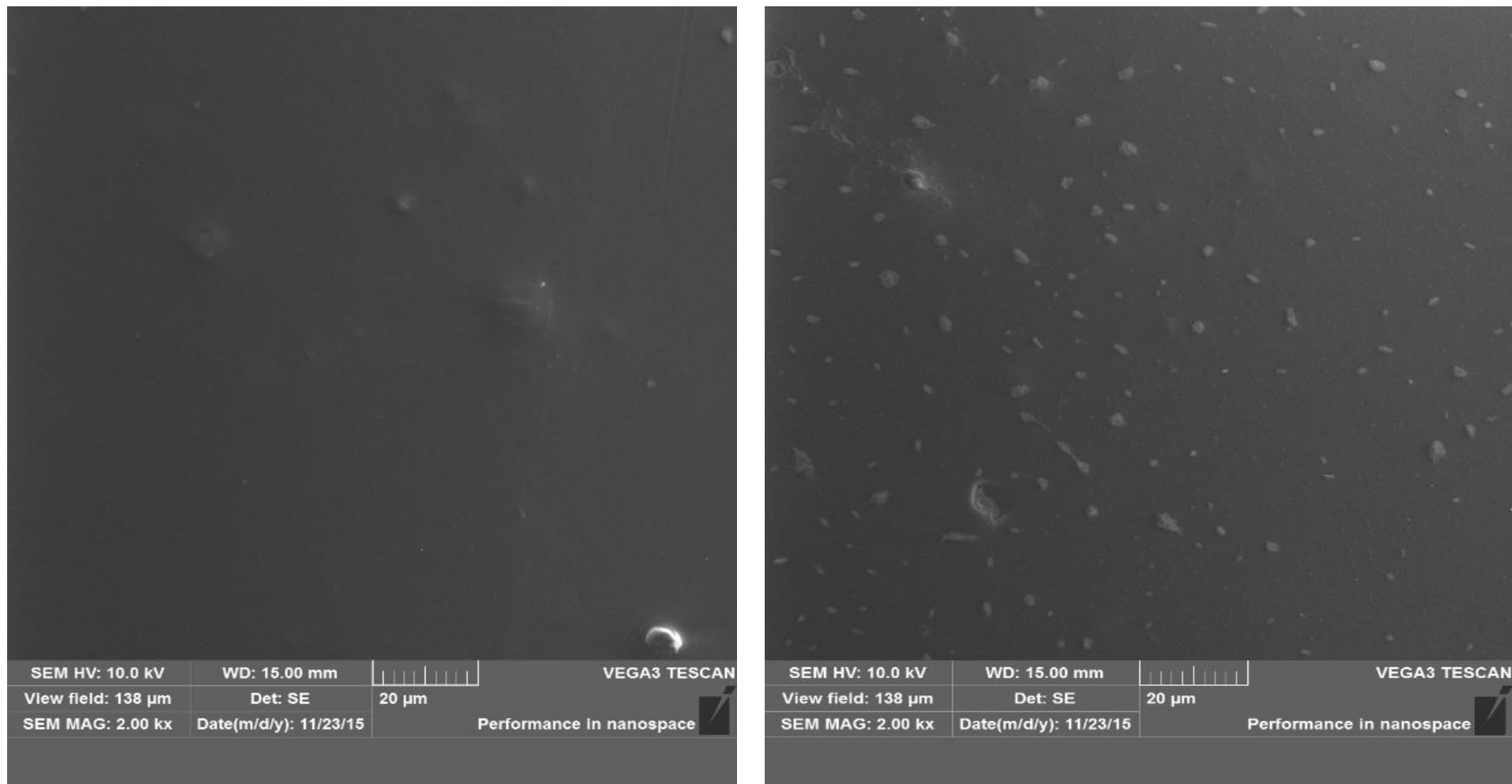
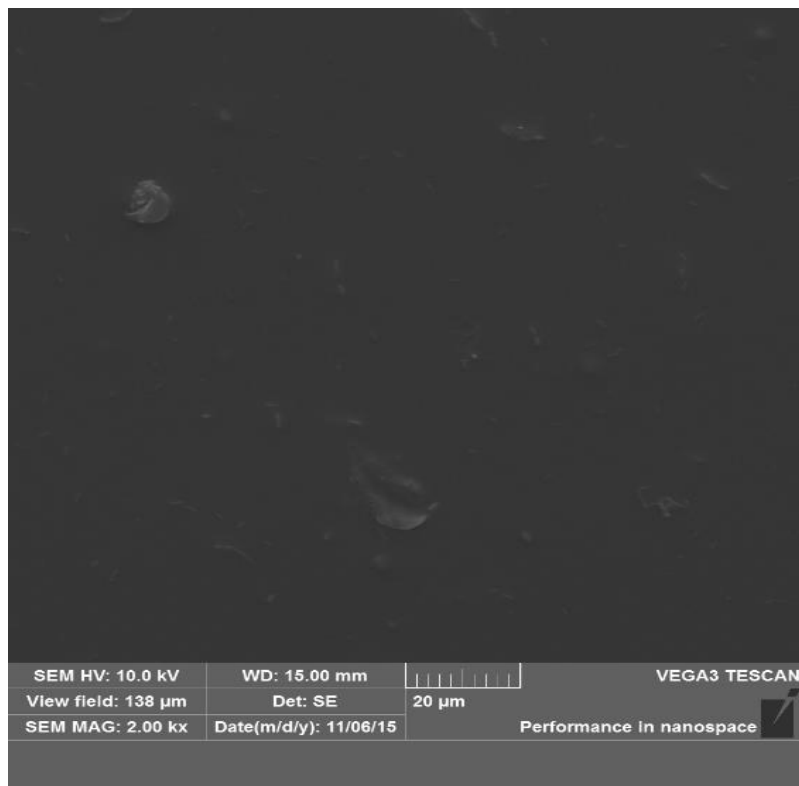
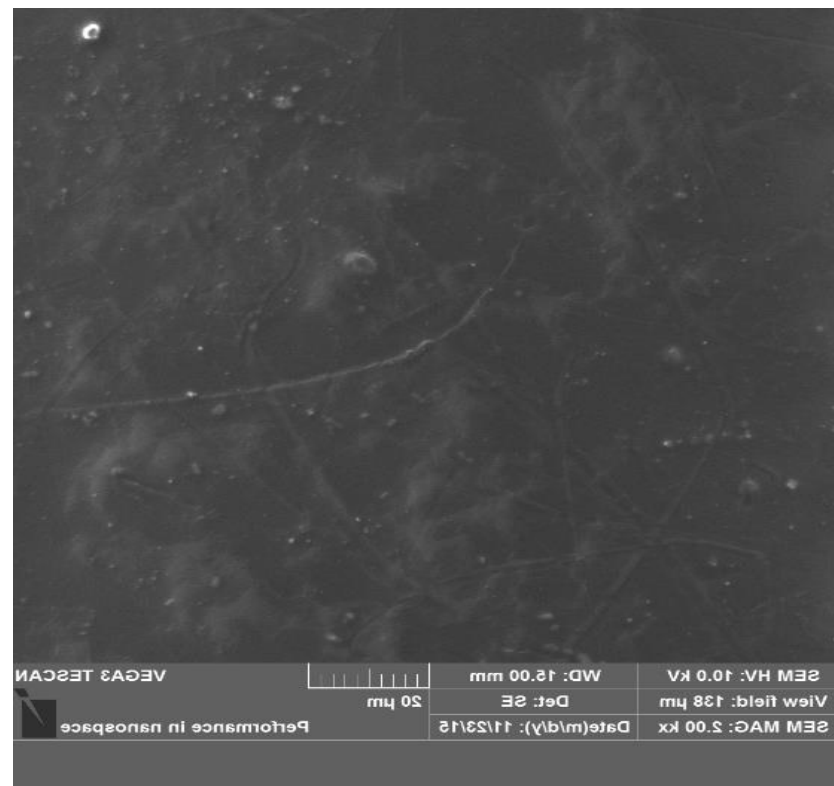


Figura 13 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polipropileno, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *P.aeruginosa*.

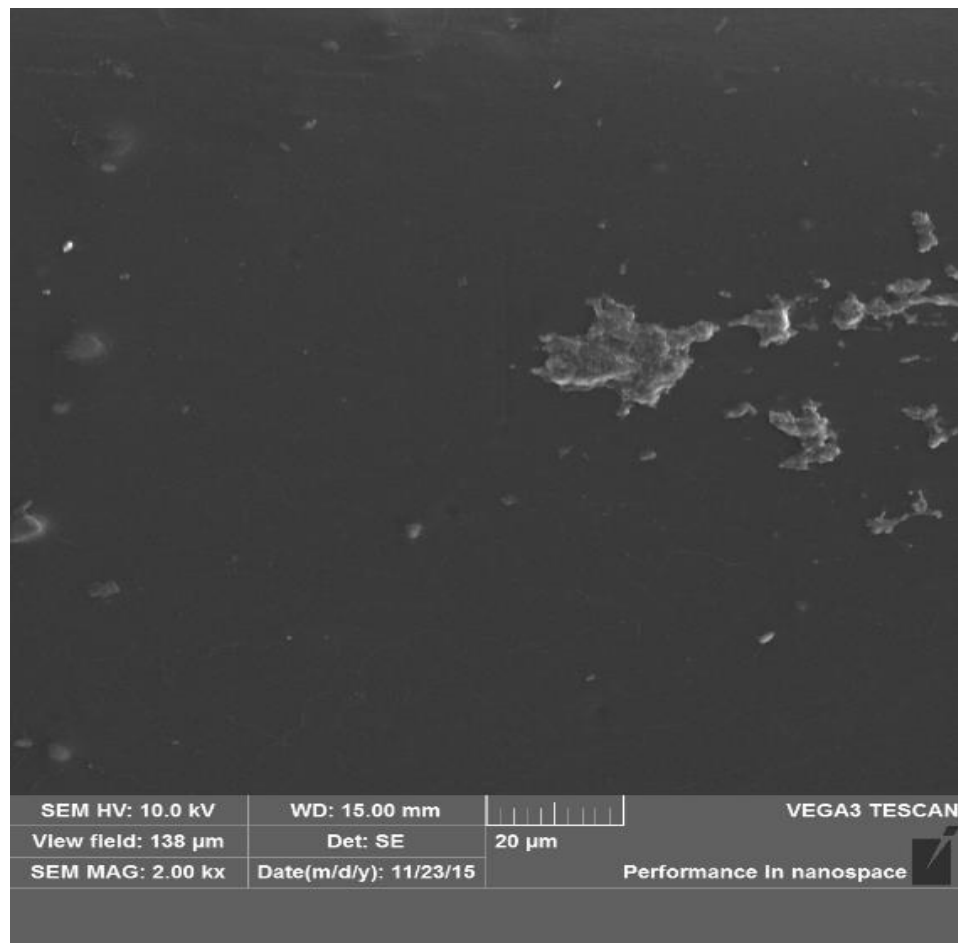
PPPR11c

PPP11d

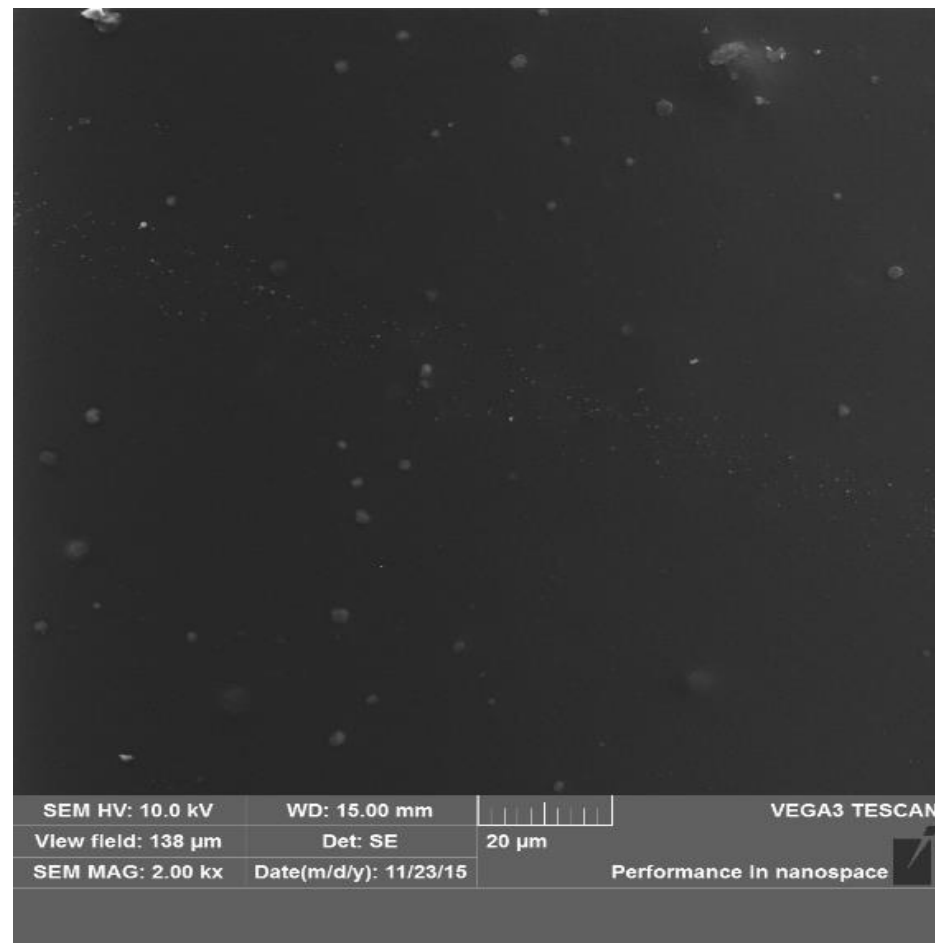
Nota: **PPPR11c** - PP + *P.aeruginosa* + Ramnolípídeo 0,45%; **PPP11d** - PP + *P.aeruginosa*

*PP12a**PPStS12a*

Nota: **PP12a** - PP controle; **PPStS12b** - PP + *S.aureus* + Surfactina 0,1%;



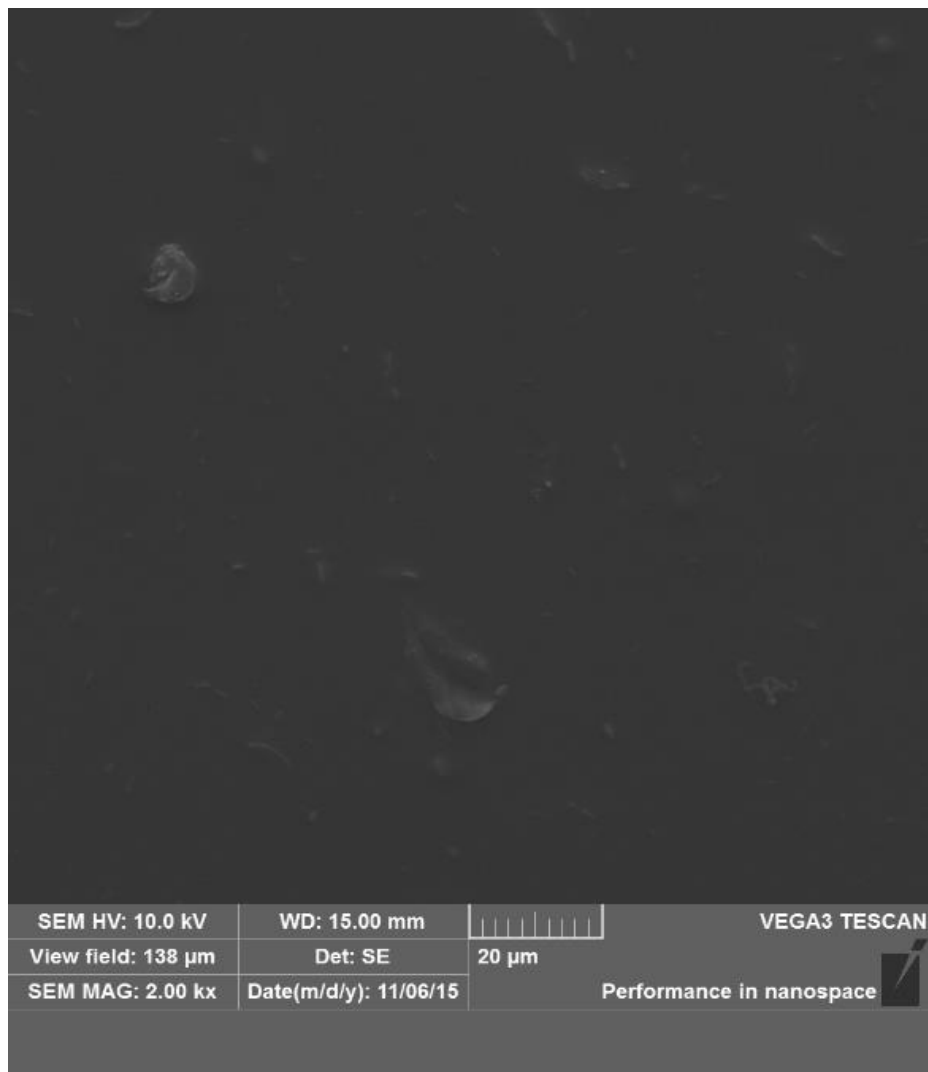
PPStR12c



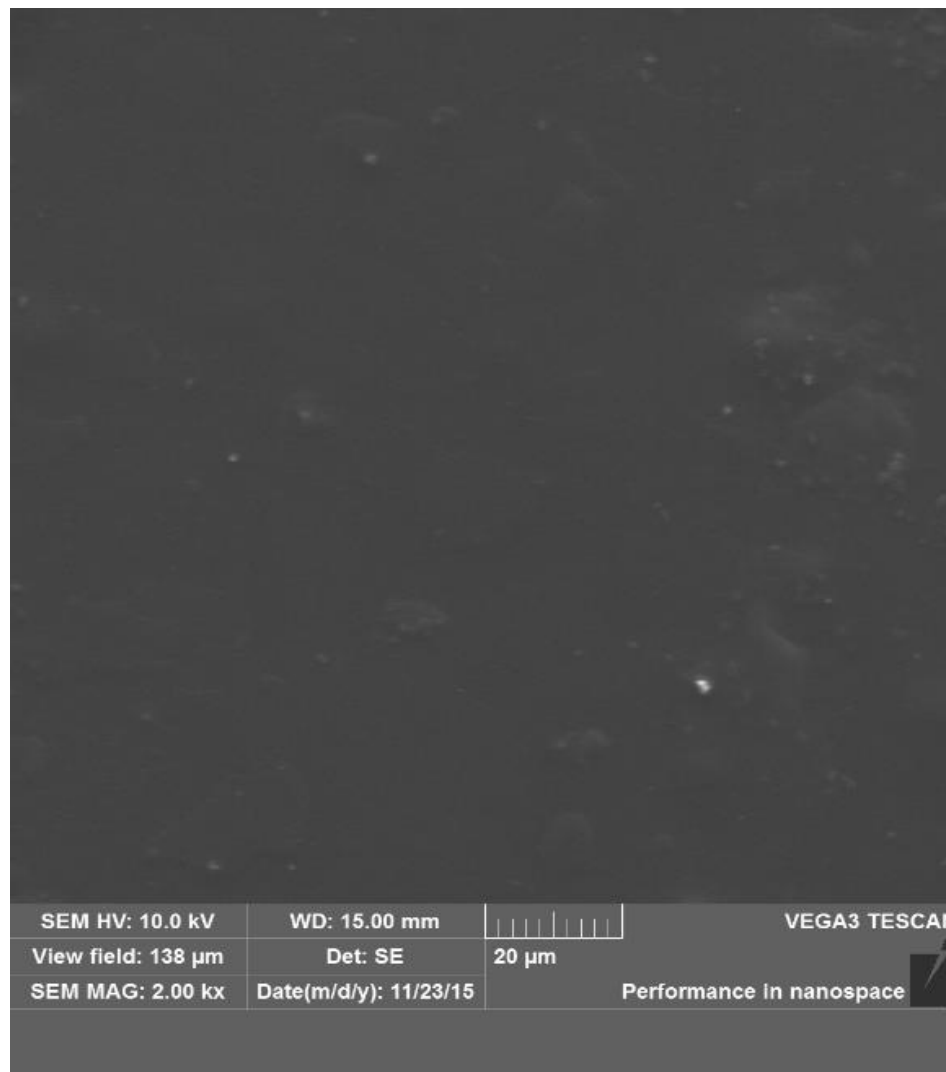
PPSt12d

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polipropileno, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *S. aureus*

Nota: **PPStR12c** - PP + *S.aureus* + Ramnolipídeo 0,45%; **PPSt12d** - PP + *S.aureus*

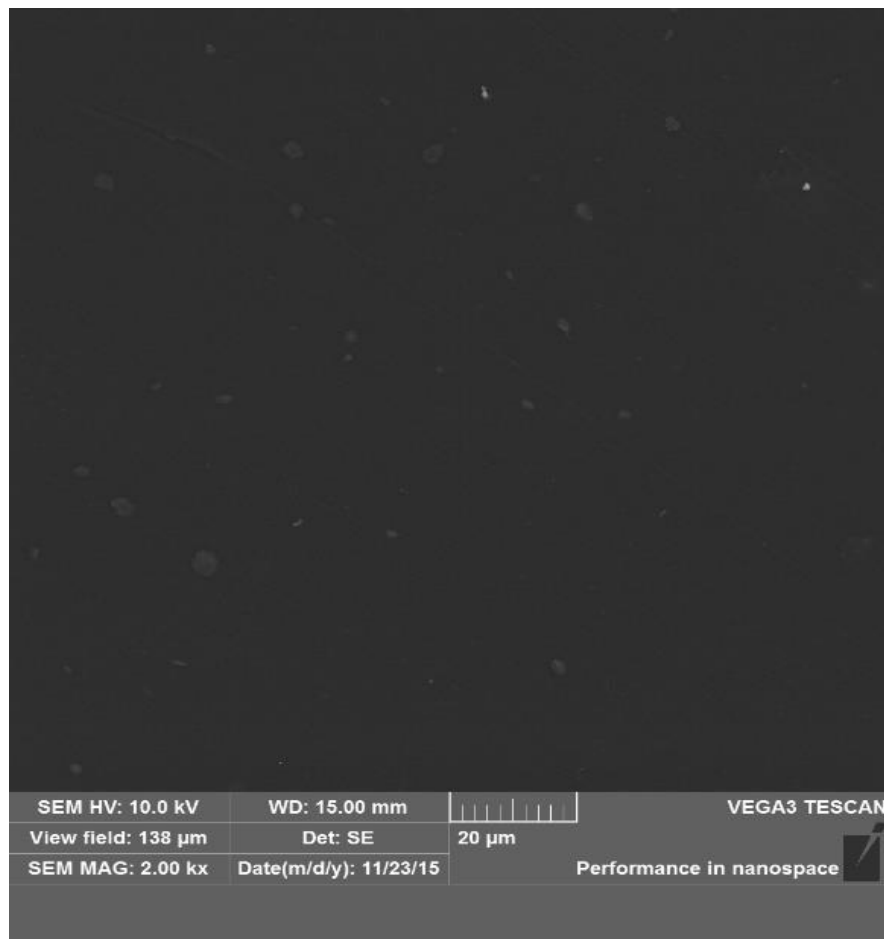


PP13a

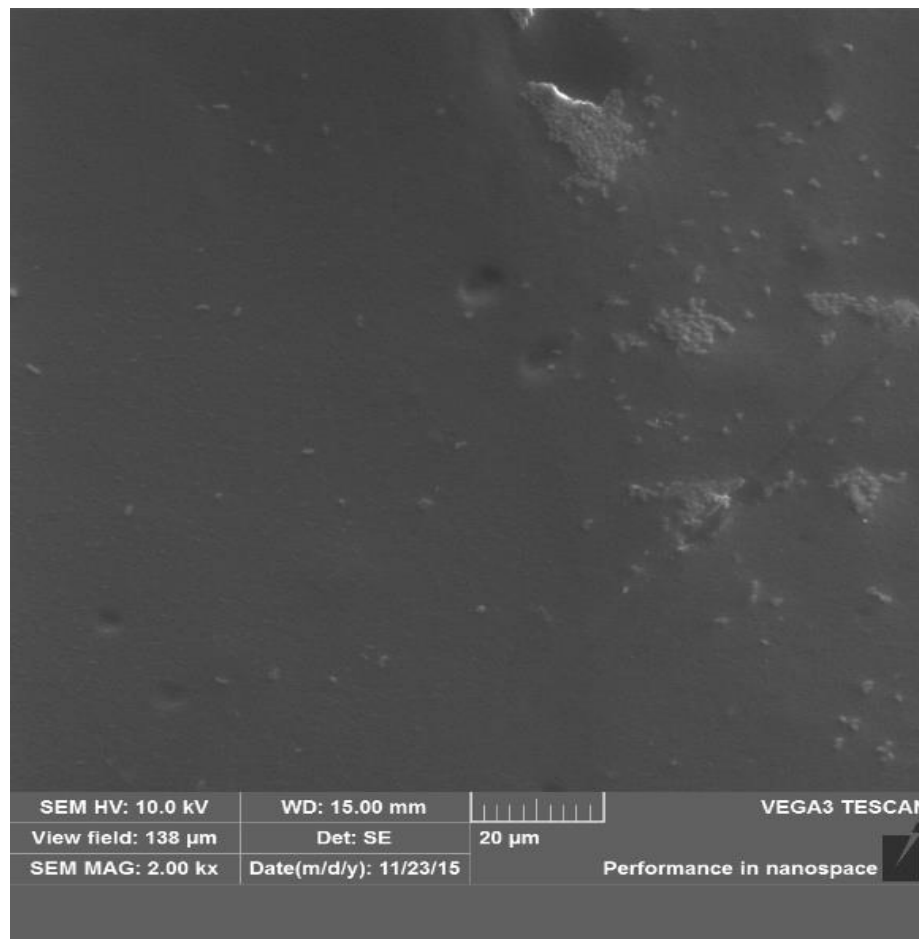


PPBS13b

Nota: **PP13a** - PP controle; **PPBS13b** - PP + *Bacillus cereus* + Surfactina 0,1%;



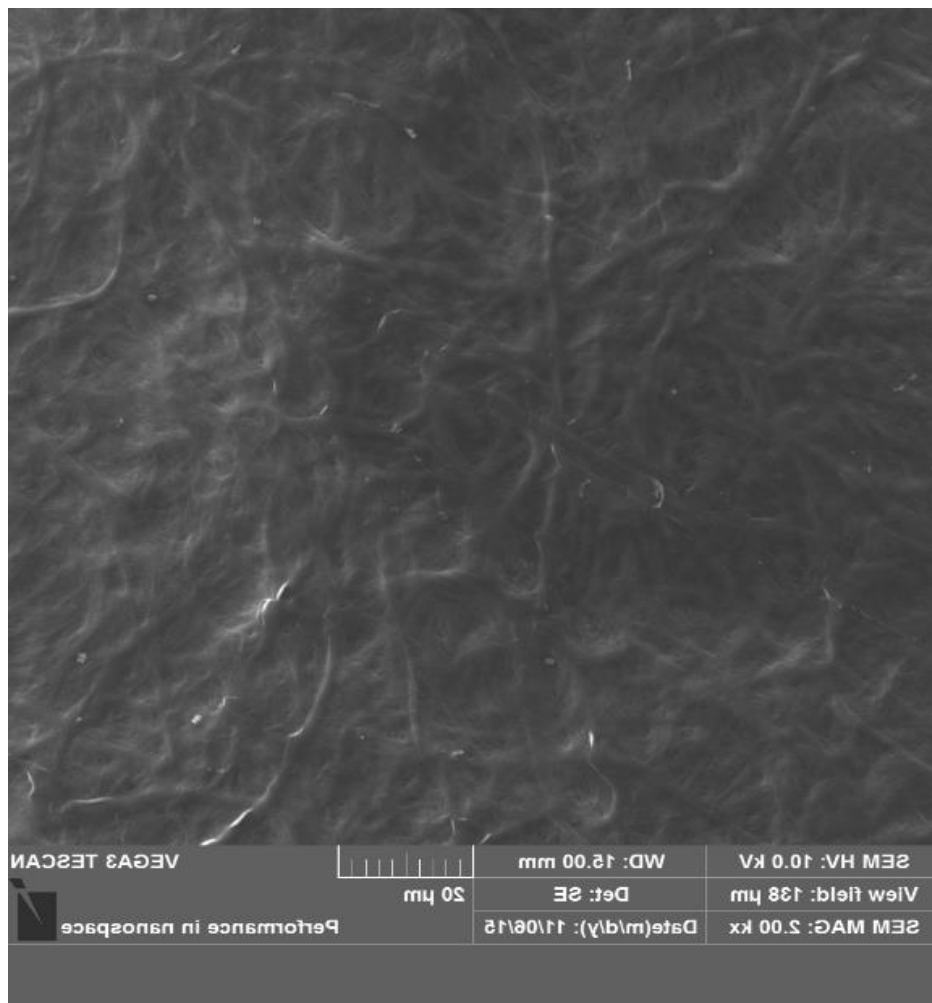
PPBR13c



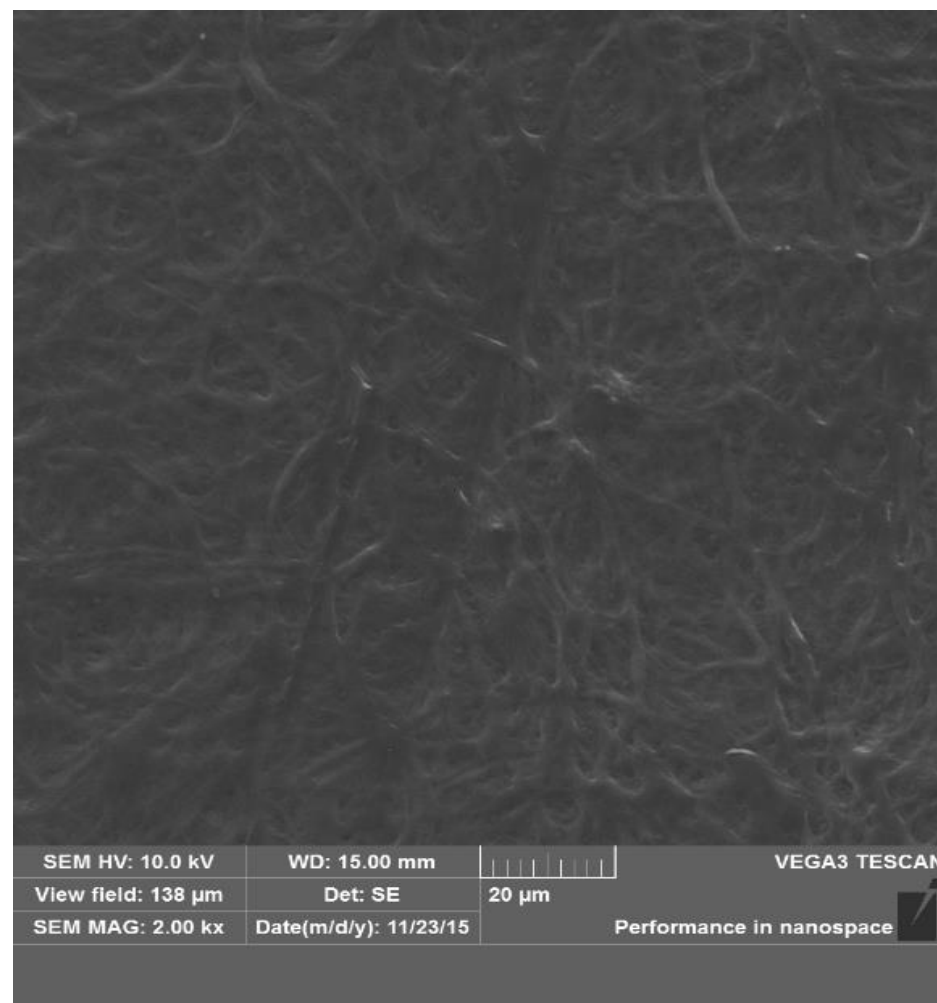
PPB13d

Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polipropileno, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *Bacillus cereus*

Nota: **PPBR13c** - PP + *Bacillus cereus* + Ramnolipídeo 0,45%; **PPB13d** - PP + *Bacillus cereus*

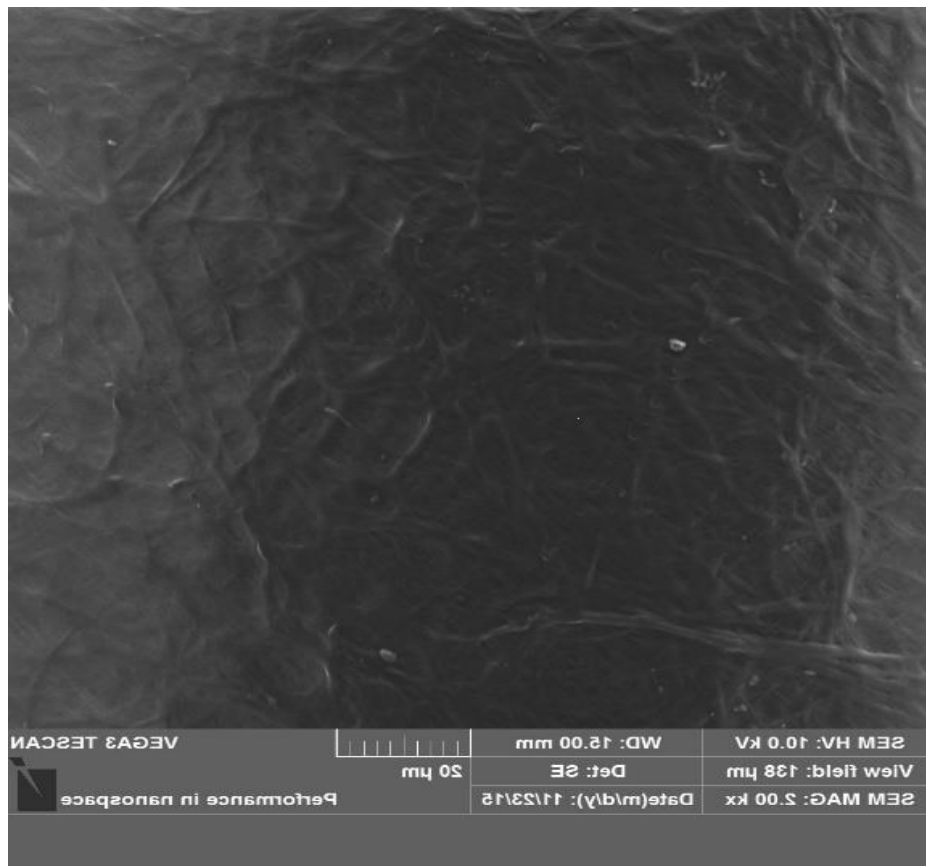


PEAD14a

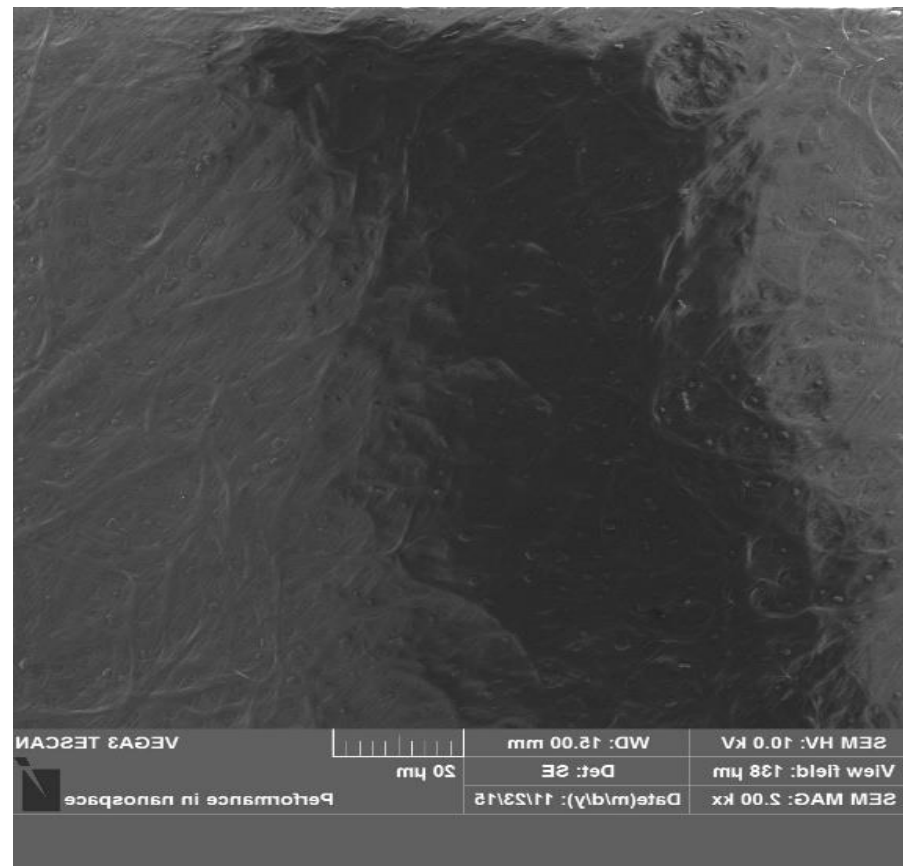


PEADSS14b

Nota: **PEAD14a** - PEAD controle; **PEADSS14b** - PEAD + *Salmonella* sp. + Surfactina 0,1%;



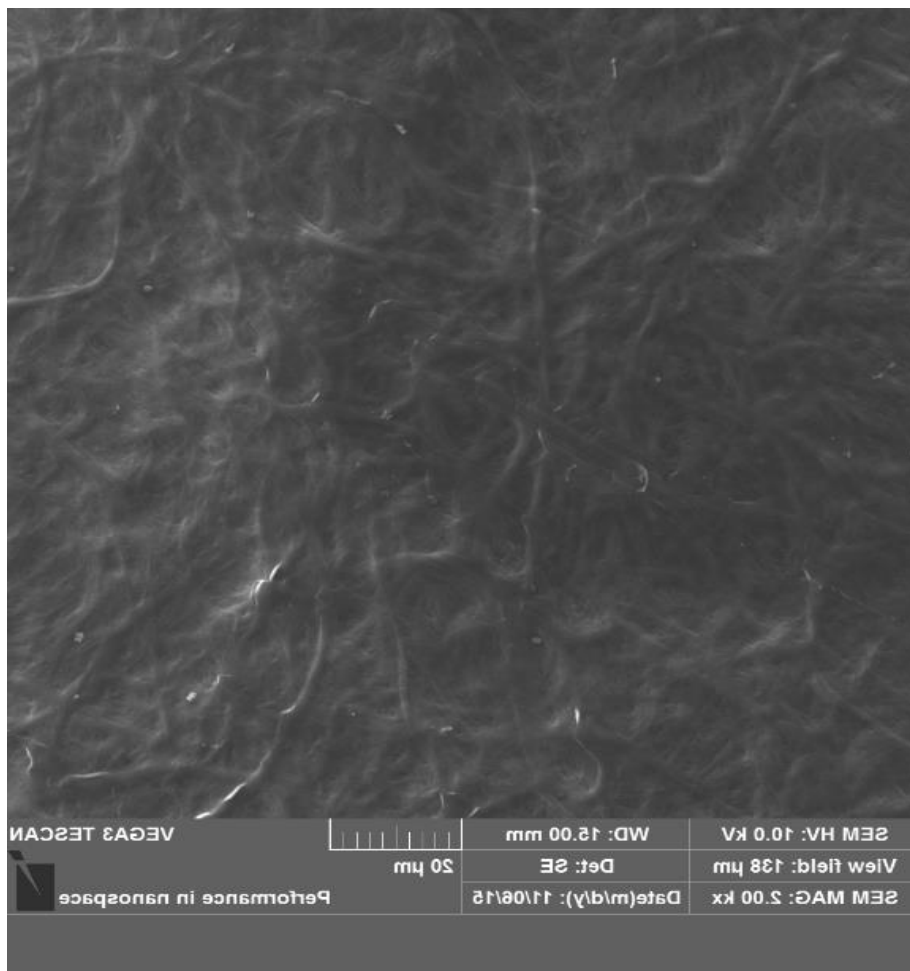
PEADSR14c



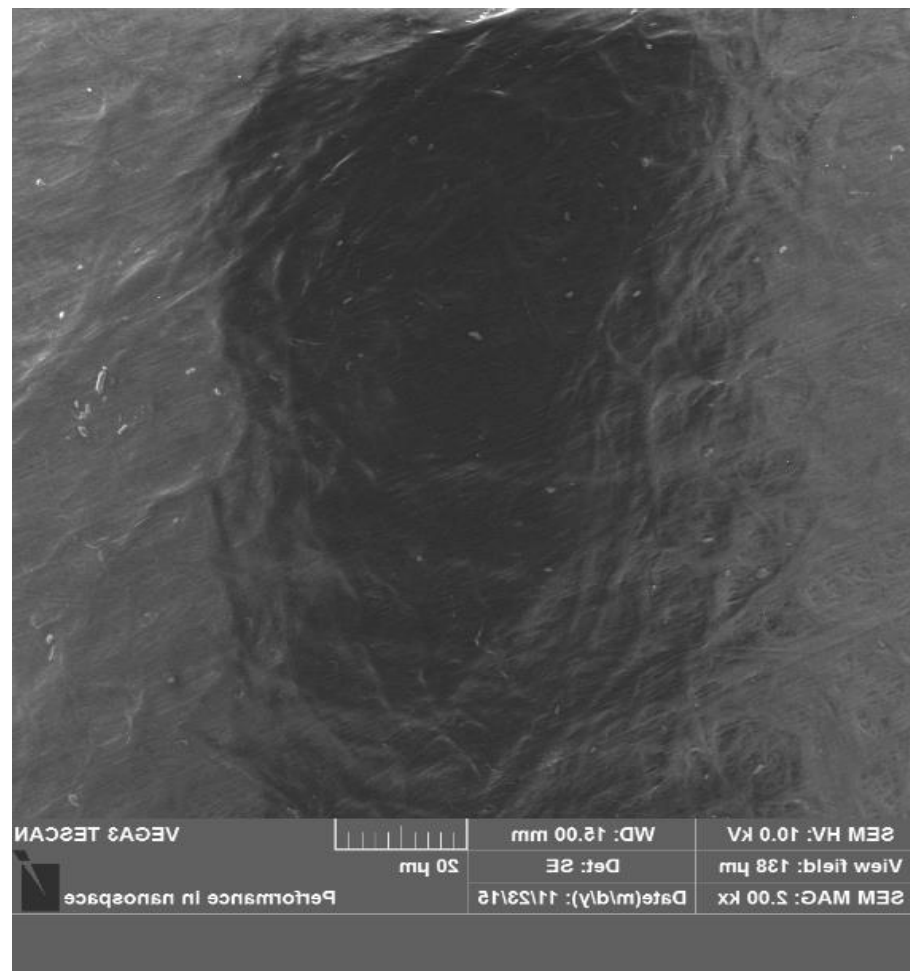
PEADS14d

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de alta densidade, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *Salmonella sp.*

Nota: **PEADSR14c** - PEAD + *Salmonella sp.* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEADS14d** - PEAD + *Salmonella sp.*

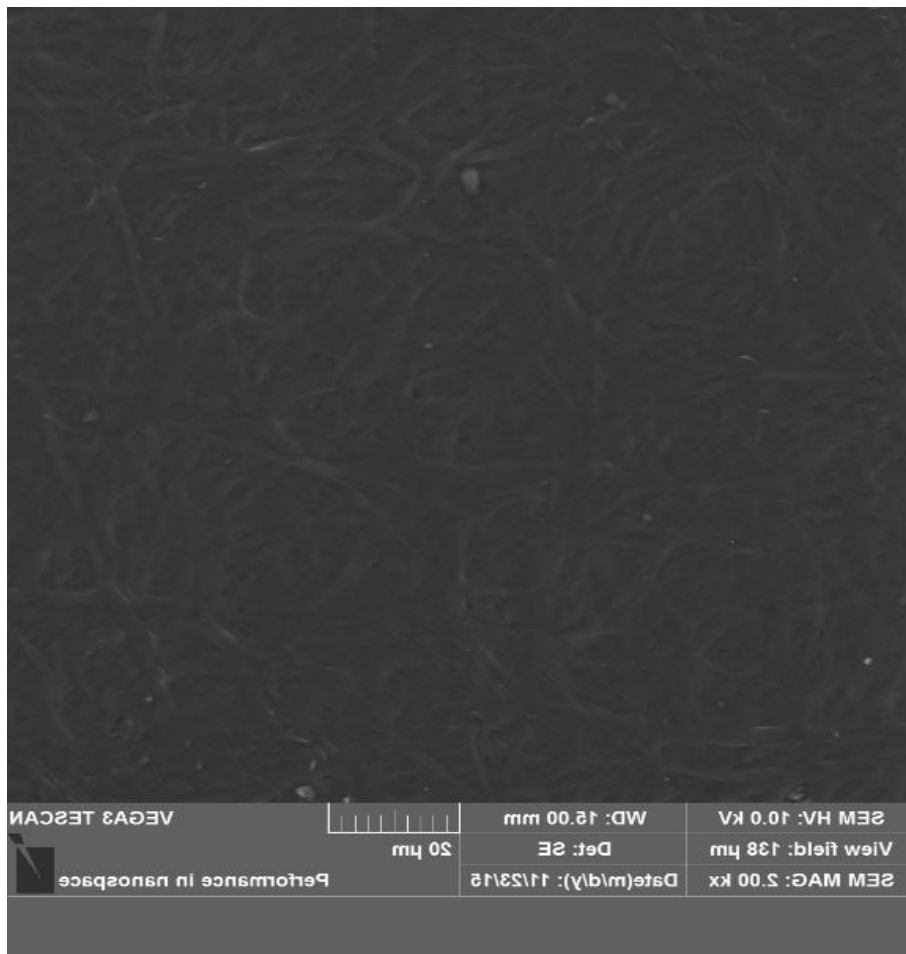


PEAD15a

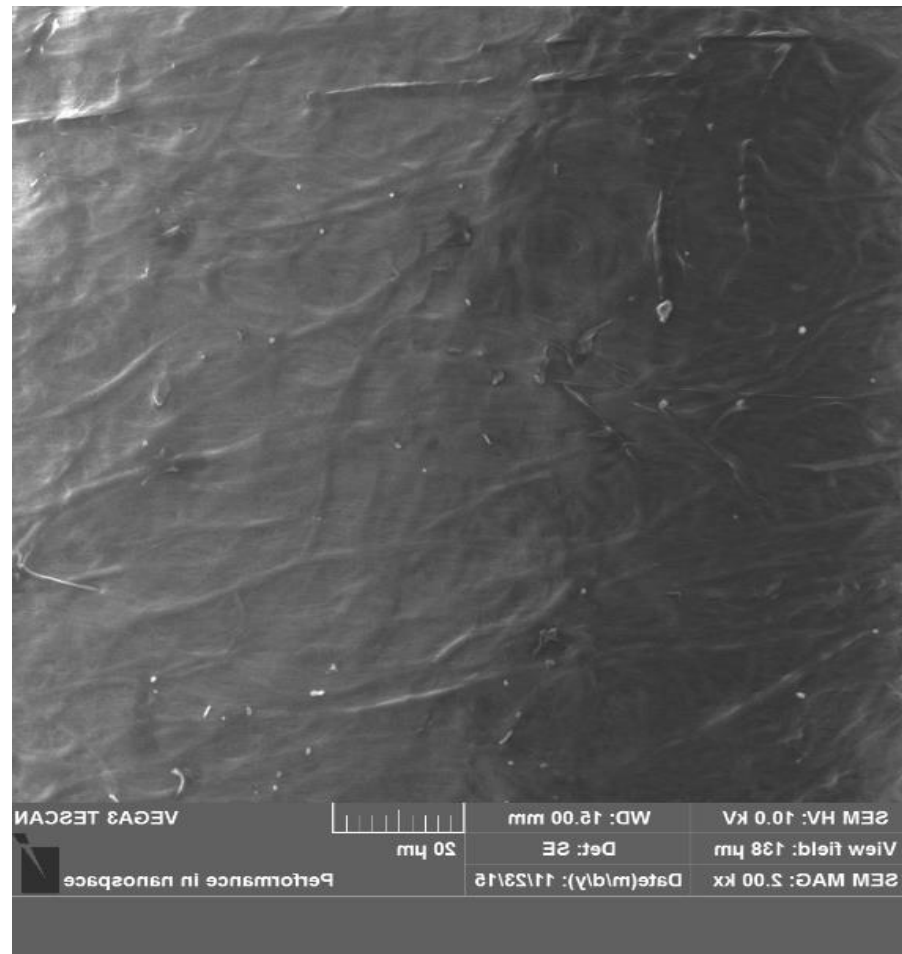


PEADES15a

Nota: **PEAD15a** - PEAD controle; **PEADEBS15b** - PEAD + *E.coli* + Surfactina 0,1%;



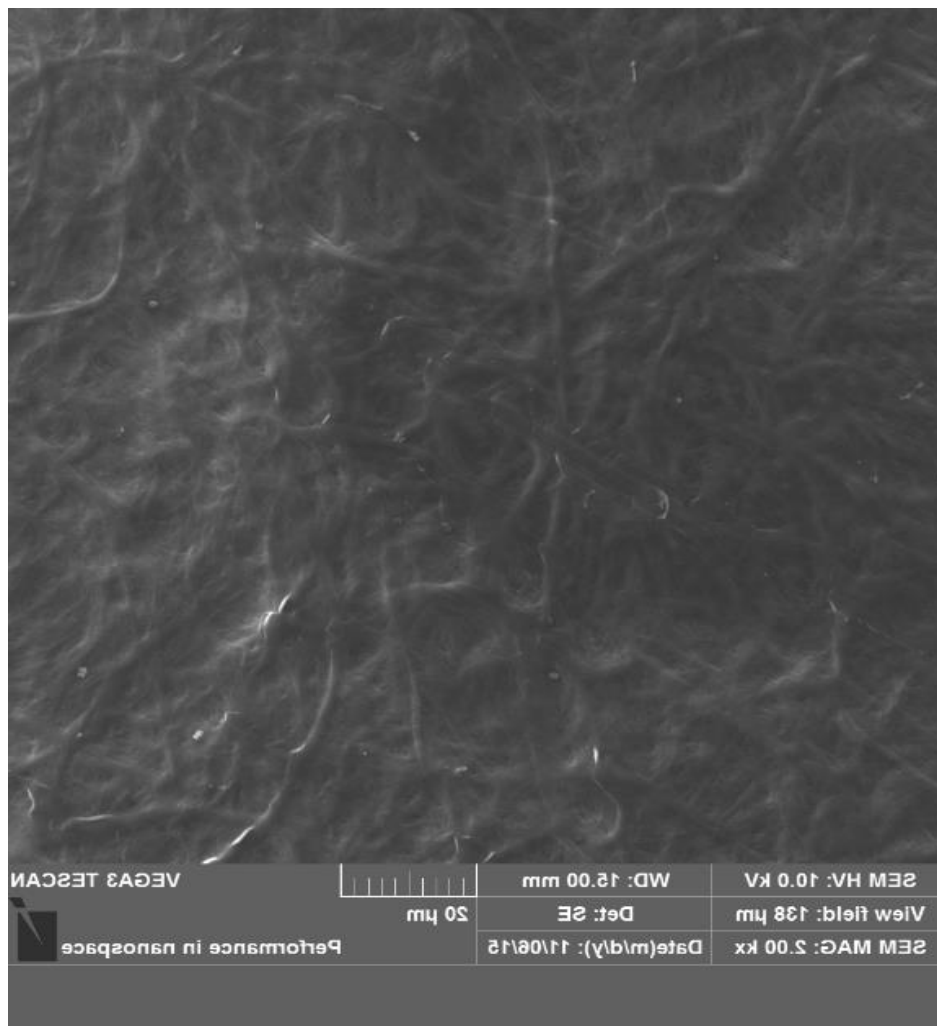
PAEDER15c



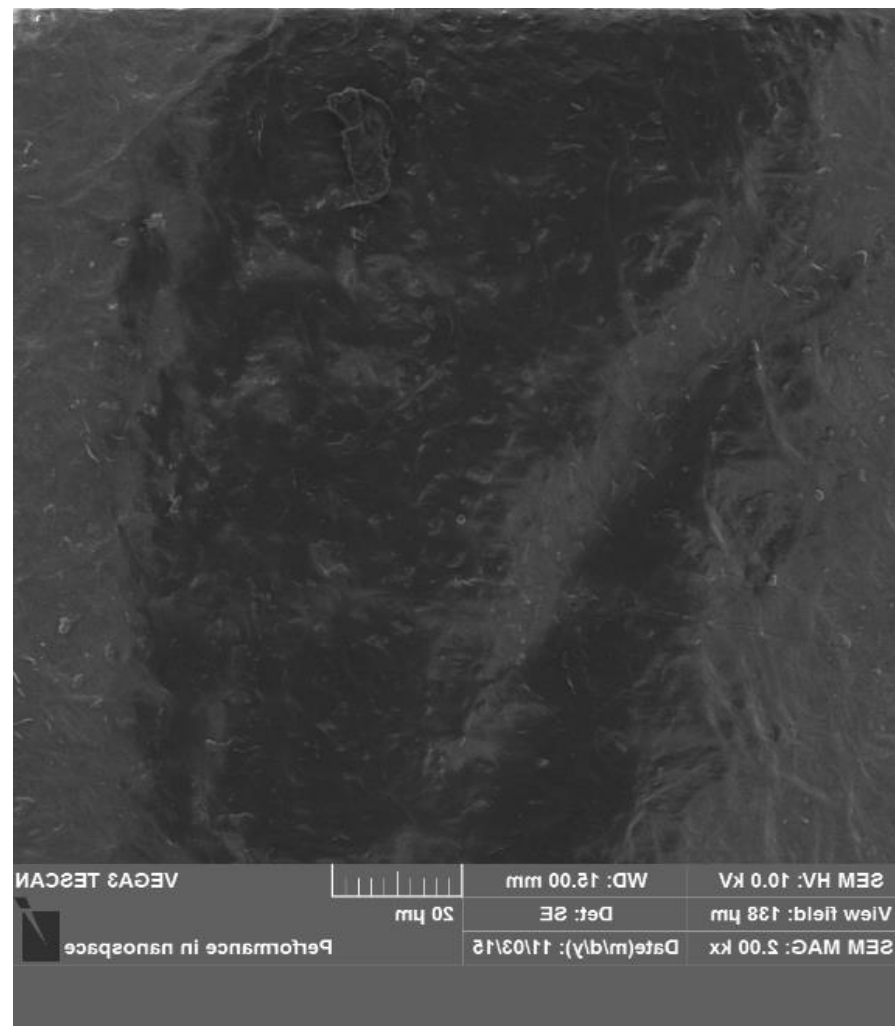
PEADE15d

Figura 17 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de alta densidade, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *E.coli*

Nota: **PAEDER15c** - PEAD + *E.coli* + Ramnolípido 0,45%; **PEADE15d** - PEAD + *E.coli*.

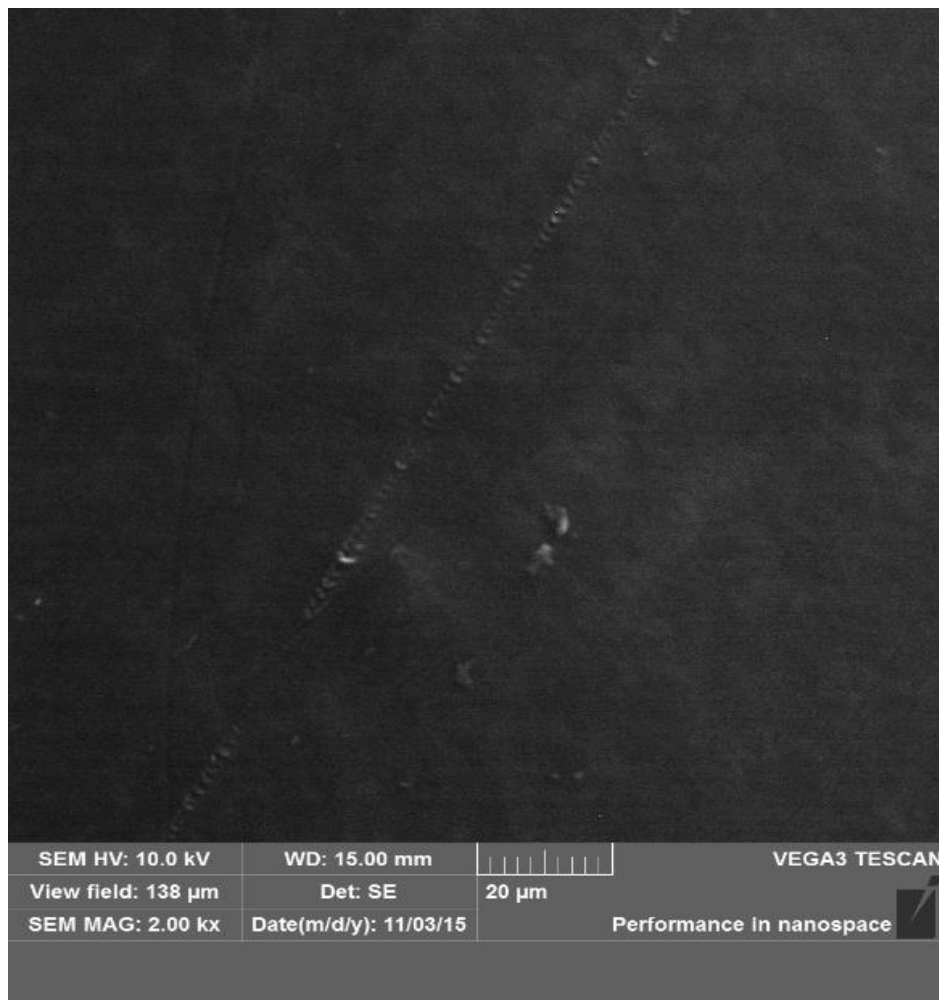


PEAD16a

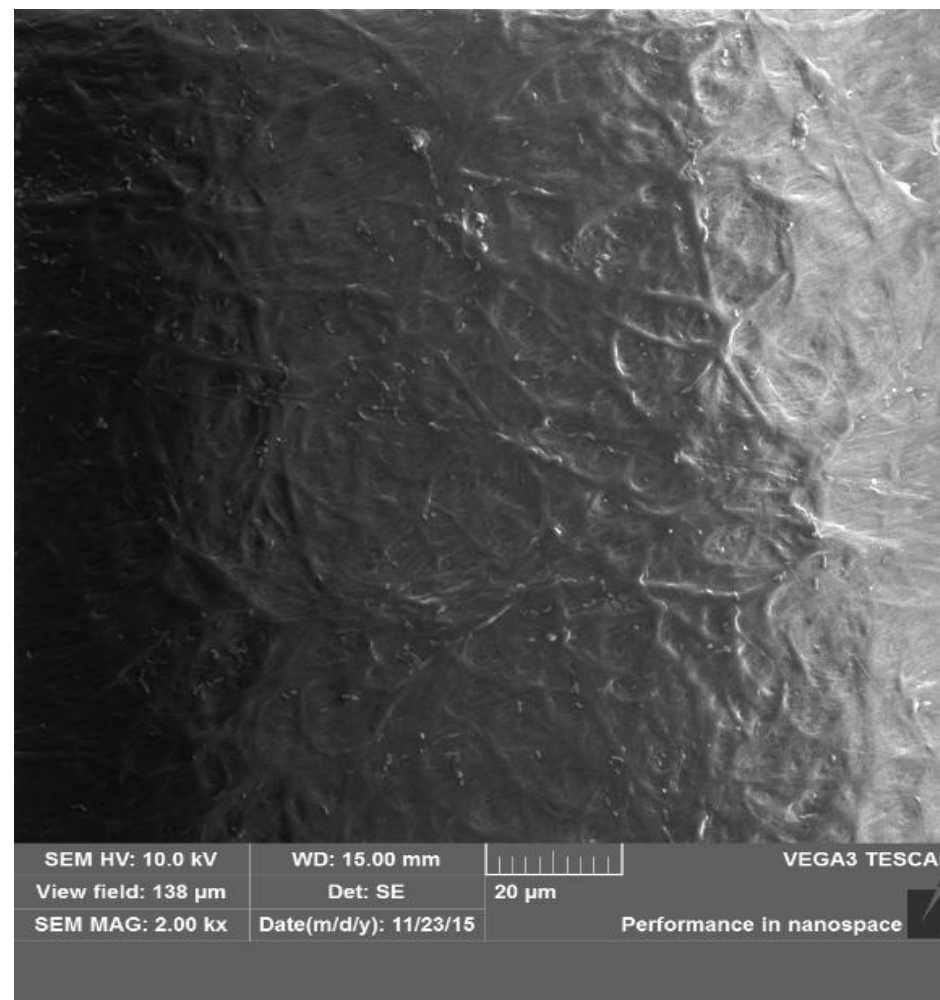


PEADPS16b

Nota: **PEAD16a** - PEAD controle; **PEADPS16b** - PEAD + *P.aeruginosa* + Surfactina 0,1%



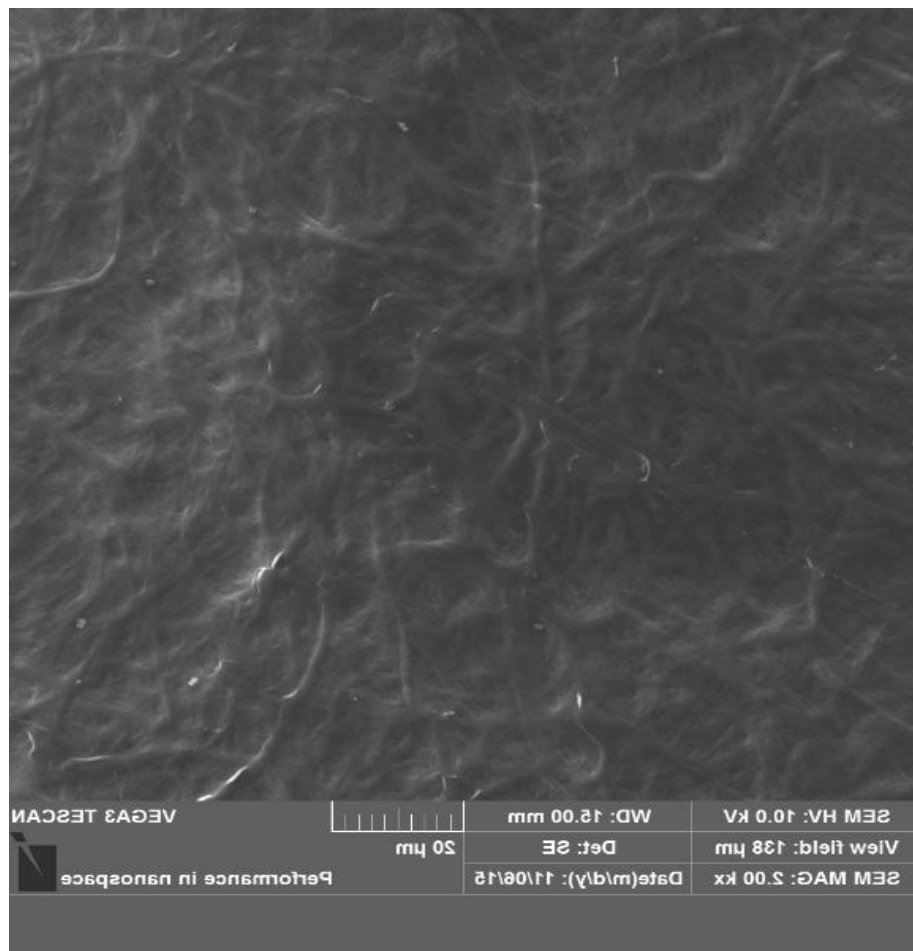
PEADPR16c



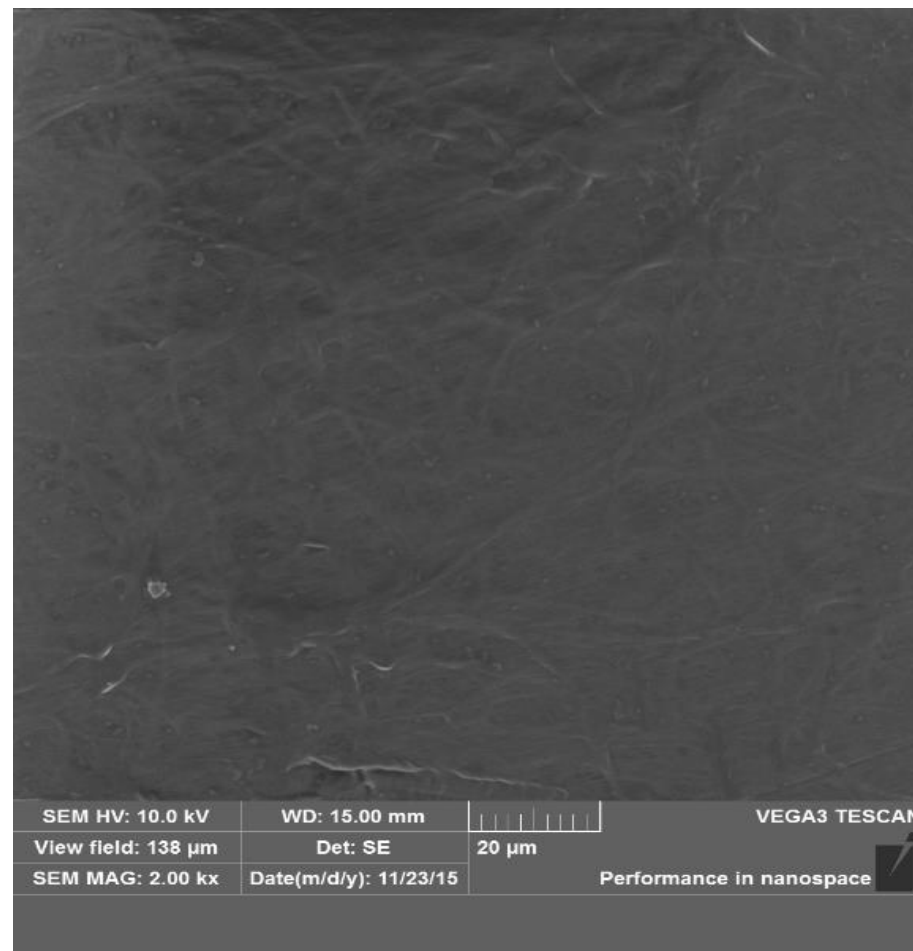
PEADP16d

Figura 18 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de alta densidade, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *P. aeruginosa*

Nota: **PEADPR16c** - PEAD + *P.aeruginosa* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEADP16d** - PEAD + *P.aeruginosa*

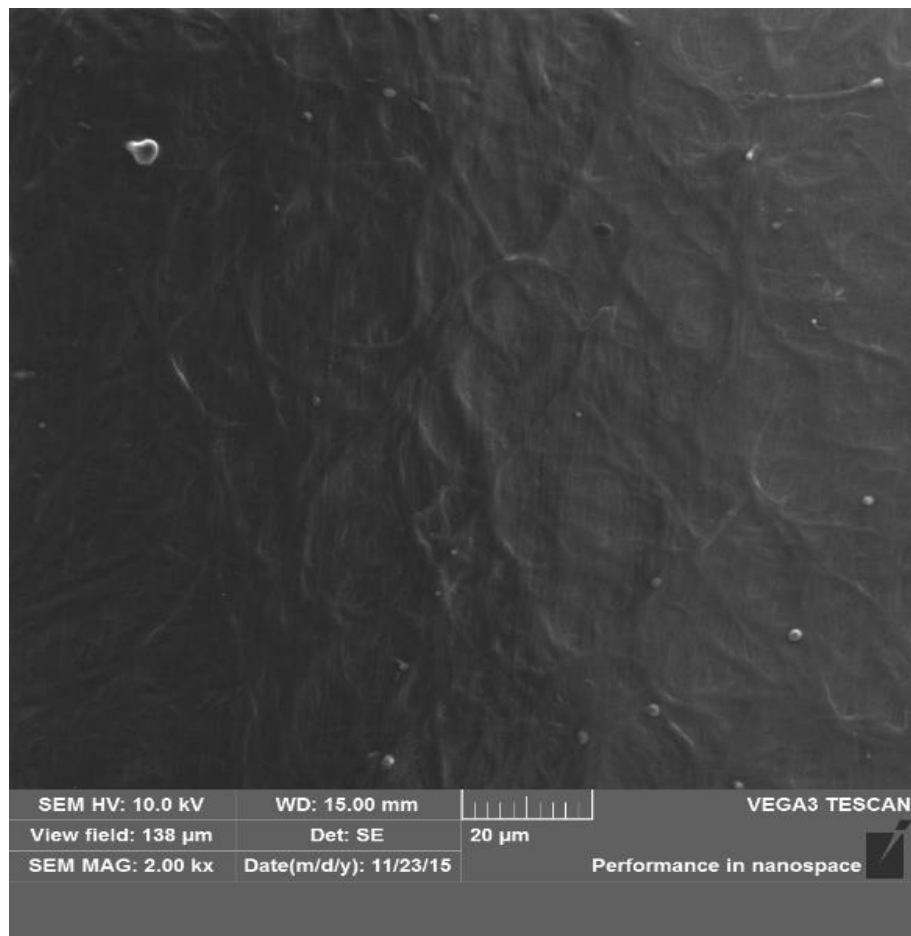


PEAD17a

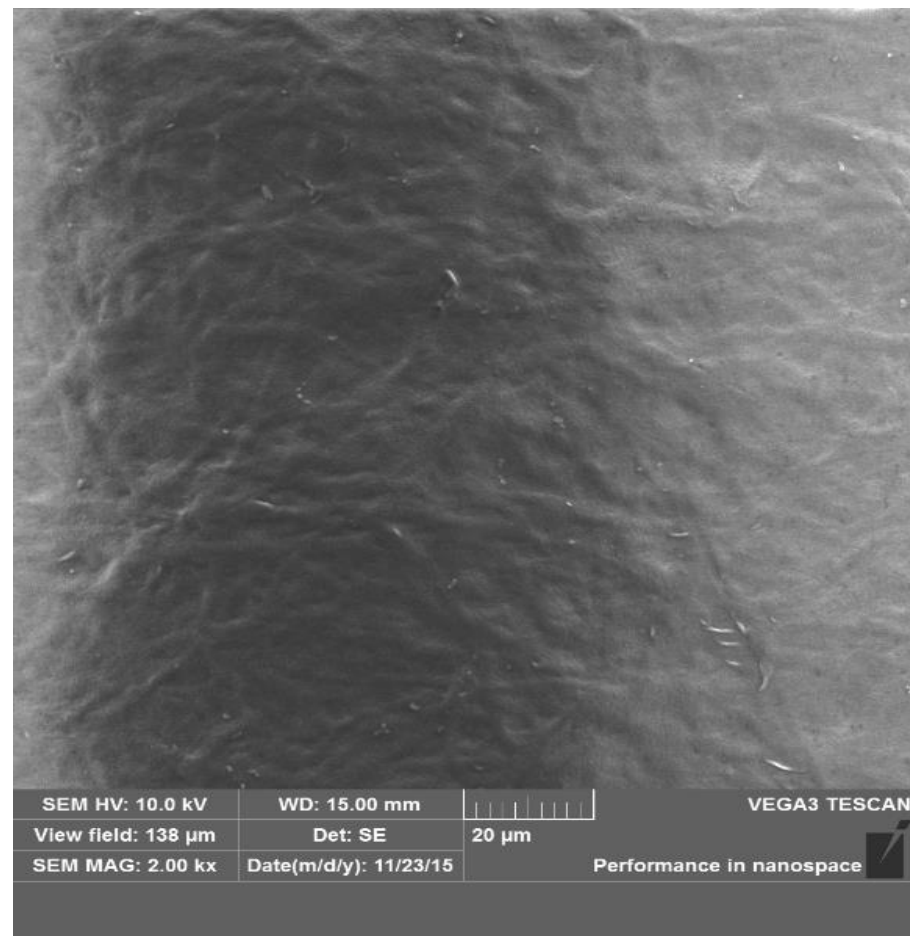


PEADStS17b

Nota: **PEAD17a** - PEAD controle; **PEADStS17b** - PEAD + *S. aureus* + Surfactina 0,1%



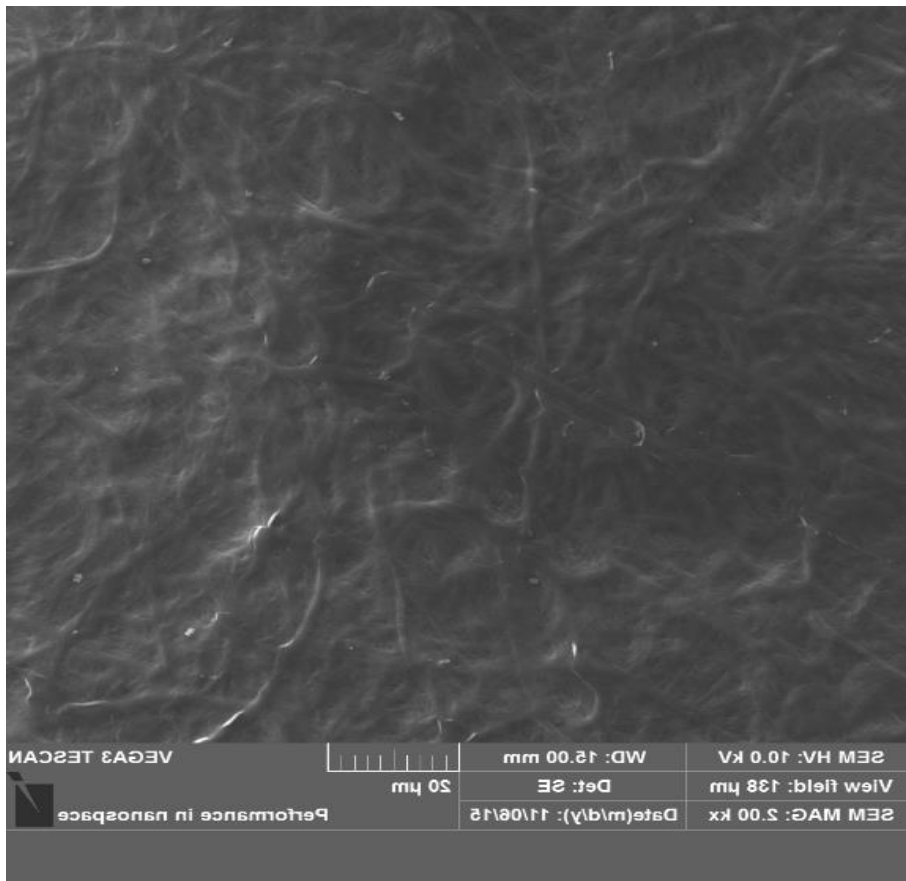
PEADStR17c



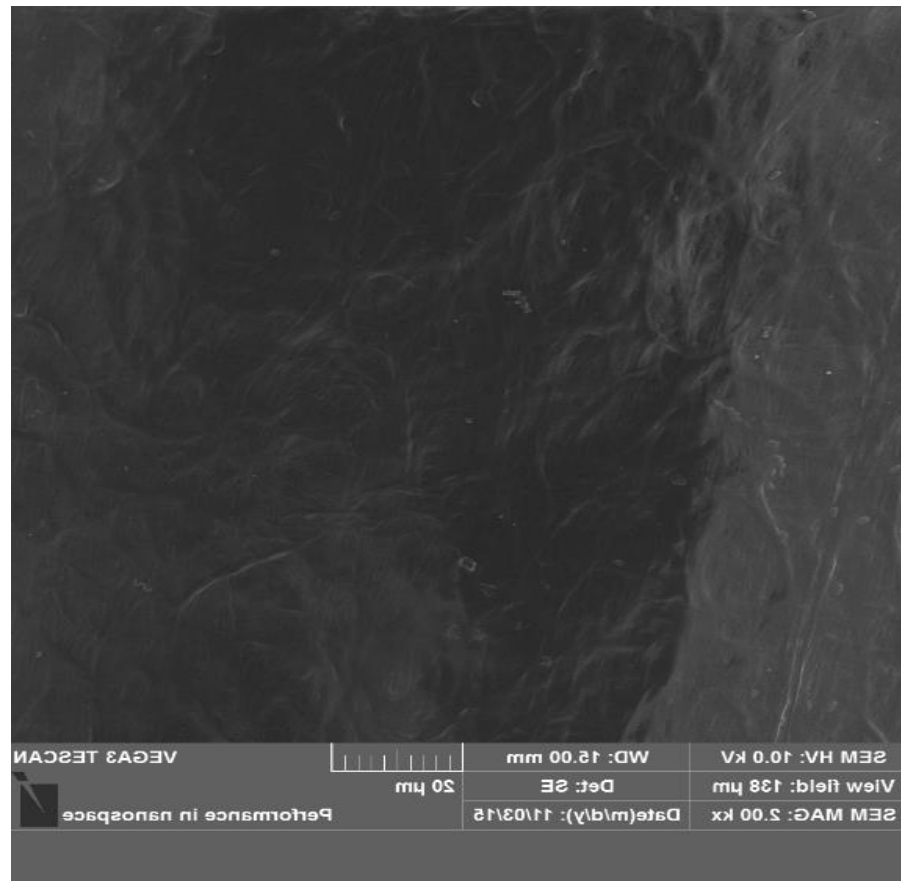
PEADStR17d

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de alta densidade, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *S. aureus*

Nota: **PEADStR17c** - PEAD + *S.aureus* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEADSt17d** - PEAD + *S.aureus*

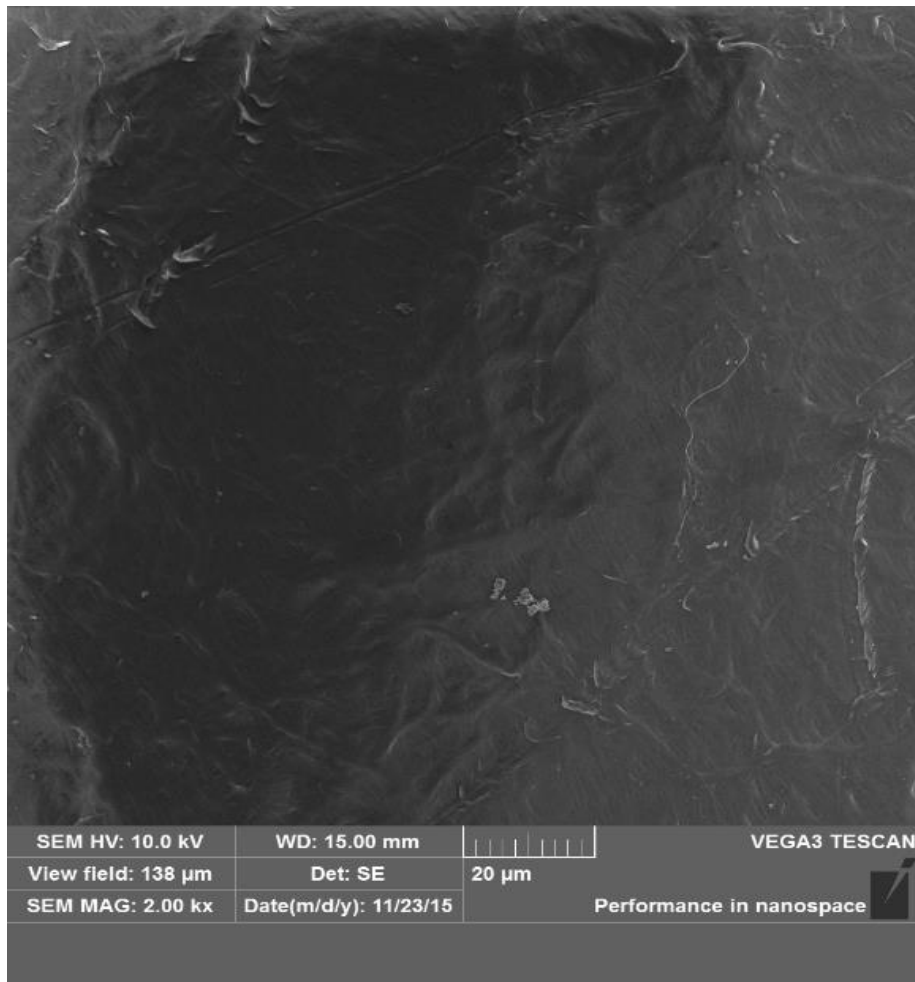


PEAD18a

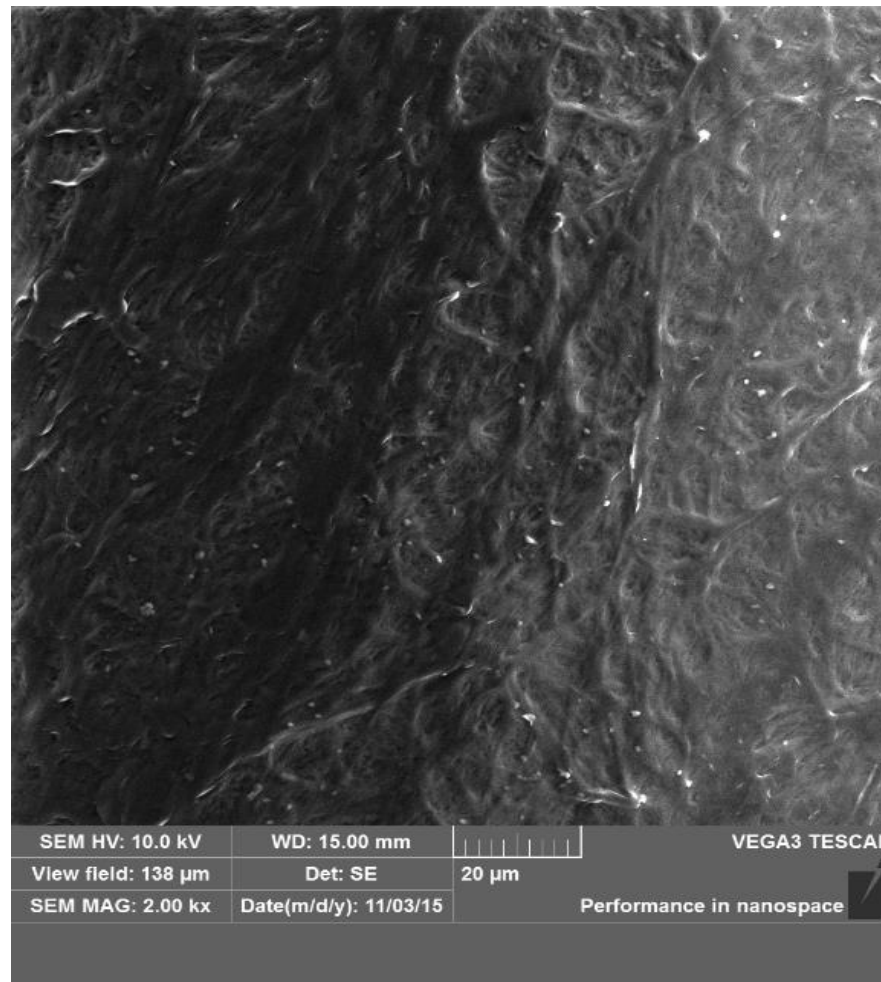


PEADBS18b

Nota: **PEAD18a** - PEAD controle; **PEADBS18b** - PEAD + *B. cereus* + Surfactina 0,1%



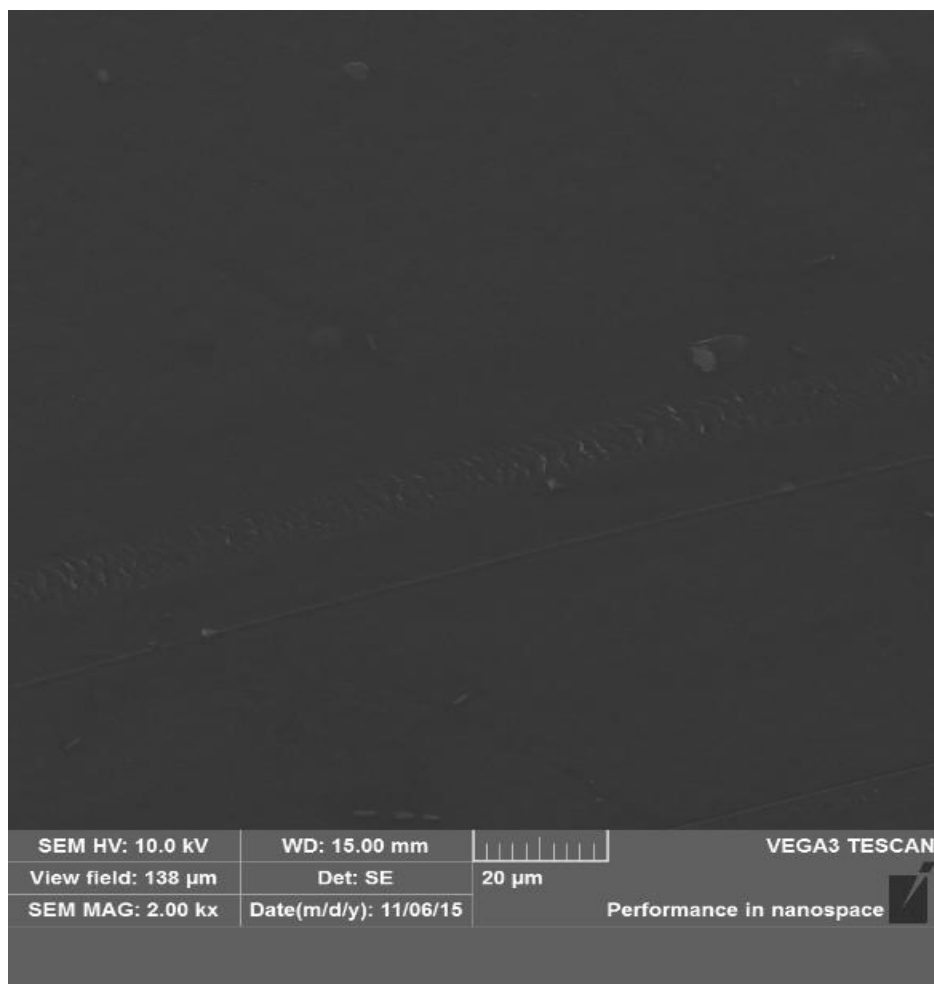
PEADBR18c



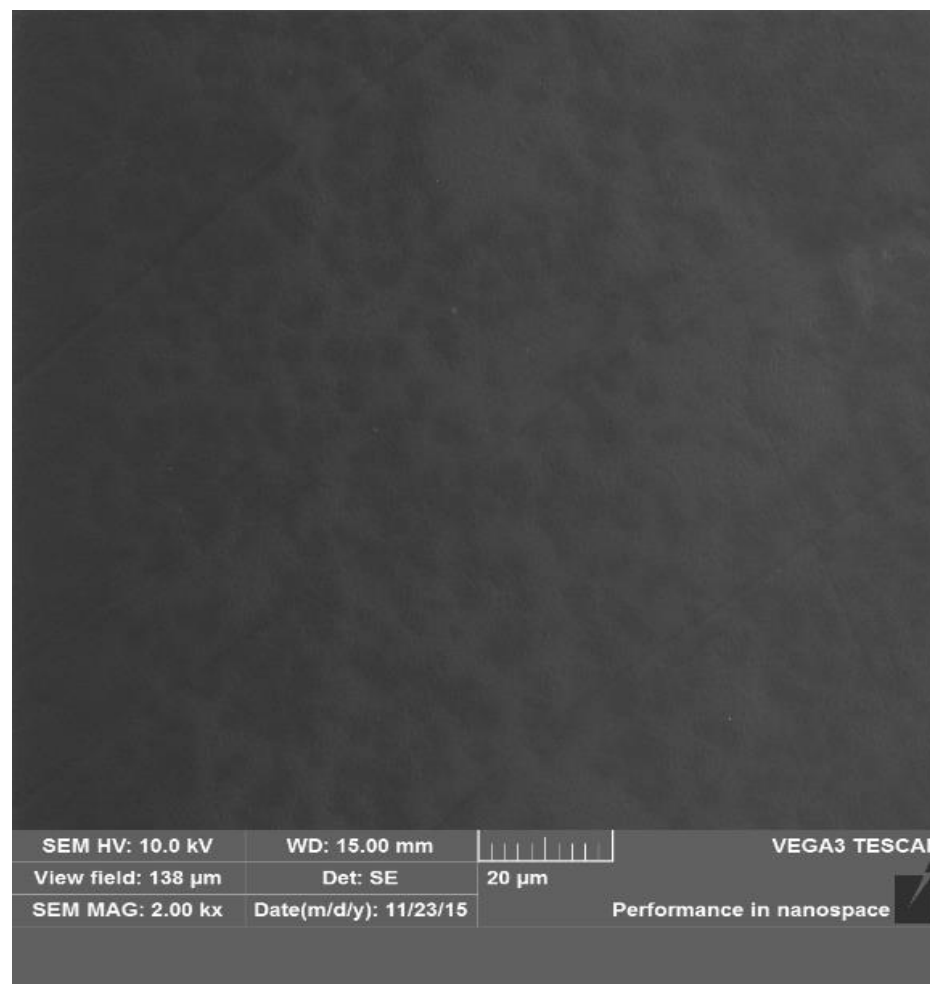
PEADB18d

*Figura 20 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de alta densidade, tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *B.cereus**

Nota: **PEADBR18c** - PEAD + *B. cereus* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEADB18d** - PEAD + *B. cereus*

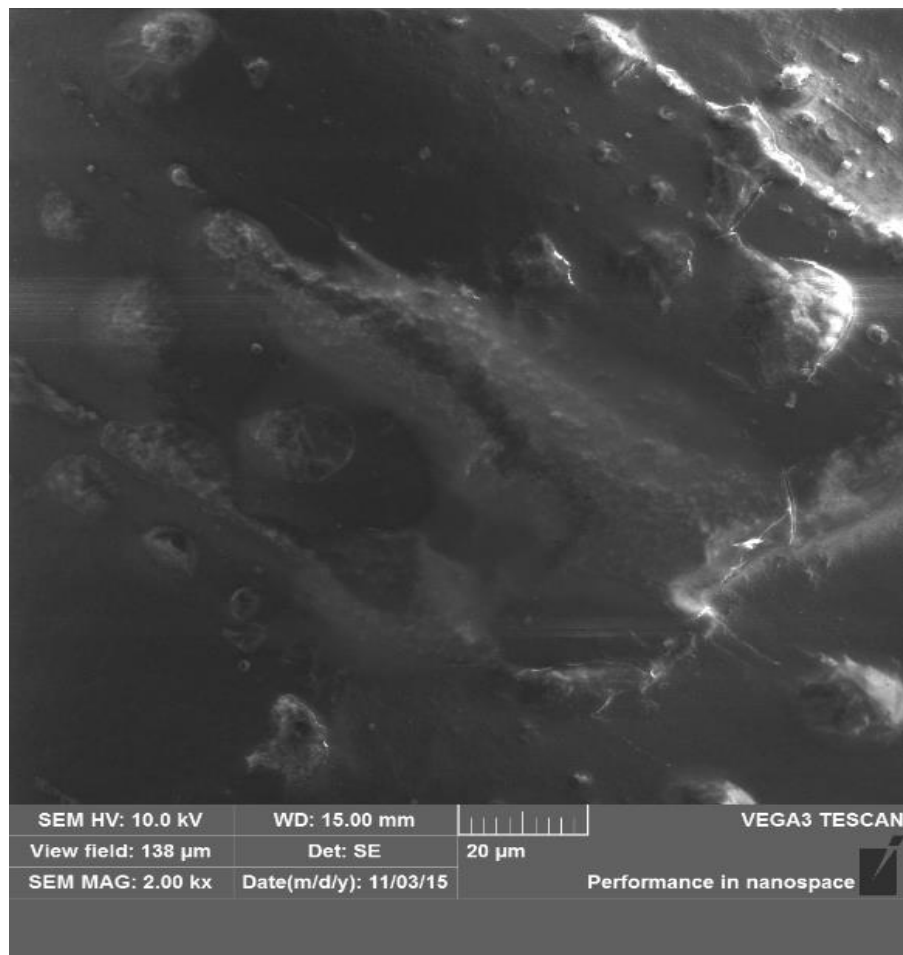


PEBD19a

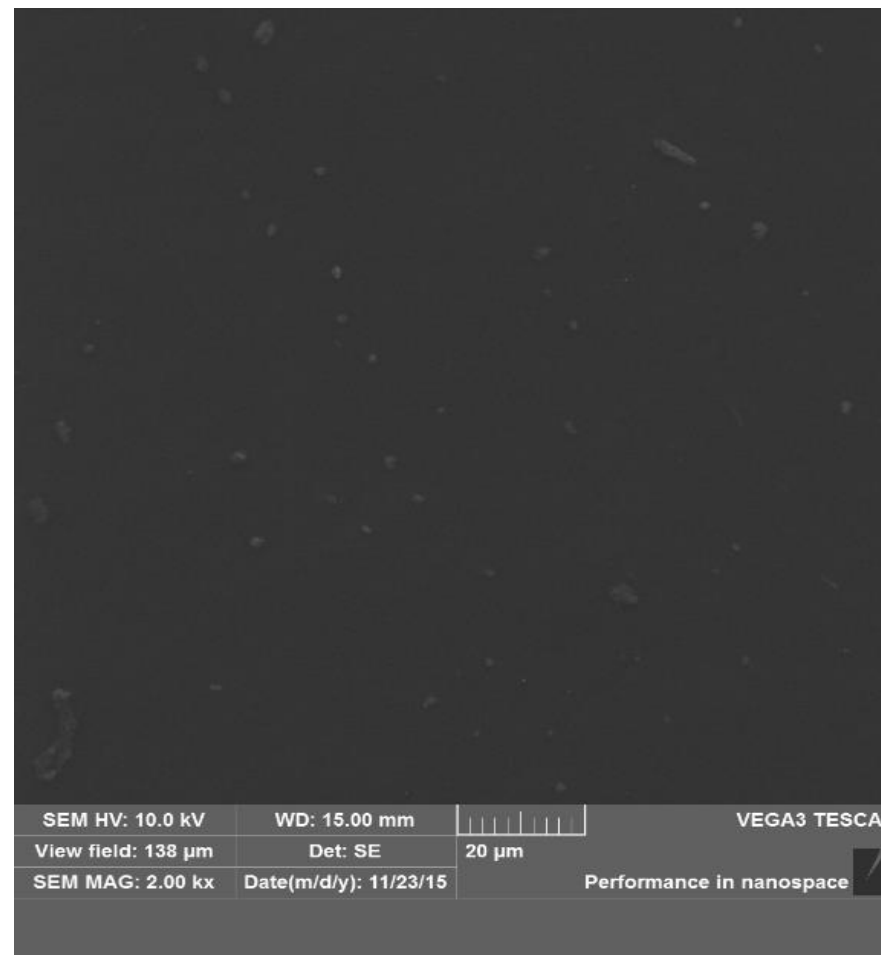


PEBDSS19b

Nota: **PEBD19a** - PEBD controle; **PEBDSS19b** - PEBD + *Salmonella sp.* + Surfactina 0,1%.



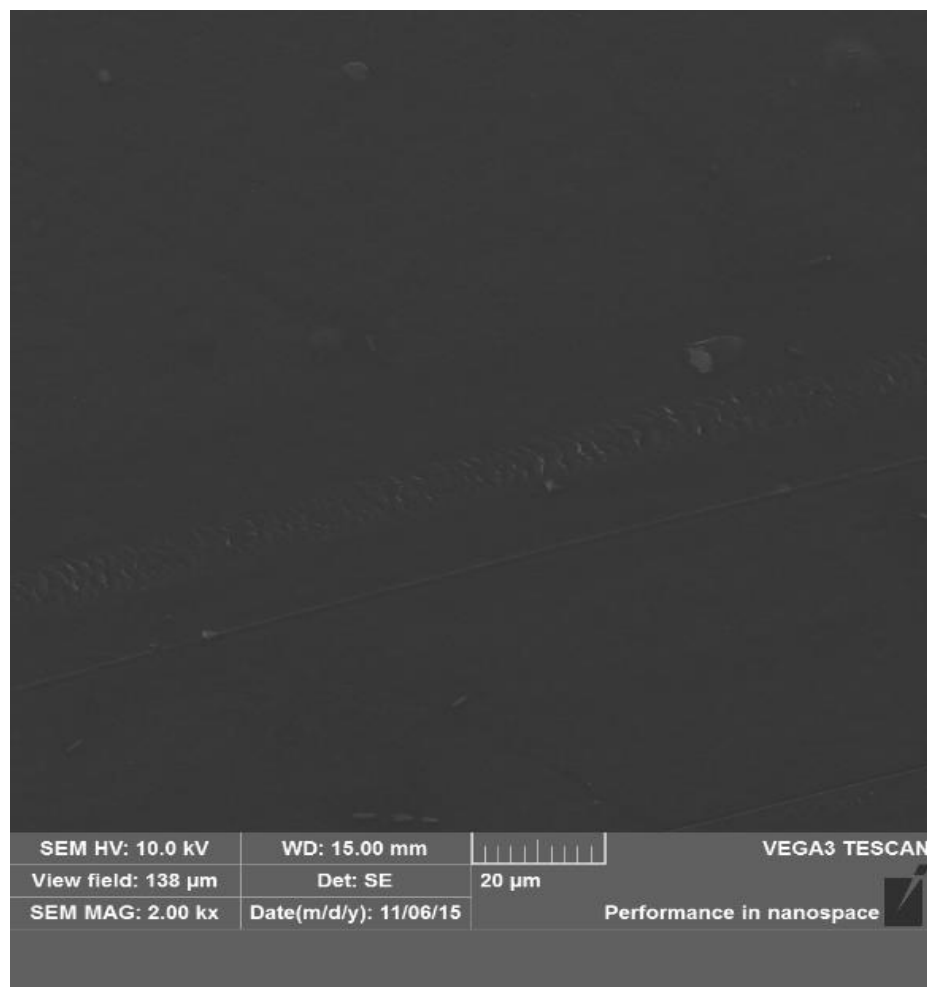
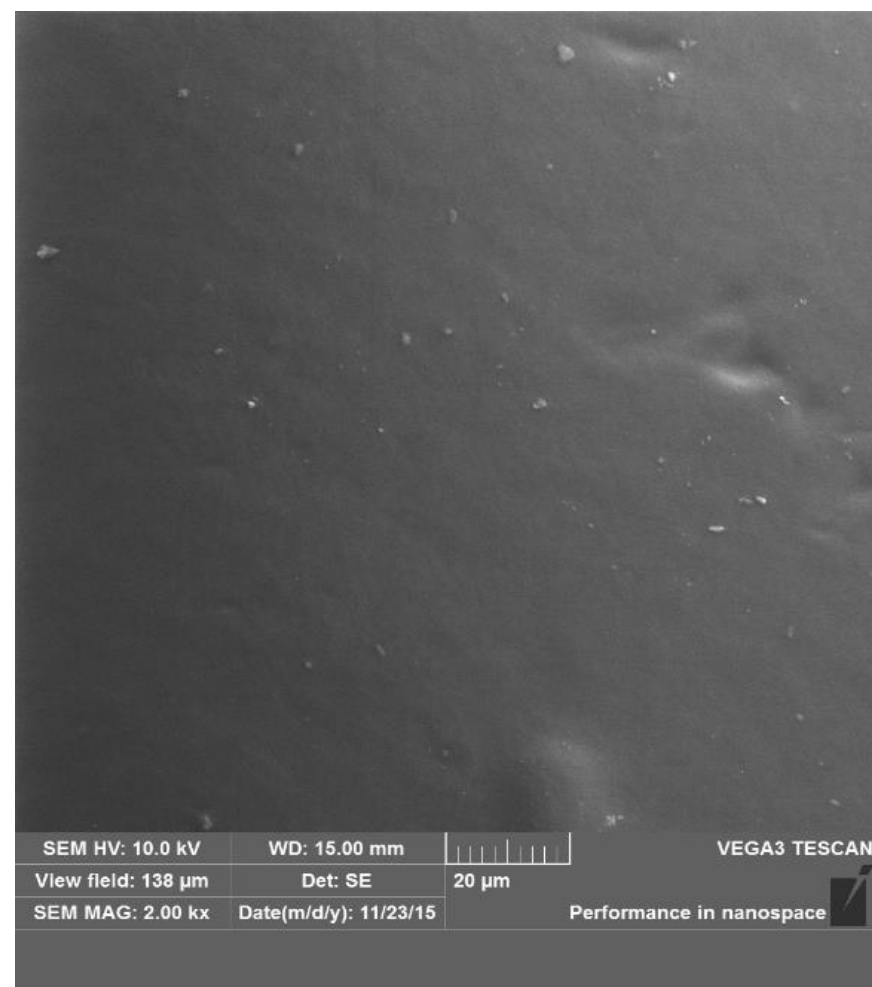
PEBDSR19c



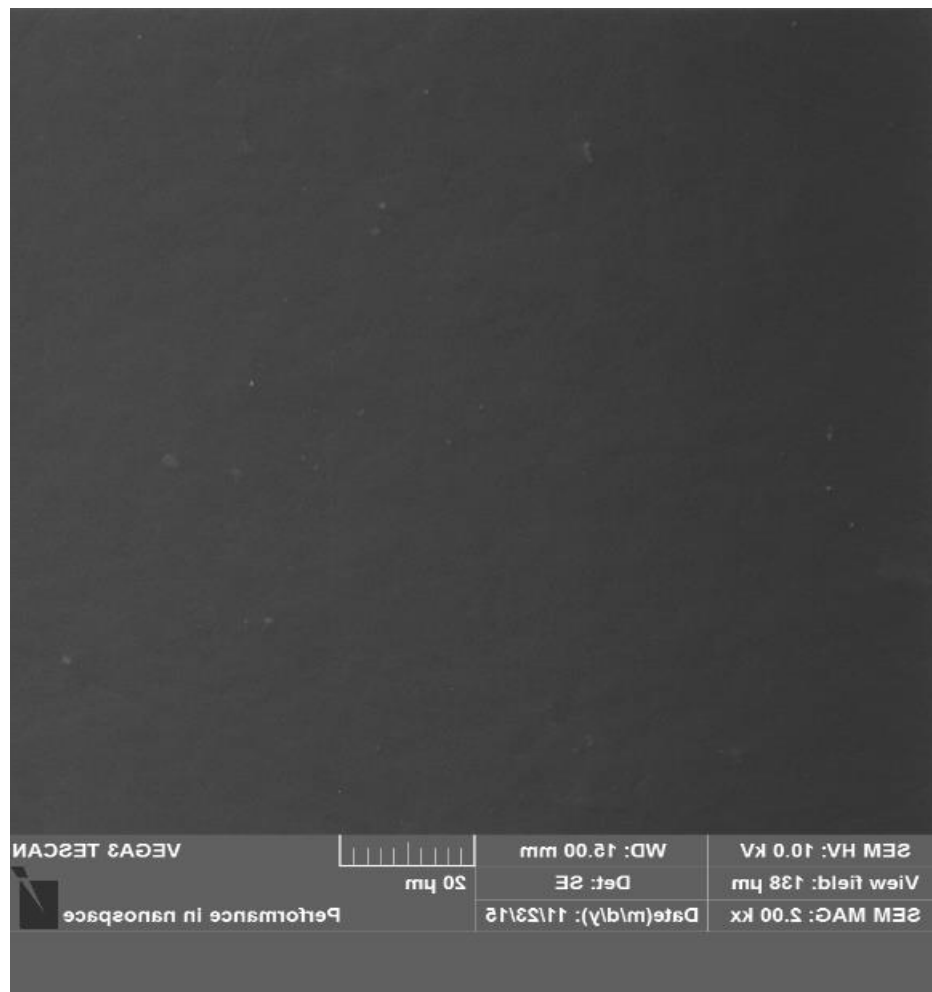
PEBDS19d

Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de baixa densidade (0,05mm),. tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *Salmonella* sp

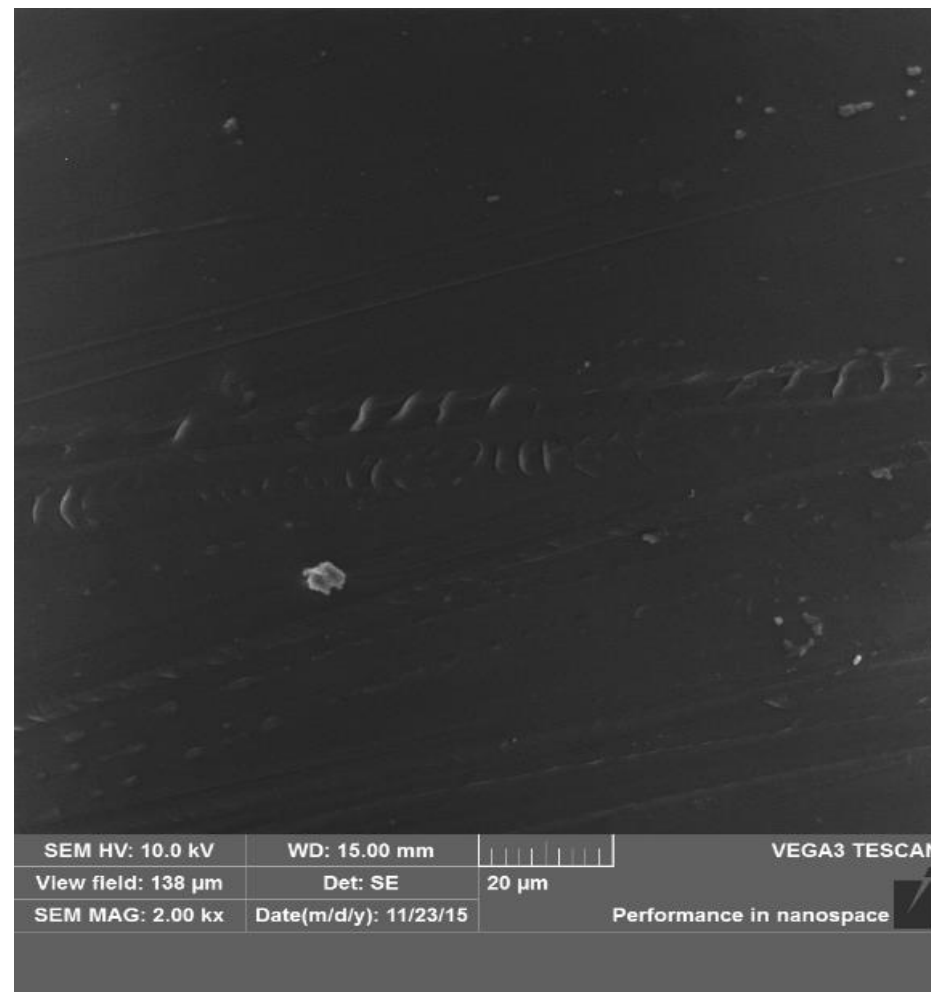
Nota: **PEBDSR19c** - PEBD + *Salmonella* sp. + Ramnolípídeo 0,45%; **PEBDS19d** - PEBD + *Salmonella* sp.

*PEBD20a**PEBDES20b*

Nota: **PEABD20a** - PEBD controle; **PEBDEBS20b** - PEBD + *E.coli* + Surfactina 0,1%



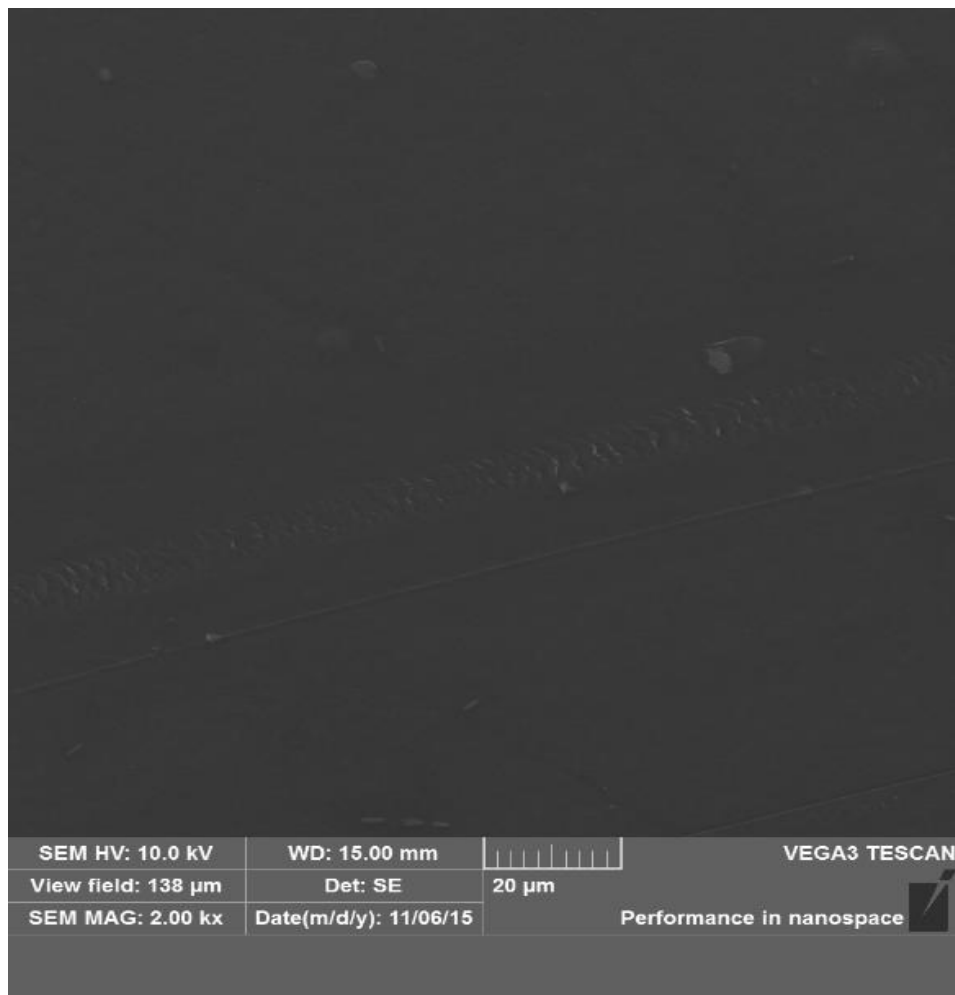
PEBDER20c



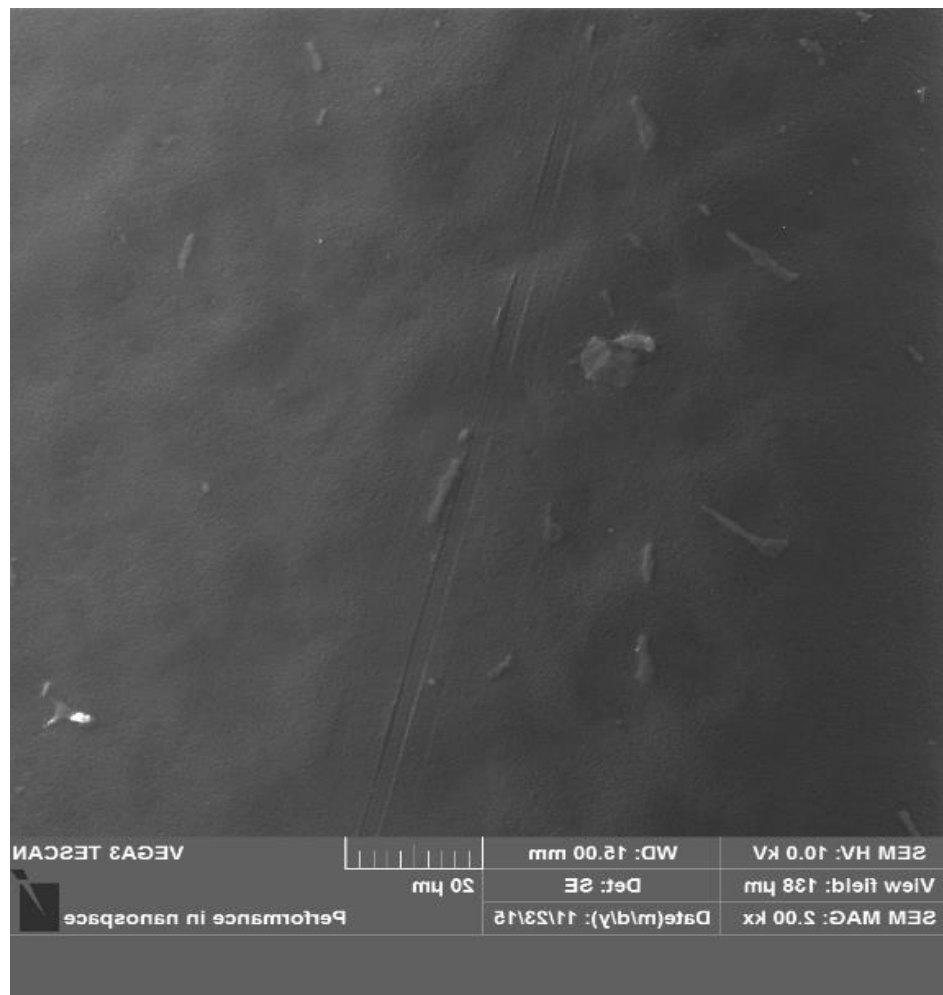
PEBDE20d

Figura 22 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de baixa densidade (0,05mm), tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *E. coli*

Nota: %; **PEBDER20c** - PEBD + *E.coli* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEBDE20d** - PEBD + *E.coli*.



PEBD21a



PEBDPS21b

Nota: **PEBD21a** - PEBD controle; **PEBDPS21b** - PEBD + *P.aeruginosa* + Surfactina 0,1%

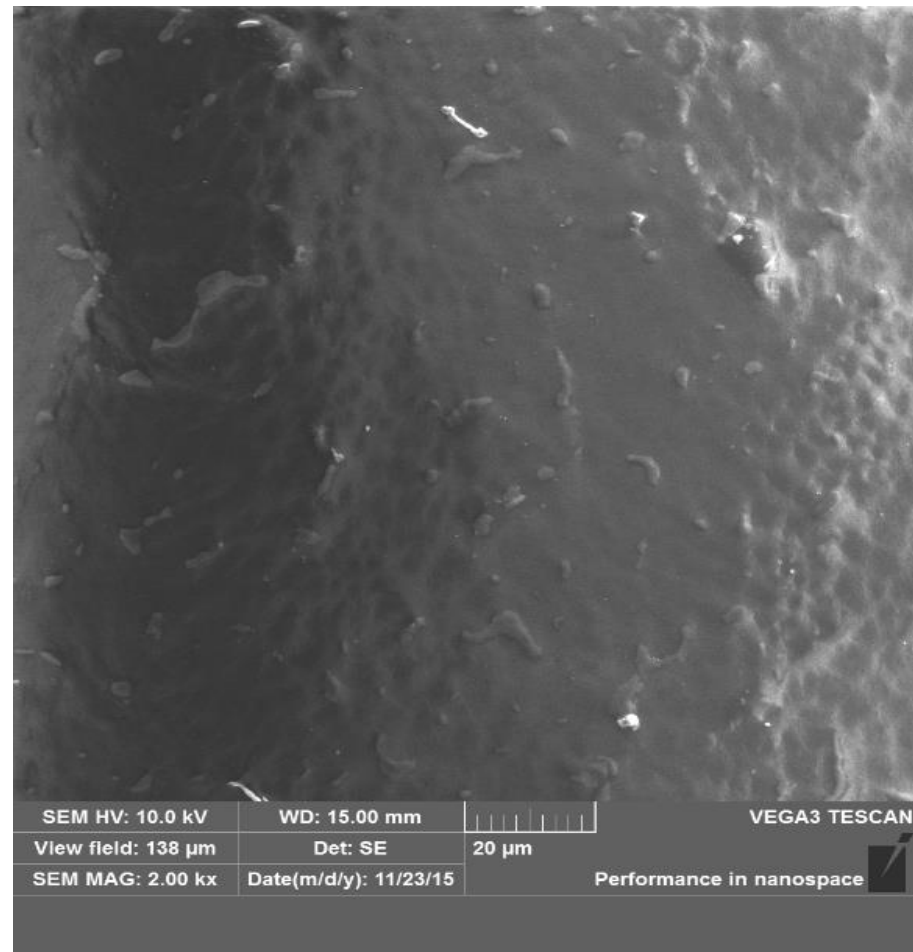
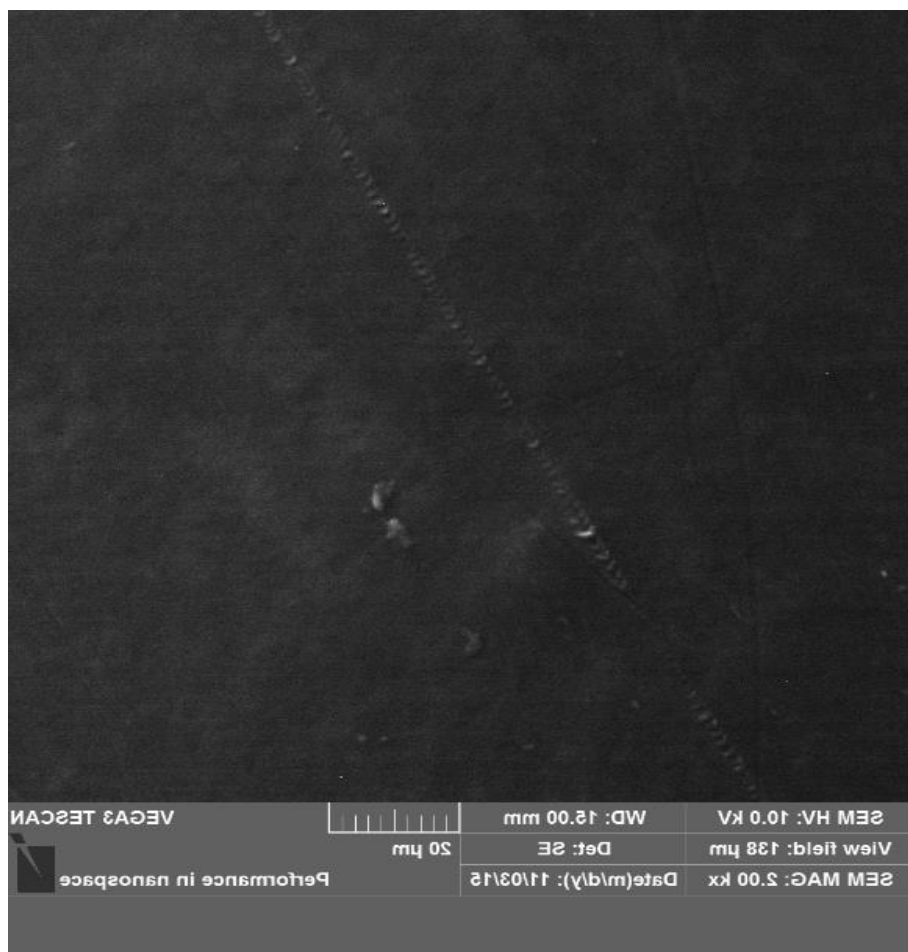
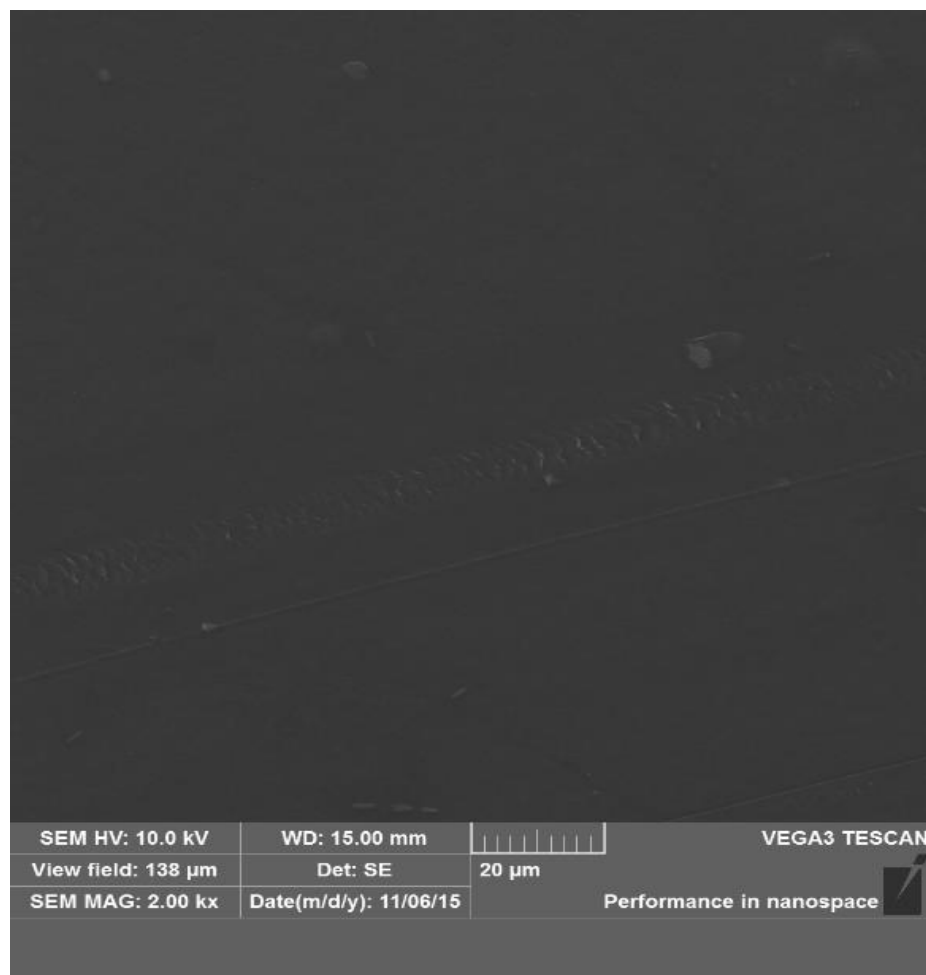
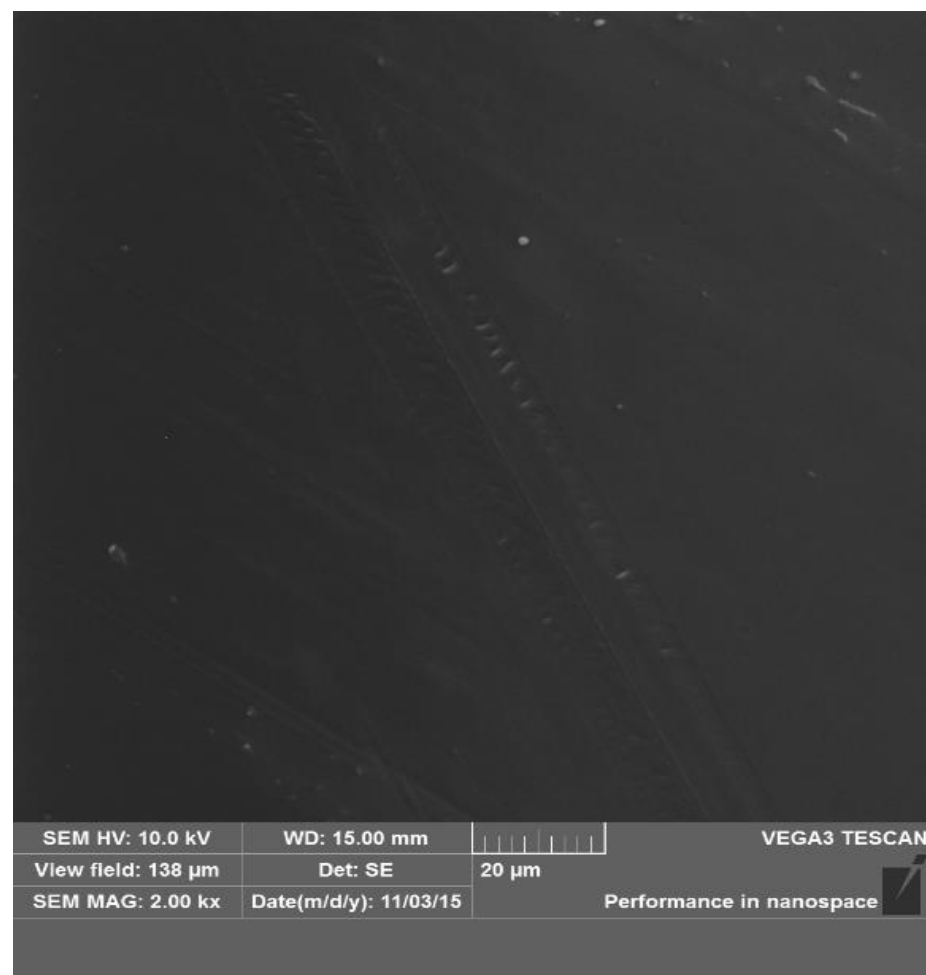


Figura 23 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de baixa densidade (0,05mm), tratados com e sem biosurfactantes, impregnados com *P. aeruginosa*

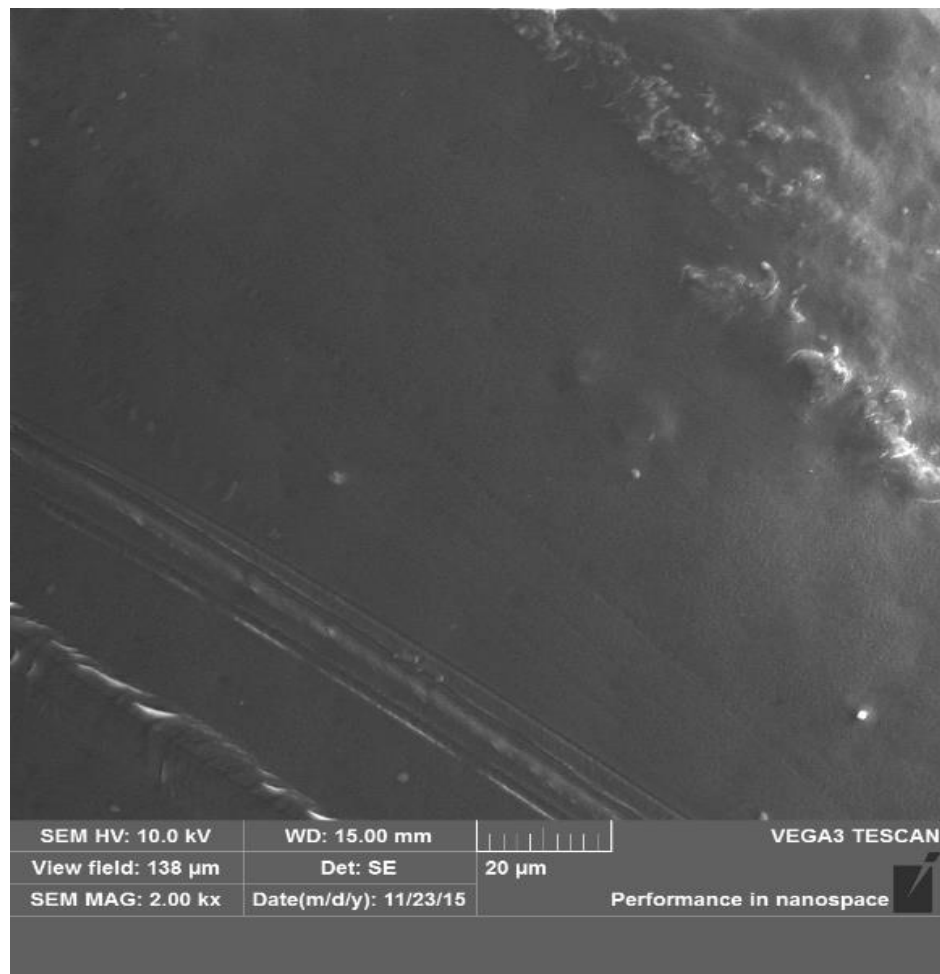
PEBDPR21c

PEBDP21c

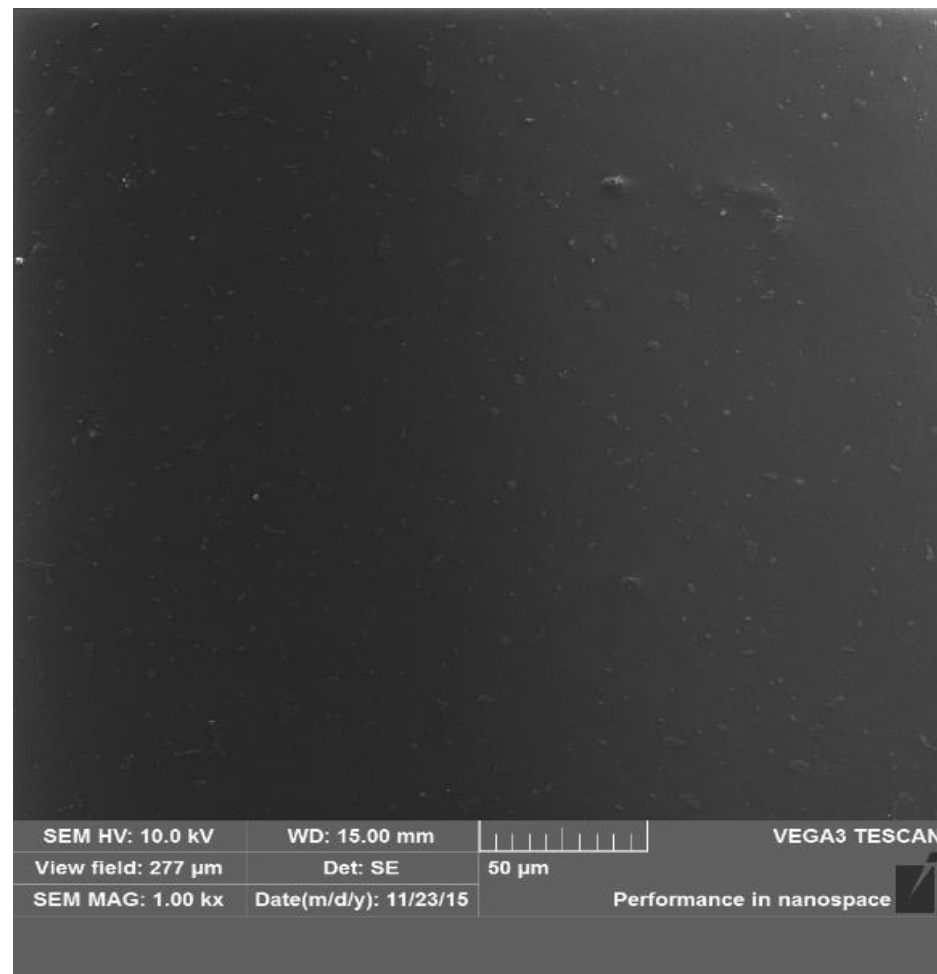
Nota: **PEBDPR21c** - PEBD + *P.aeruginosa* + Ramnolípideo 0,45%; **PEBDP21d** - PEBD + *P.aeruginosa*

*PEBD22a**PEBDStS22b*

Nota: **PEBD22a** - PEBD controle; **PEBDStS22b** - PEBD + *S. aureus* + Surfactina 0,1%



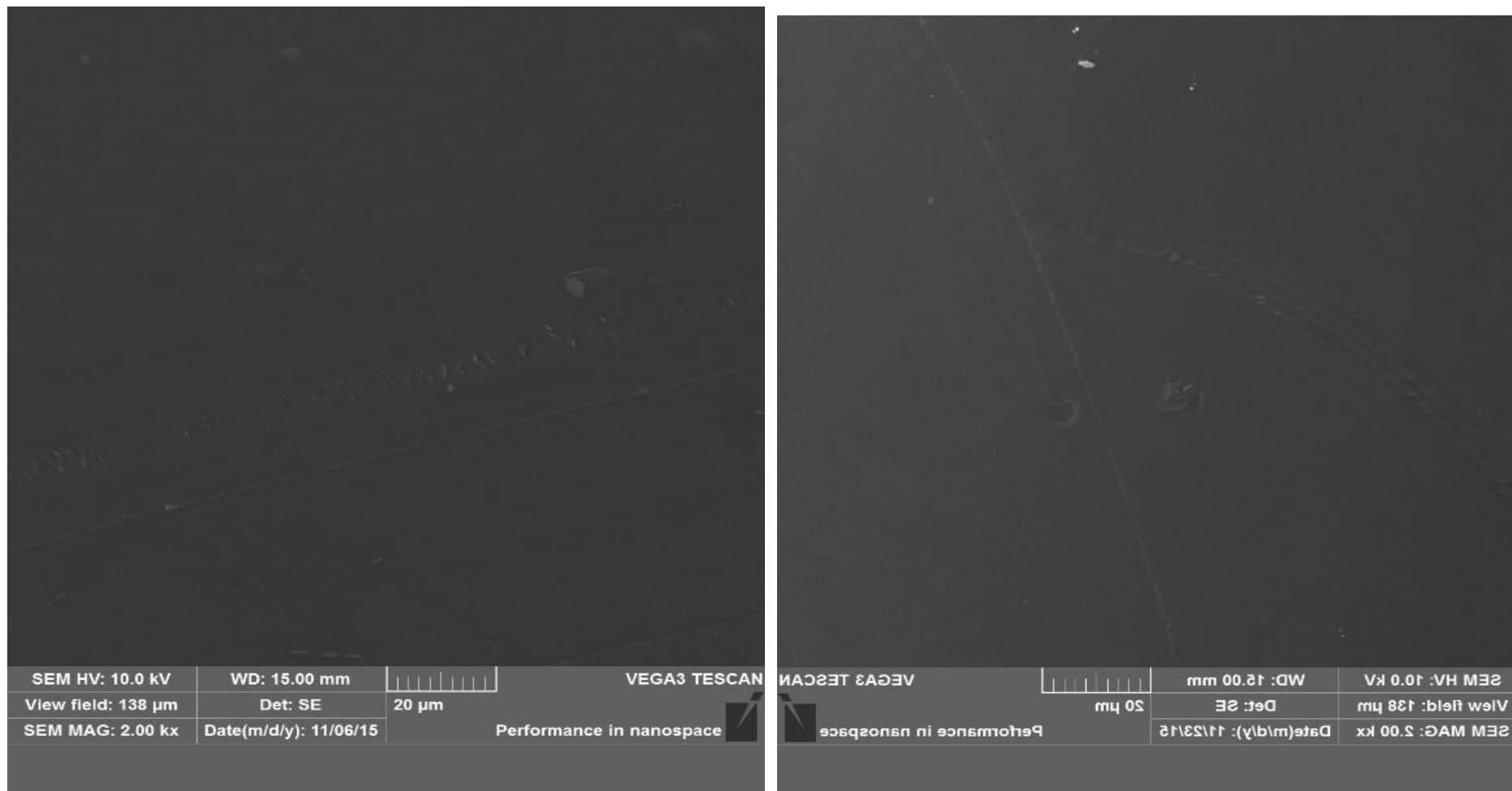
PEBDStR22c



PEBDSt22d

Figura 24 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de baixa densidade (0,05mm), tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *S. aureus*

Nota: **PEBDStR22c** - PEBD + *S.aureus* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEBDSt22d** - PEBD + *S.aureus*



PEBD23a

PEBDBS23b

Nota: **PEBD23a** - PEBD controle; **PEBDBS23b** - PEBD + *B. cereus* + Surfactina 0,1%

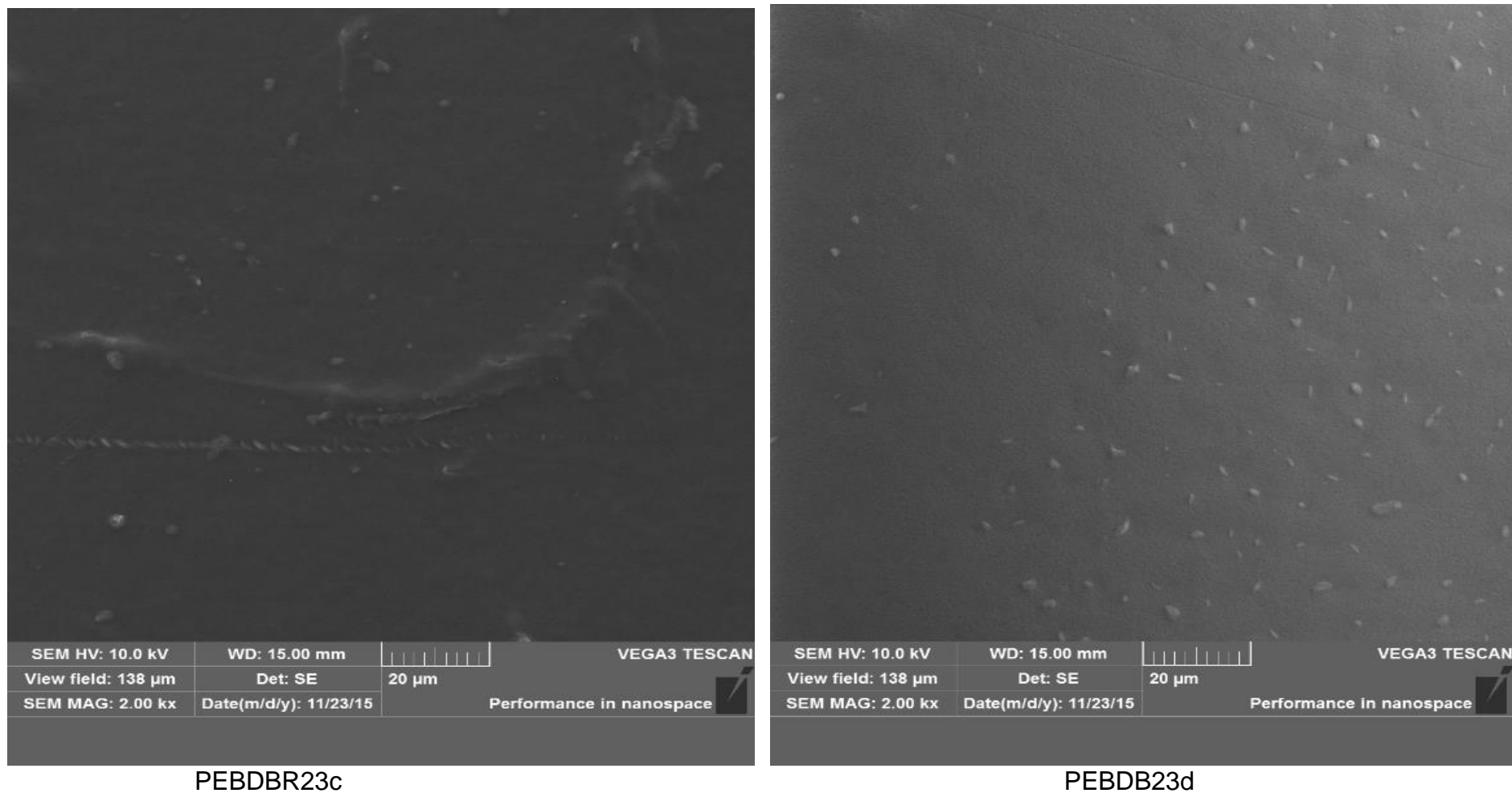


Figura 25 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de polietileno de baixa densidade (0,05mm), tratados com e sem biossurfactantes, impregnados com *B. cereus*

Nota: **PEBDBR23c** - PEBD + *B. cereus* + Ramnolipídeo 0,45%; **PEBDB23d** - PEBD + *B. cereus*

5. CONCLUSÃO

A surfactina 0,1% e o ramnolípideos 0,45% mostraram efeito antimicrobiano sobre a *Salmonella sp.* inoculada nos filmes flexíveis de PP, PEBD 0,05mm e 0,1mm e, PEAB.

A surfactina 0,1% reduziu o desenvolvimento bacteriano de *E coli* impregnado em PP, PEAD e PEBD 0,05mm, *P aeruginosa* em PEAD e, *Bacillus cereus* em PEAD e PEBD 0,05mm. O ramnolípideos 0,45% inibiu o crescimento bacteriano de *E coli* impregnado em PEAD, *P aeruginosa* em PP e *Bacillus cereus* em PEBD 0,05mm.

Não houve eficiência significativa na redução da adesão em PS comparada ao controle, para ambos os biossurfactantes, demonstrando que as concentrações do biossurfactantes testados não se mostram adequados para o tratamento como antiadesivo destes patógenos.

A microscopia eletrônica de varredura comprovou que a adesão microbiana em filmes flexíveis tratados com biossurfactantes foi menor, do que a adesão em filmes sem tratamento.

Portanto, houve efeito dos biossurfactantes testados sobre a adesão de bactérias patogênicas na superfície dos filmes flexíveis testados, com exceção sobre o *S aureus*.

6. REFERÊNCIAS

ABIPLAST - Associação Brasileira da Indústria do Plástico. Os plásticos. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/site/os-plasticos>> Acesso em: 19/02/2016.

ARAÚJO, A. E.; ANDRADE, N. J de; CARVALHO, A. de; RAMOS, A. M.; Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 9, 1940-1948, 2010.

ARAUJO, L. V.; ABREU, F.; LINS, U.; SANTA ANNA, L. M. M.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G.; **Food Res. Int**, v.44, p.481, 2011

ARAÚJO, L. V.de; FREIRE, D. M. G. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v.36, n. 6, p. 848-858, 2013.

Arima, K., A. Kakinuma and G. Tamura. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 31 p. 488–494, 1968.

BELLON-FONTAINE M.N., RAULT J., VAN OSS C.J. Microbial adhesion to solvents, a novel method to determine the electron–donor/electron–acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. **Colloid. Surface. B.**, v.7, p. 47-53, 1997.

BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; SOREN, M.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. Biofilm infections. **Springer Science Business Media**, LLC, New York, p 215 – 230, 2013.

BOGNOLO, G.; **Colloids Surf.**, v.41, p. 152, 1999.

BOLES, B R.; THOENDEL, M.; SINGH, P. K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilm. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1210-1223, 2005.

CERQUEIRA, V.S. Produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2007.

CHAE, M.S, SCHRAFT H, HANSEN, L.T & MACKERETH, R, 'The effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass' **Food Microbiology**, v 23, no. 3, p. 250-259, 2006.

CHAVANT, P. CHAVANT, B. MARTINIE, T. MEYLHEUC, M.N. Bellon-Fontaine, M. Hebraud. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, pp. 728–737, 2002.

CHEMSKETCH. Version 11.0. ACD/Labs, 2015.

CHRISTENSEN, B.E.;CHARACKLIS, W.G.;Physical and chemical properties of biofilms.In: **Characklis WG, Marshall KC, editores**. Biofilms. New York: John Wiley and Sons, Inc.; p. 93-130, 1990.

COMYN, J.;**Int. J. Adhesion and Adhesives**, v.10, p. 161,1990.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A.; **Appl. Microbiol. Biotechnol**,v.52, p.154, 1999

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTAMARIA, L., C, de;**Polietileno: principais tipos propriedades e aplicações**, tradução,2003.

DAROUICHE, R. Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence. Clinical Infectious Disease, Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and Dispersin B combination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 88-93, 2009.

DAVIES , D.G. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN D52715**.

DJORDJEVIC, D.; WEIDMANN, M.; MCLANDBOROUGH, L. A.; **Appl. Environ. Microbiol**, v.68, p. 2950, 2002.

DONG, Y. H.; ZHANG, X. F.; XU, J. L.; TAN, A. T.; ZHANG, L. H.; **Mol. Microbiol**. v.58, p. 552, 2005.

DUNNE JR., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately;**Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2002.

DUSANE, D. H.; NANCHARAIH, Y. V.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P. Rhamnolipid mediated disruption of marine Bacillus pumilus biofilms.**Colloids Surf B Biointerfaces**. v. 81, p. 242-250, 2010.

FERNANDES, P.A.V. et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by Bacillus subtilis R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p. 704-709, 2007.

FLACH, J. **Formação de biofilmes em diferentes materiais utilizados na indústria de processamento de leite**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FLEMMING, H; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, v.8, nº9, p.623-633, 2010.

FORSYTHE, S. J. (Ed.). **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora SA, 2013. 607 p. Tradução de: Andréia Bianchini et al.

FRASSON, A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, C. R de. **Licenciatura em Educação Física: Metodologia da pesquisa científica**. Ponta Grossa: Nutead - UEPG, 2009. 174 p.

GANG, H. Z.; LIU, J. F.; MU, B.Z. Interfacial behavior of surfactin at the decane/water interface: A molecular dynamics simulation. **Journal of Physical Chemistry**,v.114, p. 14947-14954, 2010.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-Active compounds from microorganisms. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. São Paulo: Atlas, 2007.

GOMES, M. JP. **Gênero *Bacillus***.Tópicos em bacteriologia veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

GONZÁLEZ, J. E. & KESHAVAN, N. D.; **Microbiol. Mol. Biol**, v.70, p.859, 2006.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.**Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95- 108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Envolving concepts in biofilm infections.**Cellular Microbiology**, v.11, p. 1034 – 1043, 2009

HOLAH, J.T.; THORPE, R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. **J. Appl. Bacteriol.** v. 69, n. 4, p. 599-608, 1990.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A.; **Food control**, v.6, p. 9, 1995.

HOYLE, B. D., WONG, C. K. W.; COSTERTON, J. W.Disparate efficacy of tobramycin on Ca⁺²-, Mg⁺²-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.**Can. J. Microbiol**, v.38, p. 1214-1218, 1992.

IRIE, Y.; O'TOLLE,G.A.; YUK, M.H. *Pseudomonas aeruginosa* lipids disperse *Bordetellabronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiology and Biotechnilogy**, 2009.

JORGE, N. **Embalagens para alimentos**. São Paulo: Cultuta Acadêmica, p 194, 2013.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise Review of Mechanics of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used in Estimating Bacteria-Material Interactions **European Cells and Materials**, Patras, v. 8, p.37-57, 2004.

KAUARK, F. S.; MANHÃES, F. C.; MEDEIROS, C. H. Metodologia da Pesquisa: Um guia prático. **Itabuna: Via Litterarum**, 2010. 88 p.

LANG S.;WULLBRANDT D.Rhamnose lipids biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 51, p. 2232,1999.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-11, 2010.

MANO, E. L.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. São Paulo-SP Segunda Edição revisada e ampliada. Editora Blucher, p. 191, 1999.

MEDONLINE. Medicina onLine. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. **Revista Virtual de Medicina**. Disponível em <www.medonline.com.br>. Acesso em 8 de maio de 2015.

MEYLHEUC, T.; RENAULT, M.; BELLON-FONTAINE, M. N. **Int. J. Food Microbiol**, v. 71, p. 109, 2009.

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

NIH: National Institutes of Health. 2007. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>. Acesso em: 07 maio 2015.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.1-5, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.31, p. 63-67, 2003.

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

*NITSCHKE, M.; ARAÚJO, V.,; COSTA, S.G.V.A.O.; PIRES, R.C.; ZERAIK, A.E.; FERNANDES, A.C.L.B.; FREIRE, D.M.G.; CONTIERO, J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfasse. **Letters is Applied Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 241-247, 2009.*

OLIVEIRA, L. M. Mercado de embalagens Plásticas Flexíveis no Brasil. **1st International Plastics Extrusion Conference**, Florianópolis, 1999.

OULAHAL N;BRICE W;MARTIAL A;DEGRAEVE P;Quantitative analysis of survival of Staphylococcus aureus or Listeria innocua on two types of surfaces: polypropilene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, v. 19, p. 178-85, 2008.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.;KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 301-307, 2008.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J.; Bacterial all attachment, the beginning of a biofilm. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, p. 577, 2007.

PEREIRA, O.B.O. Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme. 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol. Biotechnol**, v. 51, p. 533-563, 1999.

PIROLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

POLLACK M. *P. aeruginosa*. In: Mandell DaB. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Chuchill Livingstone. V.5, p. 2310-35, 2000.

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

RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M.; REHMAN, A. Production kinetics and tensoactive characteristics of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotech. Lett.** V.20, p. 1623-1631, 2010.

ROCA, D. Á. L. *Pseudomonas aeruginosa*: um adversário perigoso. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Minas Gerais, v. 8, n. 4, p.1-9, jul. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400009&lang=pt>. Acesso em: 06 maio 2015.

RODRIGUES, L. R.; BANAT, I. M.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Interferende in adhesion of bactéria and yeasts isolated from explanted voice prothesesto silicone rubber by ramnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100 n. 3, p. 470-480, 2006.

SANTOS, A. M. P.; YOSHIDA, C. M. P. **Técnico em alimentos: Embalagem**. Recife: Edufrpe, 2011. 152 p.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, I. M de., PADULA, M.; COUTRO, I.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: Principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagens, 2002. 267 p.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current emergente biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SINO, M.A. **Plástico moderno**, v. 282, p.24-31, 1997.

SOMMER P, MARTIN-ROUAS C, METTLER E. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. **Food Microbiol.** v. 16, p. 503-515, 1999.

SPIETH, E.H. **Mercado brasileiro de plásticos**, in: Anais do I Congresso Brasileiro de Polímeros, Associação Brasileira de Polímeros, p.30 -34, São Paulo-SP, 1991.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants. Their identity and potencial efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Dis**, 81, p. 4-12.1997.

STELLER, S.; VALTER, J.; J. Chomatogr., B: **Anal. Technol. Biomed.** v. 737, p. 267, 2000.

STEPANOVIC, S.; SIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004.

SUCI, P. A.; MITTELMAN, M. W.; YU, F. P.; GEESEY, G. G. Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 38, p. 2125-2133, 1994.

TEIXEIRA L, FERREIRA Á, ASHBURNER M. The Bacterial Symbiont Wolbachia Induces Resistance to RNA Viral Infections in Drosophila melanogaster. **PLoS Biol.** 2008.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J.. 214. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013

VERRAN J. **Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential**: Food Bioprod Process. v. 80, p. 292-300, 2002.

WALENCKA, E.; RÓZALSKA, S.; SADOWSKA, B.; RÓZALSKA, B. The influence of Lactobacillus acidophilus-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. **Folla Microbiológica**, v.53, n.1, p. 61-66, 2008.

WEI Y.H, WANG L.F, CHANGY J.S, Kung S.S. Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n.2, p. 174- 178, 2003.

YAROOD, J. M.; BARTELS, D. J.; VOLPER, E. M.; GREENBERG, E. P.; **J. Bacteriol.** v. 186, p. 1838, 2004.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbiology**, v.61, p. 554-559, 2010.

GOMES, Milene Zezzi do Valle. Utilização de biosurfatantes no controle da adesão bacteriana e na remoção de biofilmes de patógenos alimentares em superfície de

poliestireno. 2011. 96 f. **Tese (Doutorado) - Curso de Química Analítica**, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.