

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Willian Agostinho Machado

**Aplicação de ramnolipídeo na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e
Bacillus cereus formados em superfície de poliestireno**

São Carlos - SP

2015

Willian Agostinho Machado

Aplicação de ramnolipídeo na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus* formados em superfície de poliestireno

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a conclusão do curso de graduação de Bacharelado em Química Tecnológica.

Área de concentração: Microbiologia e Bioquímica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Nitschke

São Carlos – SP

2015

Este trabalho é dedicado aos meus pais e à minha irmã que sempre me apoiaram e deram todo o suporte necessário para concluir mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais e à minha irmã pelo apoio e incentivo ao longo de todos esses anos, sempre presentes em todos os momentos.

Agradeço aos meus amigos de graduação, Milena Hermann, Gabriel Sanches, Pedro Damada, Jéssica Feitor, Lais Lira, Larissa Almeida, Patrícia Trovó, Priscila Rodrigues, Carolina Queiroz, Jonas Costa, Ivan Silva e Rodrigo Pizani pela parceria e por fazerem parte dessa importante etapa de minha vida, tornando-a mais prazerosa.

Aos colegas do Grupo de Biotecnologia Microbiana, em especial à Sumária Sousa pela paciência e boa vontade em me orientar e à Marília Peret que sempre esteve à disposição para ajudar no que foi necessário.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Marcia Nitschke pela disponibilidade em me orientar e por todos os ensinamentos ao longo da graduação e deste trabalho que muito contribuíram para minha formação.

Aos demais professores e funcionários do Instituto de Química de São Carlos que direta ou indiretamente estiveram presentes durante minha passagem pela universidade.

RESUMO

MACHADO, W. A. Aplicação de ramnolipídeo na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus* formados em superfície de poliestireno. 2015. 40f. Monografia - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Alguns microrganismos são uma preocupação na indústria de alimentos, pois a formação de biofilmes de bactérias patogênicas sobre superfícies de processamento pode levar à transmissão de doenças e deterioração dos alimentos. Para controlar a formação e remoção destes biofilmes têm-se utilizado os ramnolipídeos, que são uma classe de biossurfatantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* que vêm demonstrando atividade como agentes antiadesivos e dispersantes. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a suscetibilidade dos biofilmes de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 formados em superfície de poliestireno frente à ação do RL. Os ensaios foram realizados variando-se as concentrações de RL, a temperatura e o meio de crescimento (formação de biofilme). Inicialmente foi avaliada a cinética de crescimento das bactérias a 37 °C em meios comerciais (TSYEB e CN) e em matriz alimentar (leite em pó reconstituído). Baseando-se nesse experimento, escolheram-se os biofilmes de 24 horas nos meios CN e leite para ambas as bactérias. Os tratamentos mais eficientes para *S. Enteritidis* ocorreram na concentração 0,25% de RL a 25 °C que removeu 60% do biofilme formado em CN e 64% a 4 °C na concentração 0,50% em leite. Já para *B. cereus* no meio comercial CN houve remoção de 85% e 84% na concentração 0,50% nas temperaturas 4 °C e 25 °C, respectivamente. O ramnolipídeo não foi eficiente na remoção do biofilme de *B. cereus* formado em leite, observando-se uma pequena remoção apenas a 25 °C na concentração 0,25% (10,6%). O ramnolipídeo mostrou potencial como agente dispersante de biofilmes, entretanto os parâmetros temperatura e concentração de RL, além da natureza do meio de cultura, influenciaram a atividade observada.

Palavras-chave: Biofilme; Ramnolipídeos; *Salmonella* Enteritidis; *Bacillus cereus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns biossurfatantes.....	13
Figura 2 - Coloração de Gram de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	14
Figura 3 - Coloração de Gram de <i>Bacillus cereus</i>	15
Figura 4 - Estágios do desenvolvimento de um biofilme.....	17
Figura 5 - Exemplos de agregados moleculares formados por biossurfatantes.....	18
Figura - 6 - Estruturas das duas principais formas de ramnolípido: mono-ramnolípido e di-ramnolípido.....	19
Figura 7 – Fluxograma do procedimento de cinética de formação dos biofilmes.....	24
Figura 8 – Esquema do tratamento com RL.....	25
Figura 9 - Contagem bacteriana pelo método da gota: a) <i>Bacillus cereus</i> e b) <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	26
Figura 10 – Placa de poliestireno com biofilme formado após procedimento de coloração.....	27
Figura 11 - Cinética de adesão do biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis em superfície de poliestireno usando os meios comerciais CN e TSYEB.....	27
Figura 12 - Cinética de adesão do biofilme de <i>Bacillus cereus</i> em superfície de poliestireno usando os meios comerciais CN e TSYEB.....	28
Figura 13 - Cinética de adesão de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 e <i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018 em superfície de poliestireno utilizando leite como meio de crescimento.....	29
Figura 14 - Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolípido na remoção de biofilmes de <i>Salmonella</i> Enteritidis pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em CN. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.....	30
Figura 15 - Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolípido na remoção de biofilmes de <i>Salmonella</i> Enteritidis pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em leite. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.....	31
Figura 16 - Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolípido na remoção de biofilmes de <i>Bacillus cereus</i> pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em CN. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.....	32
Figura 17 - Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolípido na remoção de biofilmes de <i>Bacillus cereus</i> pré-formados em superfície de poliestireno	

quando cultivada em leite. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.....32

Figura 18 - Imagens de MEV do biofilme de *Salmonella* Enteritidis sobre a superfície de poliestireno: a) Sem adição de biossurfatante (ampliação 10000X); b) Com adição de ramnolípídeo 0,25% a 25°C por 2 h (ampliação 10000X).....34

Figura 19 - Imagens de MEV do biofilme de *Bacillus cereus* sobre a superfície de poliestireno: a) Sem adição de biossurfatante (ampliação 10000X); b) Com adição de ramnolípídeo 0,50% a 25°C por 2 h (ampliação 10000X).....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem de UFC mL ⁻¹ para os microrganismos utilizados	26
Tabela 2 - Composição dos meios de cultura.....	28
Tabela 3 - Porcentagem de remoção do biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis formado sobre superfície de poliestireno nos diferentes meios.....	31
Tabela 4 - Porcentagem de remoção do biofilme de <i>Bacillus cereus</i> formado sobre superfície de poliestireno nos diferentes meios.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BS	Biossurfatante
RL-Com	Ramnolípídeo Comercial
CV	Cristal Violeta
D.O.	Densidade Óptica
CN	Caldo Nutriente
TSYEB	<i>Tryptone Soy and Yeast Extract Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Patógenos alimentares.....	14
2.1.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	14
2.1.2 <i>Bacillus cereus</i>	15
2.2 Biofilmes	16
2.3 Biossurfatantes.....	17
2.4 Ramnolipídeos.....	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específicos	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Microrganismos	22
4.2 Biossurfatante	22
4.3 Preparo dos meios de cultura	22
4.4 Manutenção dos microrganismos.....	23
4.5 Preparo e padronização dos inóculos bacterianos.....	23
4.6 Cinética de formação dos biofilmes	24
4.7 Preparo das soluções de ramnolipídeo (RL)	24
4.8 Tratamento com RL	24
4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Padronização do inóculo.....	26
5.2 Ensaio de adesão dos microrganismos.....	27
5.3 Remoção dos biofilmes pré-formados em superfície de poliestireno.....	30
5.3.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	30
5.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	31
5.3.3 Discussão sobre a ação do ramnolipídeo na remoção dos biofilmes pré-formados	33
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Doenças veiculadas por alimentos abrangem uma ampla gama de enfermidades desencadeadas por agentes patogênicos consumidos juntamente com os alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são consideradas um problema de saúde pública mundial (SREY; JAHID; HA, 2013).

Muitos surtos de agentes patogênicos estão associados à formação de biofilmes. A maioria das bactérias é capaz de crescer aderidas a quase qualquer superfície, formando comunidades arquitetonicamente complexas denominadas biofilmes. Nos biofilmes, as células crescem em agregados multicelulares que são embebidos em matriz extracelular produzida pelas próprias bactérias (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

Existem inúmeros benefícios que a comunidade bacteriana pode obter a partir da formação de biofilmes. Dentre eles, pode-se citar: aumento da resistência a antimicrobianos, proteção contra sanitizantes convencionais e contra as defesas do próprio hospedeiro (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010). Devido à sua resistência aos agentes convencionais de limpeza e sanitização, os biofilmes tornaram-se um grande problema para muitas indústrias de alimentos como, por exemplo, a indústria de cerveja, de processamento de frutos do mar, de laticínios, de aves e processamento de carnes (SREY; JAHID; HA, 2013).

Para controlar a formação destes biofilmes, um dos principais requisitos é que os equipamentos onde serão processados os alimentos apresentem elevados padrões de higiene, de modo que o número de fendas, espaços mortos, cantos, válvulas e juntas, sejam reduzidos a um mínimo. No entanto, um bom *design* não é suficiente, de modo que é necessária uma desinfecção e limpeza eficaz como forma de controle da contaminação da superfície (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014).

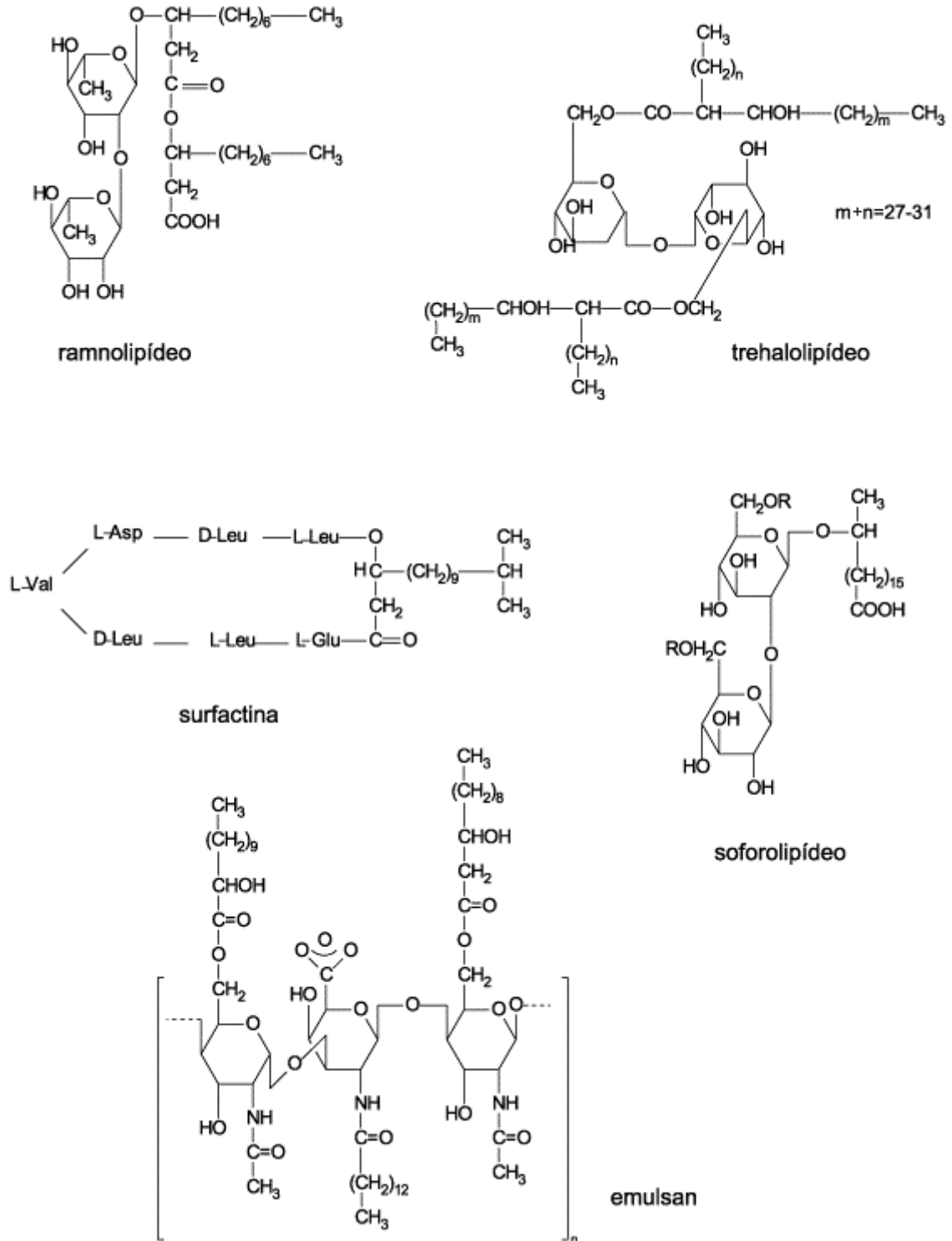
Em geral, são utilizados compostos que podem ser tóxicos, desfavorecendo o emprego destes em um ambiente de manufatura de alimentos, além de não serem biodegradáveis. Por exemplo, o uso de água sanitária comercial (hipoclorito de sódio) para a higienização de equipamentos e matérias-primas não é o mais

recomendado, pois contém, além do agente clorado propriamente dito, outras substâncias como alvejantes e outros (COELHO, 2014). Assim, é importante o desenvolvimento de alternativas para controlar a adesão microbiana e evitar contaminações.

Biossurfatantes (Figura 1) são um grupo heterogêneo de compostos anfifílicos, produzidos principalmente por microrganismos, que se acumulam na interface entre fases líquidas e, portanto, reduzem a superfície e a tensão interfacial. Apresentam, além de ação detergente, atividade antiadesiva e de rompimento de biofilmes (BANAT; RIENZO; QUINN, 2014). Devido às suas propriedades diferenciadas, como baixa ecotoxicidade, fácil biodegradabilidade e condições de produção brandas, biossurfatantes têm potenciais aplicações em uma variedade de setores industriais, sendo uma alternativa para os surfatantes petroquímicos clássicos (GEYS; SOETAERT; BOGAERT, 2014).

Um dos biossurfatantes mais estudados são os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que consistem em açúcares di- ou mono-ramnose ligados a uma cadeia de ácido graxo. Eles têm sido relatados como um substituto em potencial para surfatantes químicos para muitos usos nas indústrias de petróleo e produtos petrolíferos e em uso para a biorremediação de ambientes contaminados com óleo (BANAT; RIENZO; QUINN, 2014). Além disso, exibem diversidade na estrutura, são compatíveis com o ambiente e são eficazes em baixas concentrações e sob condições extremas. São considerados seguros e, portanto, podem ser utilizados como alternativa aos agentes antimicrobianos convencionais. Apesar de seu potencial, há poucos estudos sobre as interações de biossurfatantes com células bacterianas e seu papel antiadesivo e dispersante dos biofilmes (DUSANE et al., 2010)

Figura 1 – Estruturas químicas de alguns biossurfatantes.



Fonte: NITSCHKE; PASTORE, 2002, p. 773.

Neste trabalho o biossurfatante ramnolipídeo foi avaliado quanto à sua capacidade de remover biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus* pré-formados em superfície de poliestireno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

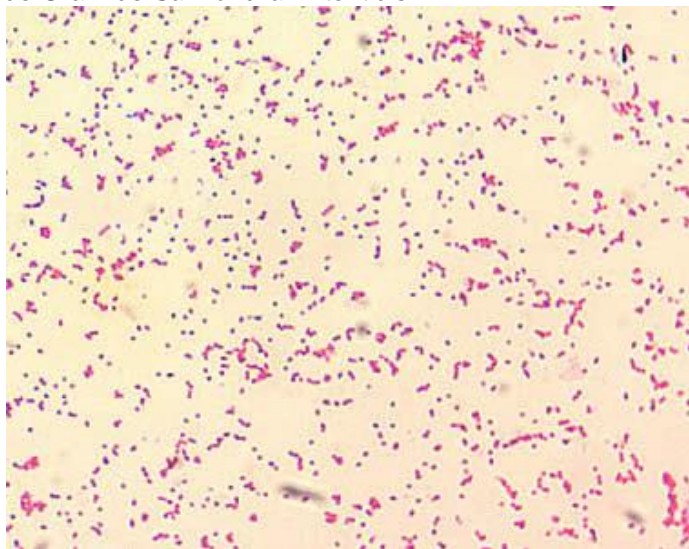
2.1 Patógenos alimentares

Alguns microrganismos, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Bacillus cereus* são uma preocupação na indústria de processamento de alimentos. De fato, a presença de bactérias patogênicas sobre superfícies de processamento de alimentos pode levar a transmissão de doenças; deterioração de alimentos; eficácia reduzida de transferência de calor e até mesmo obstrução de equipamentos; corrosão de metais em tubulações e tanques e contaminação do produto (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014).

2.1.1 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella Enteritidis (Figura 2) é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia facultativa em forma de bastonetes curtos. Apresenta temperatura ótima de crescimento a 37°C e pH ótimo entre 6,5 e 7,5. São encontradas no trato intestinal de mamíferos, pássaros, anfíbios, répteis, homens e insetos. Os principais alimentos envolvidos na contaminação por essa bactéria são leite cru, produtos de laticínios, carne de aves, suínos, bovinos, vegetais, pescado, ovos, água e moluscos (HOFFMANN, 2001).

Figura 2 – Coloração de Gram de *Salmonella* Enteritidis.



Fonte: SAMARITAN ID.

Este patógeno é responsável por causar infecções devido à falta de higiene ou elaboração incorreta de alimentos, permitindo assim a multiplicação desta

bactéria. Quando presente em frutas, legumes, ovos, superfícies industriais ou embalagens de alimentos, a *Salmonella* pode desenvolver microcolônias e estruturas de biofilme. Este estado bacteriano torna a *Salmonella* mais resistente contra agentes antibacterianos, o que pode explicar a sua resistência nesses ambientes. Por décadas, pesquisadores têm trabalhado em maneiras de controlar a sua proliferação (LEGENDRE et al., 2010). Os estudos realizados até agora conduziram à descoberta de que estas bactérias são capazes de aderir e formar biofilmes em diferentes superfícies (GIAOURIS; NYCHAS, 2006).

Os mecanismos que regem a adesão de *Salmonella* spp. à superfícies inertes não são completamente compreendidos; vários estudos têm demonstrado que a adesão de bactérias, em parte, depende da natureza das superfícies inertes e, em parte, das propriedades superficiais bacterianas. A hidrofobicidade e carga da superfície são as propriedades mais importantes no processo de adesão, como demonstrado por inúmeros estudos (OLIVEIRA et al., 2007).

2.1.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus (Figura 3) são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes, formadoras de endósporos, de metabolismo aeróbico-facultativo. *B. cereus* é conhecido por ser um patógeno humano que causa síndromes eméticas e diarreicas, ambas transmitidas por alimentos (PENÃ et al., 2014).

Figura 3 – Coloração de Gram de *Bacillus cereus*.



FONTE: MEGADES VOEDSELVEILIGHEID.

Uma grande variedade de alimentos têm sido responsáveis por surtos de doenças causadas por *B. cereus*, tornando seu controle um desafio para as

indústrias de leite e seus derivados. As proteases e lipases produzidas por *B. cereus* podem causar alterações químicas e sensoriais no leite, como a doçura e a produção de odor frutado (PENÃ et al., 2014).

B. cereus tem a capacidade de aderir à superfícies inertes ou biomateriais e desenvolve-se como biofilme, que constitui um importante fator de virulência (HAMIDA et al., 2012). Entretanto, a formação de biofilme por *B. cereus* é considerado mais uma estratégia de sobrevivência do que um fator de virulência e tem sido estudada por muitos pesquisadores em diferentes substratos, tais como aço inoxidável, polipropileno, plástico e lã de vidro (PAGEDAR; SINGH, 2012).

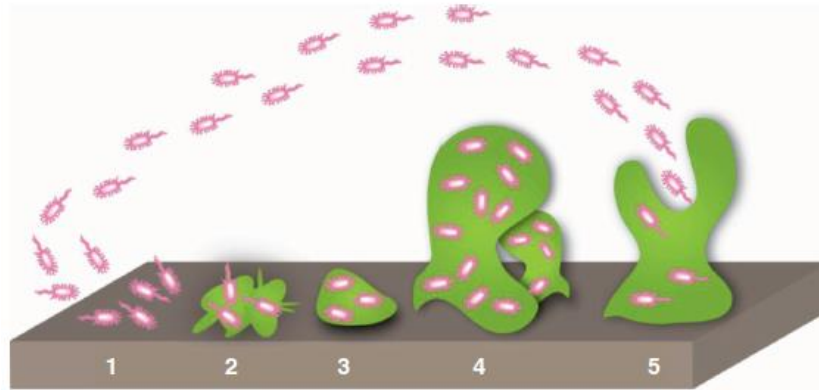
2.2 Biofilmes

Os biofilmes são agregados microbianos envolvidos por uma matriz que aderem à superfícies bióticas ou abióticas. As substâncias poliméricas extracelulares (SPE), que são principalmente polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, são responsáveis pela morfologia, estrutura e características físico-químicas destes agregados. Como o biofilme é um fenômeno universal, isto é, os microrganismos preferem viver em superfícies, em vez da fase líquida, é muito provável que a maioria da contaminação microbiana dos produtos alimentares seja relacionada aos biofilmes (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014).

A formação e desenvolvimento de biofilmes é afetada por muitos fatores, incluindo a cepa de bactérias, as propriedades da superfície dos materiais, e os parâmetros ambientais, como o pH, níveis de nutrientes e temperatura. As células do biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos que as bactérias planctônicas, devido à barreira que impede ou diminui o contato com agentes antimicrobianos (SREY; JAHID; HA, 2013).

Vivenciar um ambiente hostil é importante para as bactérias formarem um biofilme como uma estratégia de sobrevivência. A formação do biofilme (Figura 4) é um processo gradual e dinâmico que consiste de (1) ligação inicial, (2) ligação irreversível, (3) o desenvolvimento da arquitetura precoce do biofilme, (4) maturação e (5) a dispersão (SREY; JAHID; HA, 2013).

Figura 4 – Estágios do desenvolvimento de um biofilme.



Fonte: BLACKLEDGE; WORTHINGTON; MELANDER, 2013, p. 700.

2.3 Biossurfatantes

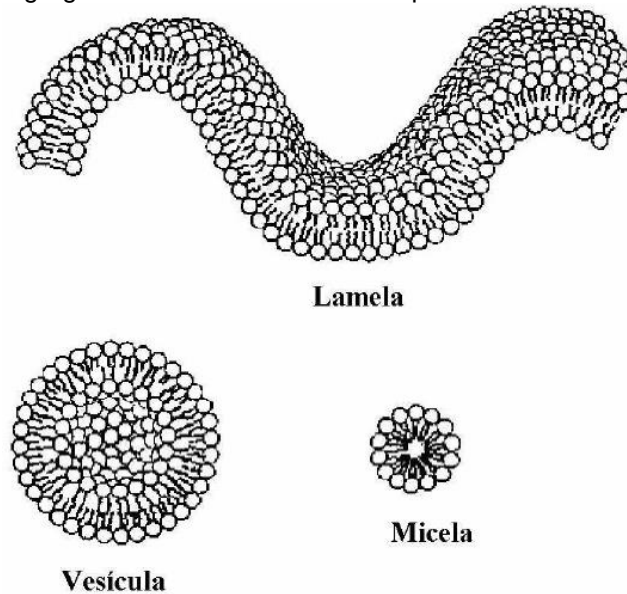
Biossurfatantes (BS) são compostos anfifílicos de origem biológica contendo uma região hidrofílica (geralmente açúcares ou peptídeos) e uma região hidrofóbica (lipídeos ou ácidos graxos). O grupo hidrofílico é a base da nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), ou seja, aqueles biossurfatantes que contêm ramnose são descritos como ramnolipídeos, enquanto que aqueles contendo soforose são soforolipídeos. Outros biossurfatantes, os lipopeptídeos, contêm uma cadeia de hidrocarboneto hidrofóbica e uma parte polar ou hidrofílica que é composta por aminoácidos (BANAT; RIENZO; QUINN, 2014).

Devido às suas propriedades os BS são moléculas de grande interesse, pois apresentam especificidade, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, aplicabilidade generalizada e eficácia em extremos de pH e temperatura. As propriedades de superfície e de redução da tensão interfacial de surfatantes proporcionam excelente detergência, emulsificação e formação de espuma, tornando-os alguns dos produtos versáteis em processos envolvendo as indústrias química, agrícola, cosmética, farmacêutica e de petróleo (BANAT; RIENZO; QUINN, 2014).

Em meio aquoso, os biossurfatantes são capazes de formar diversas estruturas agregadas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (Figura 5). Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água, e atuam como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfatantes de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos

insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbico-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (COLLA; COSTA, 2003).

Figura 5 – Exemplos de agregados moleculares formados por biossurfatantes.



Fonte: COLLA; COSTA, 2003, p. 88.

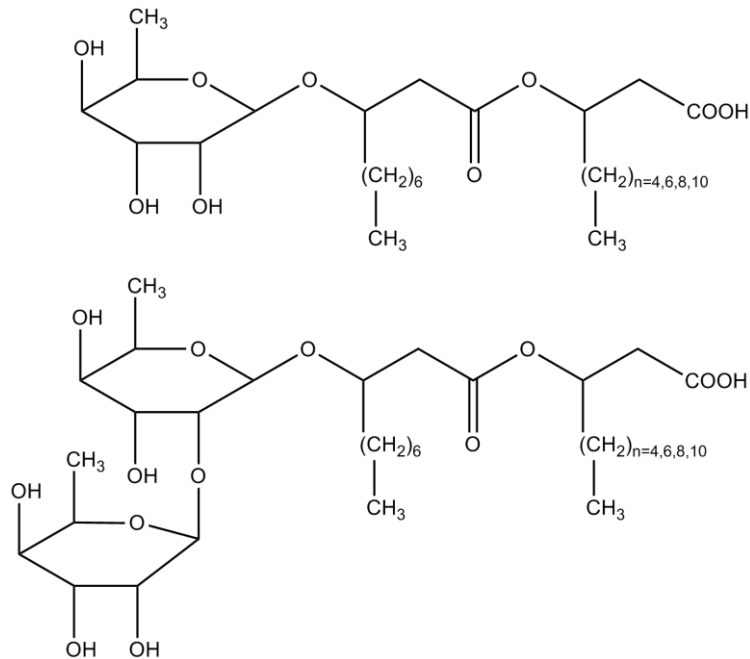
Da mesma forma, estes compostos podem romper as membranas celulares que levam à lise celular pelo aumento da permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, perda de metabólitos. Mudanças na estrutura física da membrana ou modificações na conformação de proteínas ocorrem, alterando, assim, funções significativas da membrana que compõem o transporte e geração de energia (GUDINÃ et al., 2013).

O fato de serem ambientalmente favoráveis combinado com a capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos pode explicar porque biossurfatantes também foram reconhecidos como excelentes agentes para melhorar a biorremediação de ambientes contaminados (LAWNICZAK; MARECIK; CHRZANOWSKI, 2013).

2.4 Ramnolipídeos

Ramnolipídeos pertencem ao grupo dos glicolipídeos e contêm uma ou duas unidades de L-ramnose ligada a um ou dois β -hidroxi ácidos graxos (Figura 6) (HENKEL et al., 2012). Estes surfatantes têm mostrado grande potencial para aplicação comercial devido às suas características químicas únicas, e, no futuro, podem servir como substituto para surfactantes sintéticos (REIS et al., 2011).

Figura 6 – Estruturas das duas principais formas de ramnolípido: mono-ramnolípido e di-ramnolípido.



Ramnolípdeos são produzidos por diversas espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* com *Pseudomonas aeruginosa* sendo o maior produtor com rendimentos em torno de 100 g L⁻¹. Em contraste com outros biossurfactantes, ramnolípdeos exibem atividades relativamente elevadas de superfície, e podem ser produzidos com rendimentos relativamente elevados e tempos curtos (HENKEL et al., 2012). Entretanto, o preço elevado devido ao processo de purificação ainda dificulta a inserção dos ramnolípdeos no mercado (GEYS; SOETAERT; BOGAERT, 2014). O preço de mercado atual dos ramnolípdeos comerciais (95% de pureza) é U\$ 227/10 mg (Sigma-Aldrich) e U\$ 200/10 mg (AGAE Technologies, USA) (RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

As aplicações industriais dos ramnolípdeos incluem emulsificação, detergência, formação de espuma, dispersão ou solubilização, atividades antimicrobianas e antiadesivas, em diferentes áreas, desde biorremediação até aditivos alimentares (REIS et al., 2011).

Ramnolípdeos endógenos atuam como um fator de virulência e mediam a manutenção da estrutura do biofilme ou induzem a dispersão do biofilme através da formação de cavidades internas em um biofilme maduro. Ramnolípdeos exógenos

apresentam várias funções, incluindo atuar como um agente antimicrobiano em um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, afetando a solubilidade de hidrocarbonetos hidrofóbicos, além de possuir atividade antiaderente em bactérias (KIM et al., 2015).

Além do uso direto em solução para interromper biofilmes já estabelecidos em ambientes clínicos e industriais, a incorporação de materiais com ramnolipídeos ou o revestimento de superfícies pode representar uma abordagem promissora para prevenir a adesão inicial de bactérias (NICKZAD; DÉZIEL, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a suscetibilidade dos biofilmes de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 formados em superfície de poliestireno frente à ação dos ramnolipídeos.

3.2 Específicos

- Comparar a formação dos biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus* em diferentes meios de cultivo: caldo nutriente, TSYEB e leite.

- Avaliar os efeitos da temperatura e da concentração de ramnolipídeo na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus cereus* formados em superfícies de poliestireno.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos

As cepas selecionadas para o estudo foram *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018, pois estão relacionadas à contaminação alimentar.

4.2 Biossurfatante

O biossurfatante utilizado neste trabalho foi ramnolipídeo (*Rhamnolipid Inc.*) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* de origem comercial (99%).

4.3 Preparo dos meios de cultura

Utilizou-se o caldo nutriente (*Acumedia*) adicionado de ágar como meio de cultura sólido, para crescimento bacteriano em placas de Petri. Este meio é composto por: extrato de carne (3 g L⁻¹), digestão enzimática de gelatina (5 g L⁻¹), no qual acrescentou-se ágar bacteriológico (*Kasvi*) (20 g L⁻¹). Já para os meios de cultura líquido também utilizou-se o CN com a mesma composição descrita anteriormente, mas sem adição de ágar bacteriológico. Além disso, utilizou-se o meio comercial TSYEB, que é composto por: extrato de levedura (6 g L⁻¹), digestão enzimática de caseína (17 g L⁻¹), digestão enzimática de farelo de soja (3 g L⁻¹), cloreto de sódio (5 g L⁻¹), fosfato dipotássico (2,5 g L⁻¹) e dextrose (2,5 g L⁻¹).

Para o preparo dos meios de cultura comerciais, os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o pH final (25 °C) foi ajustado para 6,8 ± 0,2 para o CN e 7,3 ± 0,2 para o TSYEB, sendo posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min.

Também foi utilizado o leite em pó desnatado (marca Elegê), dissolvido em água destilada, como meio de crescimento bacteriano. O pH final (25 °C) foi ajustado para 6,5 ± 0,2, sendo posteriormente esterilizado em autoclave a 121 °C por 10 min.

4.4 Manutenção dos microrganismos

As culturas dos microrganismos de estudo foram inicialmente inoculadas em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Na placa foram adicionados 5 mL de CN contendo 20% de glicerol. Após remoção com auxílio de alça de inoculação, 800 µL de suspensão bacteriana foi adicionado a tubos criogênicos, os quais foram mantidos a 4 °C para serem utilizados no decorrer dos experimentos subsequentes.

4.5 Preparo e padronização dos inóculos bacterianos

A partir das culturas bacterianas mantidas em estoque foram realizados experimentos para a padronização do inóculo, o qual consistiu em inocular inicialmente as culturas em placas de ágar nutriente e incubá-las a 37 °C por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se 5 mL da solução salina na placa e removeu-se a biomassa com auxílio de alça de inoculação. Em seguida transferiu-se o conteúdo para microtubos de 2 mL e centrifugou-se à 10.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com aproximadamente 2 mL de solução salina. Posteriormente o número de células foi ajustado com a medida de densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro UV-VIS (*Thermo Scientific*) a 610 nm. Utilizando-se como referência o padrão 0,5 da escala McFarland (1 mL de cloreto de bário (BaCl₂) a 1% + 99 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1%). A densidade óptica da solução foi ajustada para uma absorbância de 0,100, visando padronizar o inóculo para os ensaios de adesão.

Após o ajuste da D.O. adicionou-se 1 mL deste inóculo em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (NaCl 0,86%), previamente esterilizada. A suspensão bacteriana obtida foi submetida a diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁹ (método da gota). Em seguida gotas de 15 µL de cada diluição foram depositadas em placas contendo meio e incubadas a 37 °C por 24 h. Foi realizada a contagem de colônias nas gotas que possuíam de 5 a 50 unidades formadoras de colônias (UFC). O número de células viáveis foi determinado pela média do número de colônias, multiplicado pela diluição, obtendo-se assim o número de UFC por mililitro de solução. A concentração celular foi ajustada para ~ 10⁸ UFC mL⁻¹ estabelecendo-se a DO correspondente a este valor para proceder com os testes de adesão. Este procedimento foi realizado com cada bactéria de estudo.

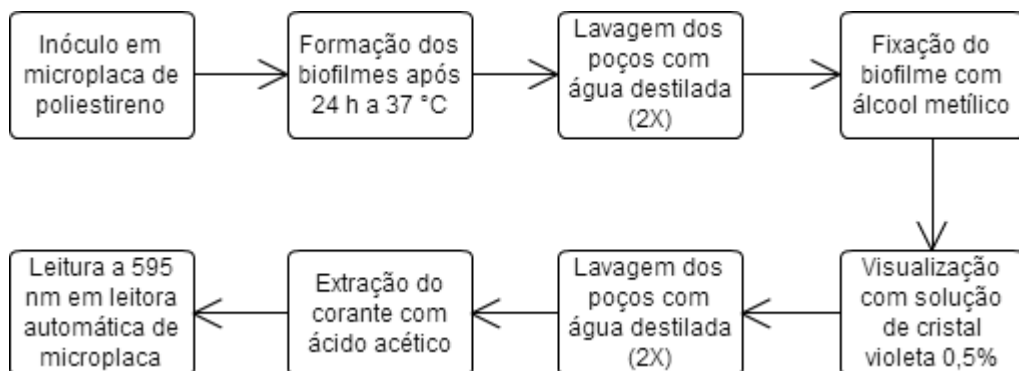
4.6 Cinética de formação dos biofilmes

Para o estabelecimento dos biofilmes, alíquotas de 20 μL de suspensão bacteriana ($\sim 10^8$ UFC mL^{-1}) foram inoculadas em microplaca de poliestireno de 96 cavidades contendo 180 μL do meio de interesse (TSYEB/CN/leite) incubando-se a 37 °C por 48 h.

Decorrido o tempo de formação dos biofilmes, os mesmos foram submetidos à lavagem dos poços em placas de poliestireno com água destilada esterilizada (2x). O biofilme aderido foi fixado com 200 μL de álcool metílico 99,9% (*Qhemis*) por 15 min e visualizado após coloração com 200 μL de solução aquosa de cristal violeta 0,5% (*Synth*). Após lavagem com água destilada o corante foi extraído com 200 μL com ácido acético glacial 33% (*Synth*) procedendo-se a leitura da densidade ótica da solução a 595 nm em leitora automática de microplacas *Enspire* (*PerkinElmer*).

O fluxograma (Figura 7) a seguir ilustra o procedimento realizado:

Figura 7 – Fluxograma do procedimento de cinética de formação dos biofilmes.



4.7 Preparo das soluções de ramnolípídeo (RL)

O ramnolípídeo foi diluído em água destilada e filtrado em filtro com poros de 0,22 μm mantendo-se em geladeira (4 °C) até o momento do uso. As concentrações utilizadas foram 0,25% e 0,50%.

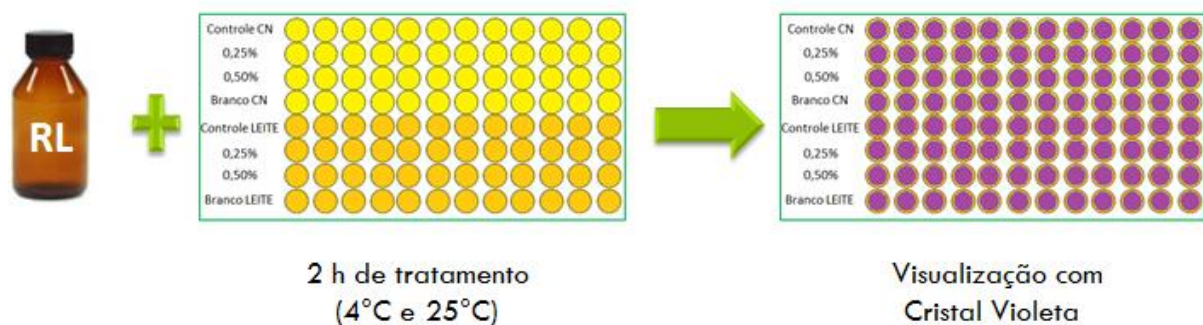
4.8 Tratamento com RL

Após o crescimento dos biofilmes como descrito na seção 4.6, o meio de cultura foi removido e realizou-se lavagem com água (2x) dos poços. Em seguida foi

adicionado 200 μL de solução de ramnolípido em diferentes concentrações deixando-se em contato por 2h de forma estática. Esse tratamento foi realizado nas temperaturas de 4 °C (temperatura de geladeira) e 25 °C (temperatura de processamentos dos alimentos) visando a remoção do biofilme pré-formado. Esses mesmos procedimentos foram realizados tanto no caldo nutriente quanto em matriz alimentar, que no caso foi o leite em pó desnatado.

Utilizou-se o mesmo método de quantificação da adesão bacteriana para avaliar a ação do ramnolípido. A quantidade de biofilme removido foi comparada com ensaio controle tratado com água destilada (Figura 8).

Figura 8 – Esquema do tratamento com RL.



4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar qualitativamente a arquitetura e a presença de SPE antes e após o tratamento com o BS, os biofilmes foram observados em microscópio eletrônico de varredura.

Os biofilmes foram formados conforme descrito na seção 4.6, utilizando-se amostras de poliestireno de 1 cm^2 , nas quais houve formação de biofilme. Em seguida as amostras foram submetidas à desidratação através da imersão em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes de 10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, permanecendo por 15 min em cada solução e deixadas secar em dessecador por 24 h. Por fim, as amostras foram recobertas com uma camada de cerca de 10 nm de ouro em um metalizador e em seguida visualizadas em microscópio 440 LEO (*Zeiss*). Foram avaliadas amostras controle (com biofilme não tratado) comparando-se com amostras submetidas ao tratamento com o BS. Foram submetidos à análise qualitativa apenas os melhores resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização do inóculo

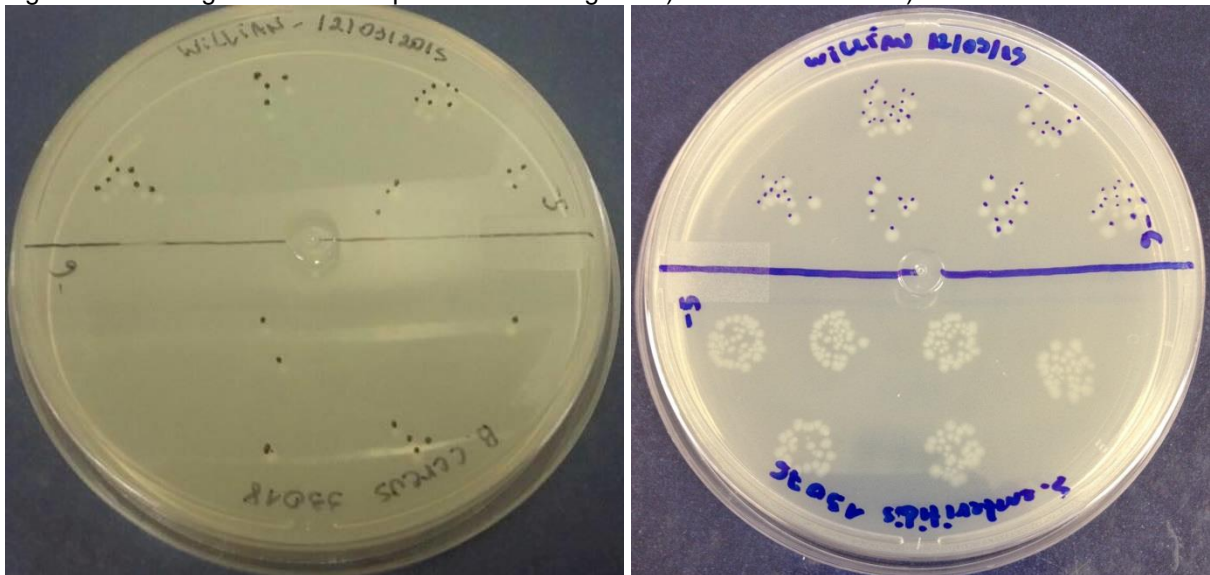
Realizou-se o procedimento de contagem pelo método da gota, de forma a se relacionar o número de células viáveis com as medidas de absorvância a 610 nm para que estas fossem usadas como referência para os experimentos futuros realizados nas mesmas condições. Na Tabela 1 são listadas as concentrações obtidas.

Tabela 1 – Contagem de UFC mL⁻¹ para os microrganismos utilizados.

Microrganismo	UFC/mL
<i>Bacillus cereus</i>	3,2 x 10 ⁷
<i>Salmonella</i> Enteritidis	7,3 x 10 ⁸

A Figura 9 ilustra as placas referentes à contagem de *Bacillus cereus* e *Salmonella* Enteritidis nas diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶, nas quais foi possível contar de 5 a 50 unidades formadoras de colônia (UFC).

Figura 9 – Contagem bacteriana pelo método da gota: a) *Bacillus cereus* e b) *Salmonella* Enteritidis.



(a)

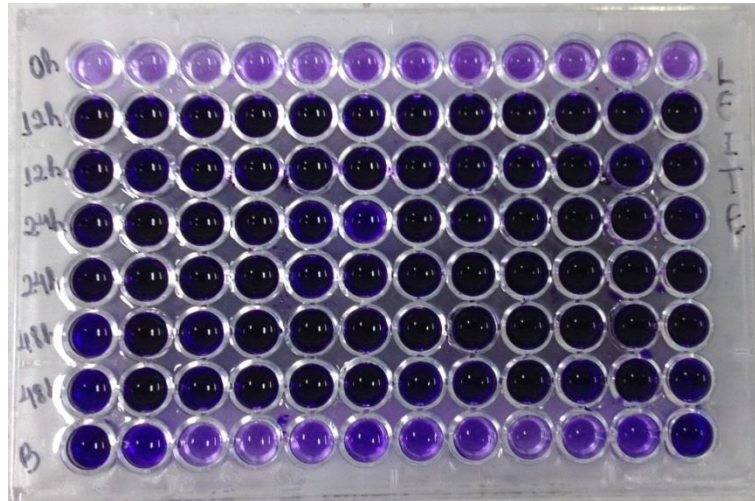
(b)

Fonte: Autoria própria.

5.2 Ensaio de adesão dos microrganismos

Após a visualização dos biofilmes formados pelo método do cristal violeta, foi possível avaliar a quantidade de biofilme aderido. A Figura 10 ilustra o aspecto das placas após o procedimento de coloração:

Figura 10 – Placa de poliestireno com biofilme formado após procedimento de coloração.



Os resultados dos ensaios de adesão de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 cultivadas nos meios comerciais CN e TSYEB são mostrados nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 – Cinética de adesão do biofilme de *Salmonella* Enteritidis em superfície de poliestireno usando os meios comerciais CN e TSYEB.

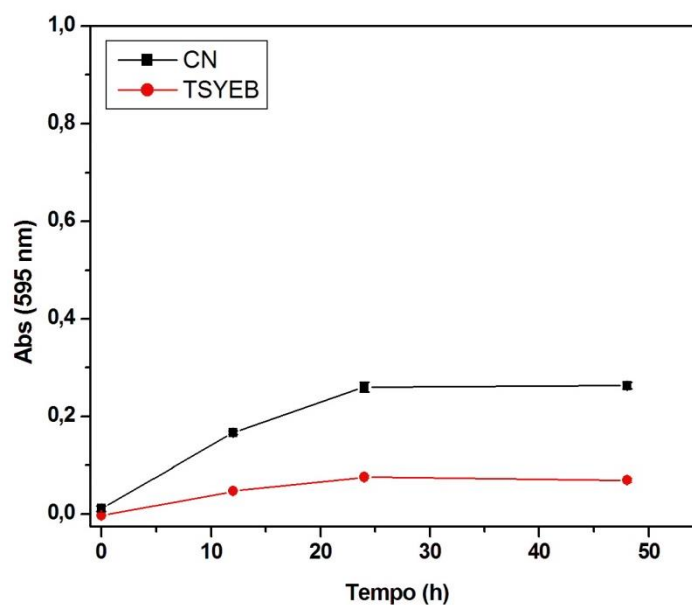
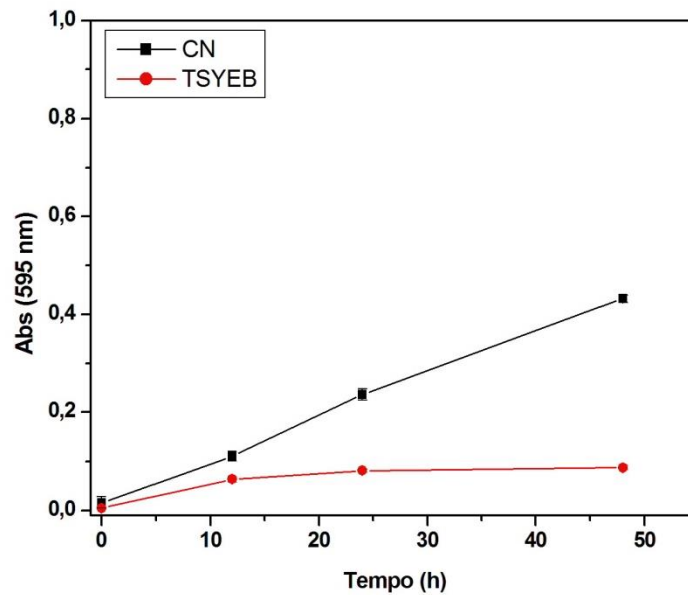


Figura 12 – Cinética de adesão do biofilme de *Bacillus cereus* em superfície de poliestireno usando os meios comerciais CN e TSYEB.



Observa-se que para ambas as bactérias não houve adesão eficiente quando cultivadas no meio TSYEB. Uma possível explicação para isso pode ser a composição de nutrientes dos meios de cultura (Tabela 2). Como ambos são meios complexos, não se sabe exatamente a composição destes, sendo provável que algum nutriente essencial não esteja presente no meio TSYEB. Assim, o meio comercial selecionado para os testes de remoção do biofilme com o ramnolipídeo foi o CN.

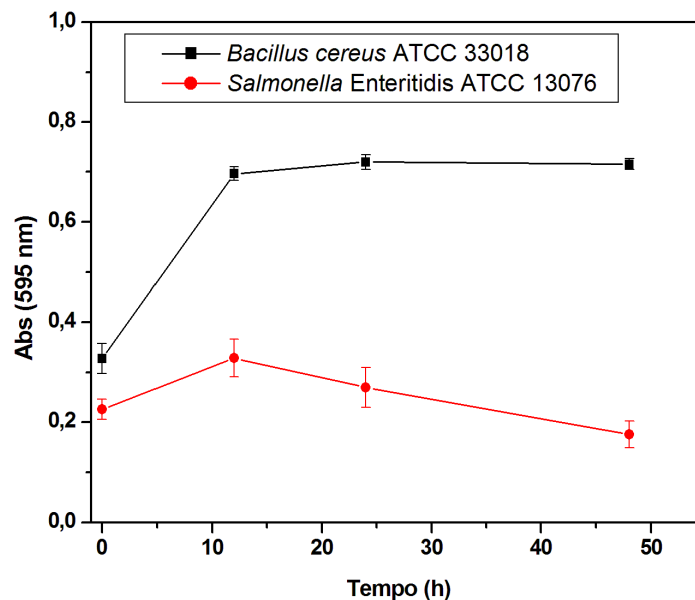
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura.

Meio de cultura	Composição (g L ⁻¹)
CN	Extrato de carne 5 g
	Digestão enzimática de gelatina 3 g
TSYEB	Extrato de levedura 6 g
	Digestão enzimática de caseína 17 g
	Digestão enzimática de farelo de soja 3 g
	Cloreto de sódio 5 g,
	Fosfato dipotássico 2,5 g
	Dextrose 2,5 g

Meio de cultura	Composição (em 20 g de leite em pó)
Leite	Carboidratos 10 g
	Proteínas 6,8 g
	Sódio 99 mg
	Cálcio 223 mg

A Figura 13 mostra os resultados dos ensaios de adesão de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 cultivadas na matriz alimentar leite 10%.

Figura 13 – Cinética de adesão de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 em superfície de poliestireno utilizando leite como meio de crescimento.



A adesão de *Bacillus cereus* foi bastante satisfatória no leite, com valores de absorvância em torno de 0,7 a partir de 10 horas de incubação. A adesão de *Salmonella* Enteritidis, apesar de menor, também foi suficiente para testar a suscetibilidade do biofilme frente à ação do ramnolipídeo.

Baseado nesse experimento foram escolhidos os biofilmes de 24 h, uma vez que tempos maiores não resultaram em maior formação de biofilme. Além disso, com biofilmes de 24 h foi possível trabalhar com as duas bactérias de estudo ao mesmo tempo.

5.3 Remoção dos biofilmes pré-formados em superfície de poliestireno

A ação do ramnolipídeo na remoção dos biofilmes de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 foi avaliada no meio comercial CN e na matriz alimentar leite 10%, em duas temperaturas (4 °C e 25 °C) e em duas concentrações (0,25% e 0,50% v/v).

5.3.1 *Salmonella* Enteritidis

O tratamento para *Salmonella* Enteritidis, no meio comercial CN, foi eficiente apenas a 25°C, não havendo influência da concentração (Figura 14). Já no leite, o biossurfatante foi mais eficiente na concentração 0,50% para ambas temperaturas, sendo a remoção a 4°C um pouco mais eficiente (Figura 15).

Figura 14 – Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolipídeo na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em CN. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.

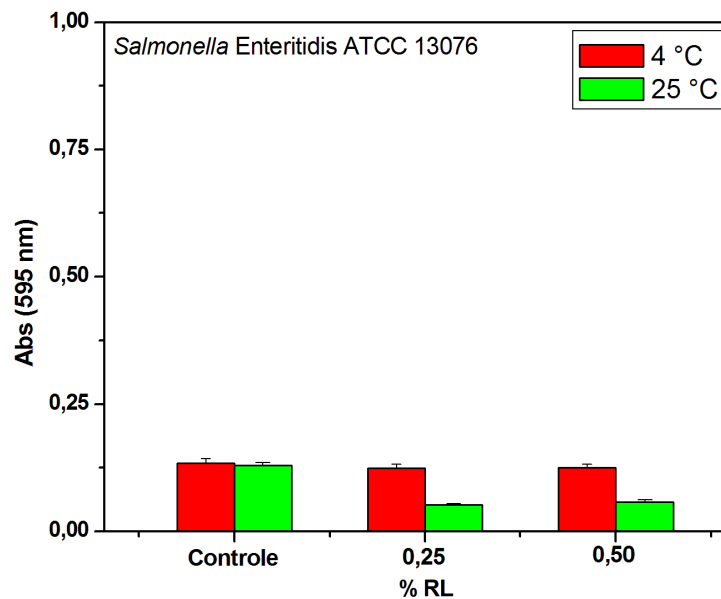
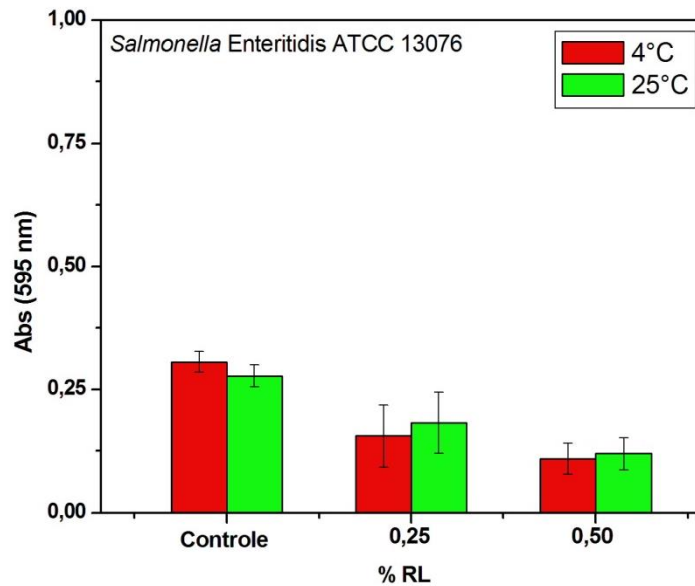


Figura 15 – Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolipídeo na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em leite. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.



A Tabela 3 apresenta as porcentagens de remoção para cada tratamento:

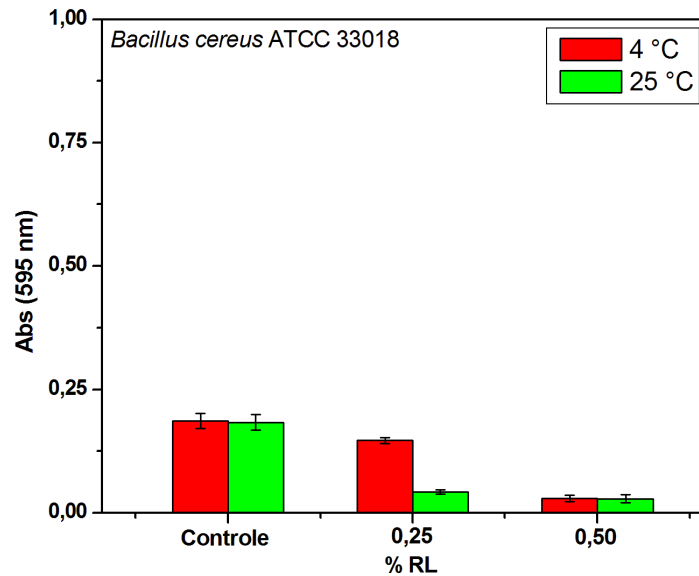
Tabela 3 – Porcentagem de remoção do biofilme de *Salmonella* Enteritidis formado sobre superfície de poliestireno nos diferentes meios.

Meio	Temperatura (°C)	Concentração de ramnolipídeo (%)	% remoção do biofilme
CN	4	0,25	7
		0,50	6
	25	0,25	60
		0,50	56
Leite	4	0,25	49
		0,50	64
	25	0,25	41
		0,50	39

5.3.2 *Bacillus cereus*

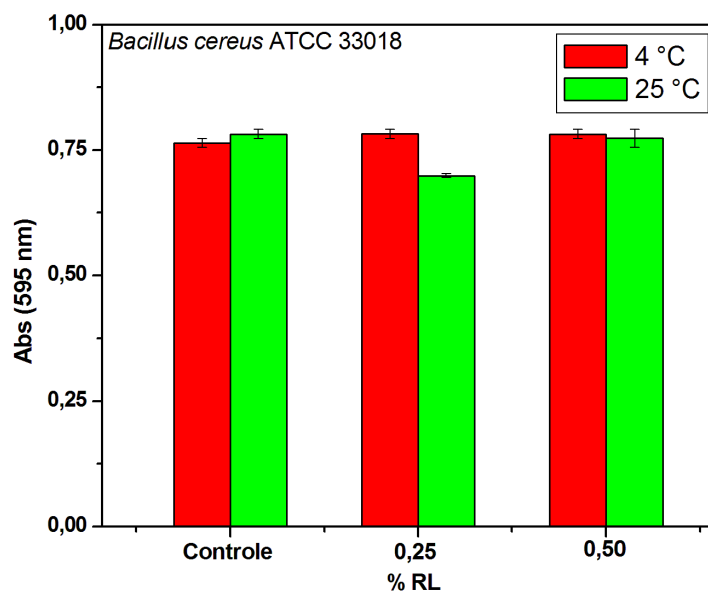
Para o tratamento de *Bacillus cereus* em CN o ramnolipídeo 0,25% foi eficiente a 25 °C, não havendo remoção a 4 °C. Entretanto, para a concentração 0,50%, a temperatura não foi um fator determinante (Figura 16).

Figura 16 – Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolípídeo na remoção de biofilmes de *Bacillus cereus* pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em CN. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.



O tratamento com ramnolípídeo apresentou resultados pouco satisfatórios para o biofilme de *Bacillus cereus* no leite, sendo possível observar uma pequena remoção apenas na concentração 0,25% a 25 °C (Figura 17).

Figura 17 – Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de ramnolípídeo na remoção de biofilmes de *Bacillus cereus* pré-formados em superfície de poliestireno quando cultivada em leite. Os dados representam a média de no mínimo três repetições independentes \pm erro padrão.



A Tabela 4 apresenta as porcentagens de remoção para cada tratamento:

Tabela 4 – Porcentagem de remoção do biofilme de *Bacillus cereus* formado sobre superfície de poliestireno nos diferentes meios.

Meio	Temperatura (°C)	Concentração de ramnolípídeo (%)	% remoção do biofilme
CN	4	0,25	21
		0,50	85
	25	0,25	77
		0,50	84
Leite	4	0,25	-2
		0,50	-2
	25	0,25	11
		0,50	1

5.3.3 Discussão sobre a ação do ramnolípídeo na remoção dos biofilmes pré-formados

A eficiência do ramnolípídeo na remoção dos biofilmes das diferentes bactérias nos diferentes meios pode ser explicada pela composição das SPE presentes na matriz que envolve o biofilme, uma vez que estas variam entre as bactérias. Além disso, a composição do meio de cultura também pode influenciar a adesão do microrganismo à superfície e, conseqüentemente, facilitar ou dificultar a penetração do biossurfactante nas camadas do biofilme.

Enquanto em fase aquosa, o leite pode beneficiar o processo de adesão e de formação de biofilmes, devido a sua rica constituição em carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, bem como devido a sua alta atividade de água e pH tendendo ao neutro (CASALINI, 2008).

Kim et al. (2015) investigaram as interações físico-químicas entre um ramnolípídeo e uma camada de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Uma concentração de 300 µg mL⁻¹ de ramnolípídeos, mostrou grande potencial de redução de biofilme. As concentrações de carboidratos e proteínas constituintes das substâncias poliméricas extracelulares diminuíram em 31,6% e 79,6%, respectivamente.

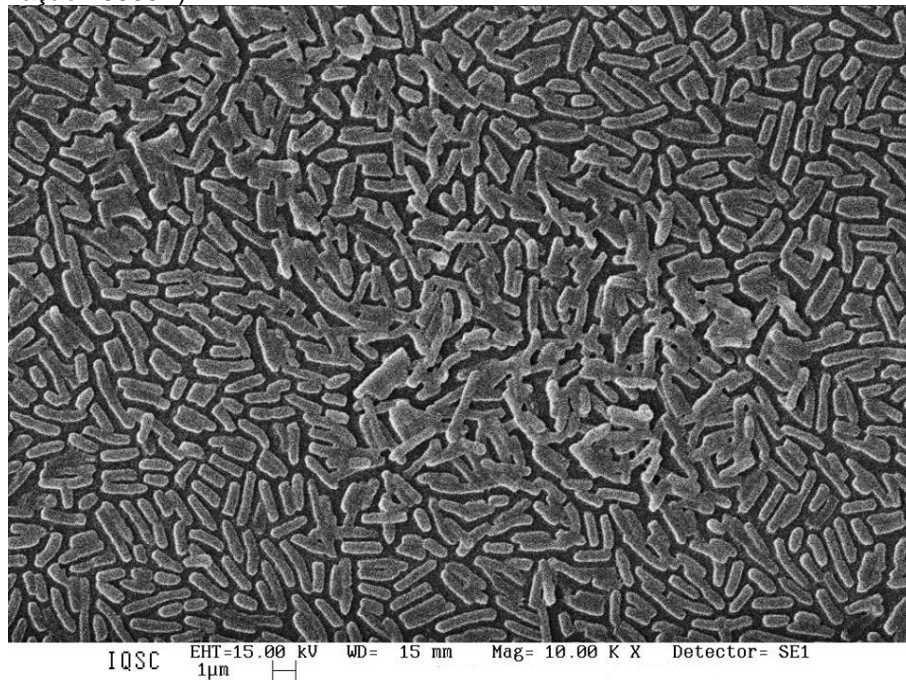
Outro fator que influencia a eficiência do BS é a concentração micelar crítica (CMC), uma vez que os surfatantes formam agregados em solução aquosa a partir

de uma determinada concentração. Esses agregados de monômeros do biossurfatante possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas associadas espontaneamente em solução aquosa a partir da CMC, formando estruturas de dimensões coloidais. Abaixo da CMC o biossurfatante está predominantemente na forma de monômeros; e em concentração igual ou superior à CMC, o tensoativo está organizado majoritariamente na forma de micelas, sendo o tipo dependente da estrutura do tensoativo e das condições experimentais (força iônica, pH e temperatura). Assim, como a eficiência do BS está baseada em sua capacidade de diminuir a tensão interfacial, a organização estrutural das moléculas pode influenciar a capacidade de remover o biofilme (MANIASSO, 2001).

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens (Figuras 18 e 19) de MEV ilustram a formação dos biofilmes e a ação do tratamento com ramnolípídeo na remoção dos biofilmes bacterianos pré-formados quando cultivados no meio comercial CN.

Figura 18 – Imagens de MEV do biofilme de *Salmonella* Enteritidis sobre a superfície de poliestireno: a) Sem adição de biossurfatante (ampliação 10000X); b) Com adição de ramnolípídeo 0,25% a 25°C por 2 h (ampliação 10000X).



(a)

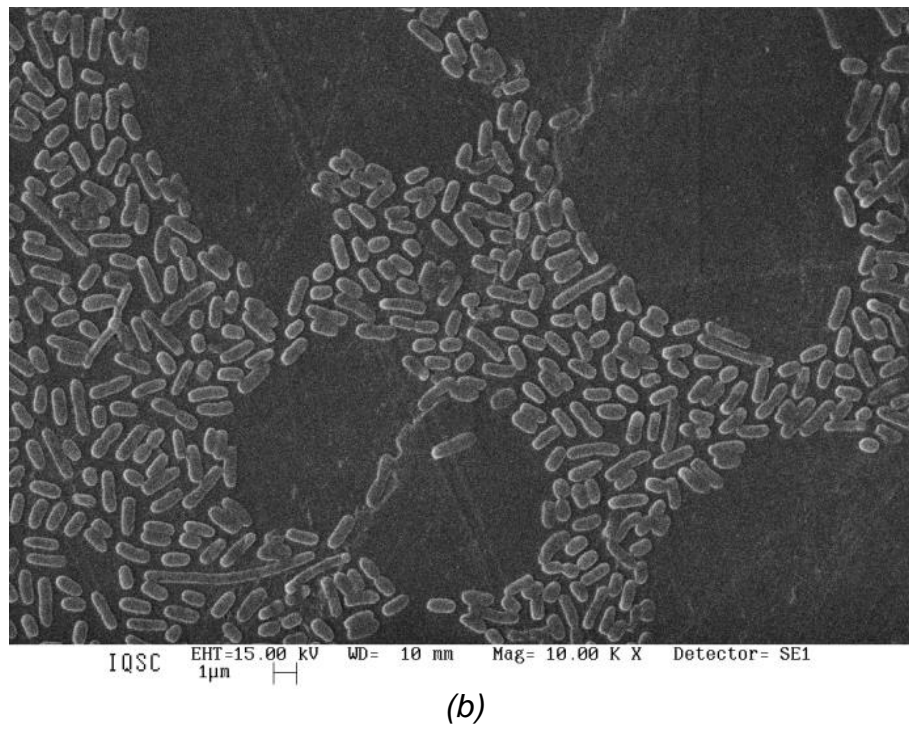
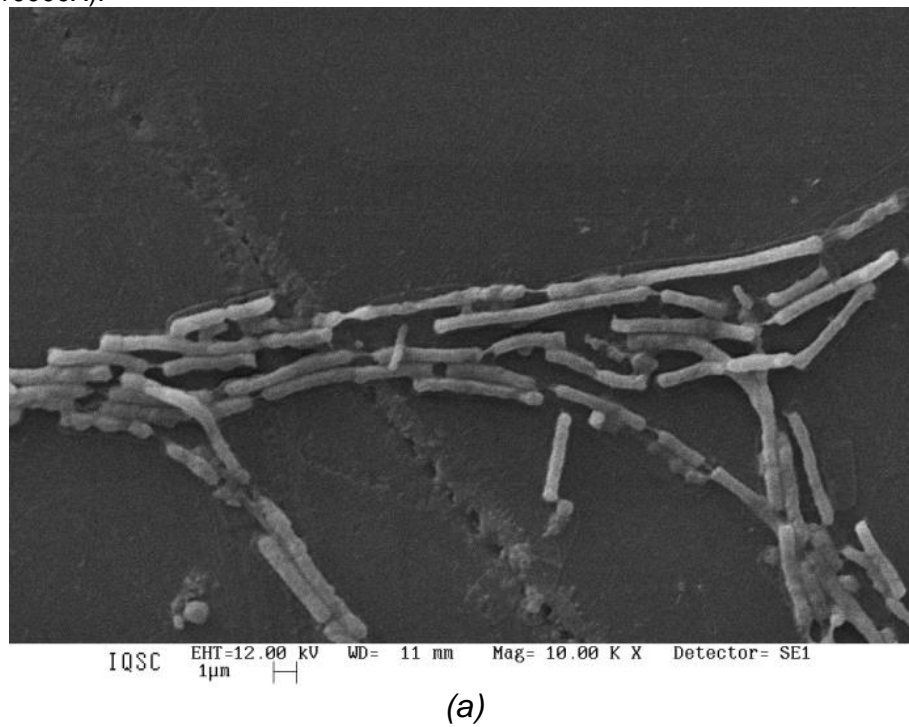
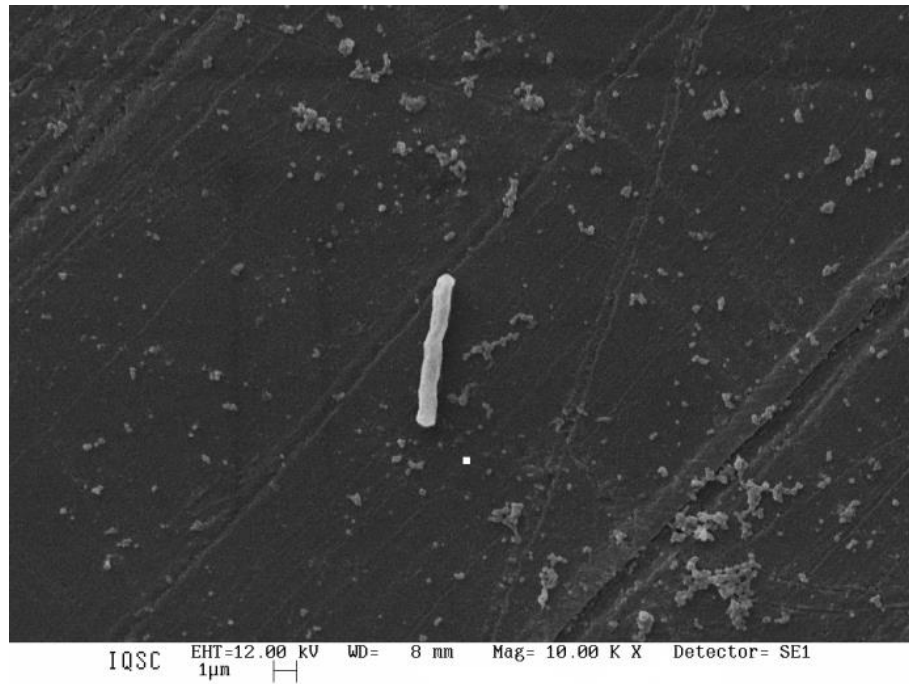


Figura 19 – Imagens de MEV do biofilme de *Bacillus cereus* sobre a superfície de poliestireno: a) Sem adição de biosurfatante (ampliação 10000X); b) Com adição de ramnolípideo 0,50% a 25°C por 2 h (ampliação 10000X).





(b)

Com a adição do ramnolípídeo sobre o biofilme foi possível observar a redução das bactérias aderidas na superfície, demonstrando a ação do biossurfatante.

As imagens obtidas por MEV concordam com os resultados dos testes de adesão em microplaca, evidenciando-se a diferença na quantidade de microrganismos aderidos na superfície referente ao controle e naquela que recebeu tratamento com ramnolípídeo.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que os patógenos alimentares *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Bacillus cereus* ATCC 33018 formaram biofilmes quando cultivados no meio comercial CN e no leite e aderiram à superfície poliestireno.

O biossurfatante (ramnolipídeo) comercial utilizado apresentou ação dispersante sobre os biofilmes destas bactérias, com exceção para o ensaio de *Bacillus cereus* no leite, no qual praticamente não houve remoção do biofilme pré-formado.

É importante ressaltar que, na maioria dos casos, a temperatura não foi um fator determinante, exceto no tratamento de *Salmonella* Enteritidis no meio CN a 25°C, onde obteve-se um resultado significativamente superior. Quanto à concentração, de maneira geral, os resultados foram ligeiramente melhores na concentração 0,50% v/v.

Para trabalhos futuros pode-se avaliar a ação do ramnolipídeo sobre outros patógenos alimentares, utilizando-se diferentes concentrações, temperaturas e tempos de contato entre o biossurfatante e o biofilme pré-formado. Outros parâmetros a serem avaliados são o pH, a força iônica e os meios de cultura utilizados.

Por fim, como citado neste trabalho, mais estudos sobre a composição da matriz que envolve o biofilme pode ser o caminho mais promissor para se entender os mecanismos relacionados à adesão e rompimento dos biofilmes.

REFERÊNCIAS

- BANAT, I. M.; Rienzo, M. A. D.; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9915-9929, 2014.
- BLACKLEDGE, M. S.; WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 699-706, 2013.
- CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. **Food Engineering Reviews**, v. 6, p. 29-42, 2014.
- CASALINI, J. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos**. 2008. 46f. Trabalho acadêmico (Disciplina de seminários em alimentos) – Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade de Pelotas, Pelotas, 2008.
- COELHO, N. R. A. **Noções de higienização na indústria de alimentos**. 2014. 9f. Trabalho acadêmico (Disciplina Processamento de frutas e hortaliças) – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2014.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.
- DUSANE, D. H.; NANCHARIAH, Y. V.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 242-248, 2010.
- GEYS, R.; SOETAERT, W.; BOGAERT, I. V. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 66-72, 2014.
- GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, v. 23, p. 747-752, 2006.
- GUDIÑA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667-675, 2013.
- HAMIDA, K.; FATEN, K.; SOUMYA, E. A.; SAAD, I. K.; HASSAN, L.; MOKTAR, H. *Bacillus cereus* adhesion: an investigation of the physicochemical characteristics of surface and effect of bio adhesion on the properties of silicone. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 90-101, 2013.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.

- KIM, L. H. Physicochemical interactions between rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 3718-3726, 2015.
- LAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2327-2339, 2013.
- LEGENDRE, G.; FAY, F.; LINOSSIER, I.; VALLÉE-RÉHEL, K. Evaluation of antibacterial activity against *Salmonella* Enteritidis. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 349-354, 2011.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-11, 2010.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
- MEGADES VOEDSELVEILIGHEID. *Bacillus cereus*. Disponível em: <<http://www.voedselveiligheid.org/microbiologische-onderzoeken/ziekmakende-bacterien/bacillus-cereus/>>. Acesso em: 06 jul. 2015.
- NICKZAD, A.; DÉZIEL, E. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development – an approach for control? **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, p. 447-453, 2013.
- NITSCHKE, M; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 318-323, 2007.
- PAGEDAR, A.; SINGH, J. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **Internation Dairy Journal**, v. 23, p. 30-35, 2012.
- PEÑA, W. E. L.; ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F.; ALVARENGA, V. O.; JUNIOR, S. R.; GRANATO, D.; ZUNIGA, A. D. G.; SANT'ANA, A. S. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface is affected by temperature, pH and time. **Internation Dairy Journal**, v. 34, p. 153-158, 2014.
- RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.
- REIS, R. S.; PEREIRA, G. A.; NEVES, B. C.; FREIRE, D. M. G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6377-6384, 2011.

SAMARITAN ID. Infectious Diseases Case of the Month. Disponível em:
<<http://www.samaritanid.com/idcase4.php>>. Acesso em: 06 jul. 2015.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.