

Copyright 2016, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2016, em Búzios/RJ no mês de maio de 2016.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Superfícies condicionadas por biossurfactantes, avaliação das propriedades anticorrosivas, antiadesivas/antibiofilmes e antimicrobianas

Lívia V. de Araujo^a, Carolina Reis Guimarães^b, Márcia Nitschke^c, Denise Maria Guimarães Freire^d

Abstract

Biofilm growth in food industrial processing environment increases the probability of product's microbial contamination by spoilage and pathogenic microorganisms. Microbial growth on metal alloy surfaces also leads to corrosion and subsequently higher costs for the industry which needs to replace those surfaces more frequently. Biosurfactants represent a great strategy to reduce biofilms. Surfactin, rhamnolipid and a commercial surfactant were tested against *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* biofilms on polystyrene and 304 stainless steel surfaces. Anticorrosion effects were evaluated on 304 and 430 stainless steel and on galvanized and carbon steel. Adhesion was reduced up to 79% and 54% on polystyrene, while biofilm formation was reduced up to 83% and 73% on stainless steel surfaces (rhamnolipids and surfactin, respectively). Surfactants altered the physicochemical characteristics of surfaces resulting in metal alloy protection with rhamnolipids (confirmed by SEM). When added to culture medium, surfactants showed antimicrobial activity against all strains. Results demonstrate a good potential of the tested biomolecules to decrease adhesion/biofilm formation on surfaces and postpone metal alloys corrosion.

Keywords: Biofilms, Biosurfactant, Anticorrosion, Rhamnolipids, Surfactin.

Resumo

O desenvolvimento de biofilmes em ambientes de processamento industrial de alimentos aumenta a probabilidade de contaminação microbiana dos produtos por microrganismos deterioradores e patogênicos. O crescimento microbiano em superfícies de ligas metálicas também pode levar à corrosão e conseqüentemente a maiores custos para a indústria que precisará trocar equipamentos com maior frequência. Os biossurfactantes representam uma excelente estratégia para reduzir a formação de biofilmes. A surfactina, o ramnolípídeo e um surfactante comercial foram testados contra biofilmes de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* em poliestireno e aço inoxidável AISI 304. Os efeitos anticorrosivos foram avaliados em aço inoxidável 304 e 430, também em aço galvanizado e aço carbono. A adesão foi reduzida em até 79% e 54% no poliestireno, enquanto que a formação de Biofilme chegou a 83% e 73% de redução nas superfícies de aço inox (ramnolípídeos e surfactina, respectivamente). Os surfactantes alteraram as propriedades físico-químicas das superfícies, resultando em proteção

^a D.Sc. Pesquisadora – LaBiM UFRJ

^b M.Sc. Doutoranda – LaBiM UFRJ

^c D.Sc. Professora – IQ USP

^d D.Sc. Professora – LaBiM UFRJ

das ligas metálicas com o uso dos ramnolipídeos (confirmado por MEV). Quando adicionados ao meio de cultivo, os surfactantes demonstraram atividade antimicrobiana contra ambos os microrganismos. Os resultados indicam um bom potencial das moléculas testadas para reduzir adesão e formação de biofilmes, assim como postergar o início do processo corrosivo em ligas metálicas.

Palavras chave: Biofilmes, Biossurfactantes, Anticorrosivo, Ramnolipídeos, Surfactina.

Introdução

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que apresentam propriedades surfactantes (diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade de emulsificação) e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (1). Compostos surfactantes são requisitados em todas as indústrias para uma ampla gama de aplicações. Os surfactantes sintéticos poderiam ser substituídos por biossurfactantes em muitas áreas (1; 2). As atividades superficiais e interfaciais dos biossurfactantes são mais efetivas que as dos convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), devido a valores menores de tensão superficial com menores concentrações de produto ativo.

Os biofilmes são uma grande preocupação em indústrias de processamento de alimentos, uma vez que seu estabelecimento pode resultar em obstrução de tubulações, corrosão em equipamentos, redução da eficiência em sistemas de troca de temperatura e ainda, em deterioração e contaminação por patógenos nos produtos finais (3), interferindo não apenas na economia do processo mas também na saúde do consumidor. Portanto, é imperativa a busca de novas estratégias para o controle de biofilmes.

Alguns estudos demonstraram que o condicionamento de superfícies com biossurfactantes pode reduzir substancialmente a contaminação microbiana de materiais e conseqüentemente inibir a formação de biofilmes (4). O número de células de *L. monocytogenes* aderidas ao aço inoxidável foi reduzida em 2 ciclos logarítmicos (5). O potencial antiadesivo dos ramnolipídeos e da surfactina foi avaliado contra linhagens de *L. monocytogenes* pelo condicionamento do poliestireno e os resultados demonstraram que ambos os biossurfactantes foram eficientes em atrasar a colonização da superfície por bactérias (6). No entanto, o mecanismo envolvido nesta atividade anti-adesiva ainda não é muito bem entendido.

Dentro deste contexto, é importante investigar a relação entre as propriedades físico-químicas das superfícies e a inibição da adesão e formação de biofilmes, avaliando assim, quais seriam as melhores condições de aplicação dos biossurfactantes para cada aplicação específica de acordo com as propriedades de cada surfactante. Ademais, alguns surfactantes também podem proteger contra a corrosão, superfícies de ligas metálicas (7). Estes produtos que apresentam propriedades antiadesivas, antibiofilmes, antimicrobianas e anticorrosivas são de grande interesse para indústrias alimentícias. O objetivo deste trabalho foi avaliar estas propriedades utilizando os biossurfactantes ramnolipídeo e surfactina e compará-los a um surfactante comercial.

Metodologia

Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos brutos foram obtidos a partir do cultivo de *P. aeruginosa* PA1 (8; 9) de acordo com a metodologia descrita por Santos et al (10). O caldo de cultivo contendo ramnolipídeos e livre de células foi purificado de acordo com Costa et al. (11). A quantificação foi realizada utilizando a metodologia de Pham et al modificada (12). Os valores de ramnose foram ajustados para conteúdo de ramnolipídeos de acordo com Santa Anna (13). A composição de homólogos dos ramnolipídeos produzidos e sua respectiva porcentagem foram determinados de acordo com Déziel et al. (14).

Surfactina

A surfactina foi produzida a partir de cultivos do *B. subtilis* ATCC 21332 (INCQS, Brasil). A mesma foi produzida e purificada de acordo com Nitschke e Pastore (15).

Surfactante Comercial

Um produto comercial que consiste de uma mistura de peptídeos de baixo peso molecular e um surfactante químico foi comprado e gentilmente fornecido pelo CENPES/Petrobras (Brasil). Soluções aquosas foram preparadas nas mesmas concentrações que as utilizadas para os biossurfactantes.

Condicionamento das superfícies

Poços de placas de microtitulação de poliestireno e de aço inox AISI 304 e cupons de 2 cm² de aço inoxidável AISI 304, 430, aço carbono, aço galvanizado e poliestireno foram pré-condicionados com soluções aquosas dos diferentes surfactantes. Água foi utilizada como controle. Após 24 horas, as superfícies foram lavadas com água destilada esterilizada e deixadas para secar em temperatura ambiente.

Propriedades físico-químicas

Os seguintes parâmetros foram analisados de forma a comparar as propriedades tensoativas respectivas aos produtos: tensão superficial (TS), tensão interfacial (TI, contra o *n*-hexadecano) e concentração micelar crítica (CMC). Estes parâmetros foram determinados utilizando a técnica da gota pendente (DSA 100S Goniômetro, Modelo: OF 3210) de acordo com Song e Springer (16). Diluições seriadas do biossurfactante foram realizadas em água e a mesma técnica foi utilizada para determinar a concentração micelar crítica (CMC) de acordo com Sheppard e Mulligan (17).

O índice de emulsificação (E_{24}) utilizando *n*-hexadecano foi avaliado de acordo com Cooper (18). A altura da camada emulsificada foi monitorada durante 30 dias para verificar a estabilidade da emulsão ao longo do tempo.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Cupons tratados e não tratados (2 cm x 2 cm) de diferentes materiais (304 aço inoxidável, 430 aço inoxidável, aço carbono, aço galvanizado) foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a extensão da corrosão dessas ligas metálicas depois de condicionado. As amostras foram metalizadas e examinadas por microscopia eletrônica de varredura em alto vácuo (FEI Company Quanta 200). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 5000 x, 20 kV.

Propriedades Físico-Químicas das Superfícies Abióticas e Microbianas

A técnica da gota sésil (Krüss DSA 100S goniômetro, modelo: DE 3210) foi utilizada para medir o ângulo de contato entre as superfícies e diferentes líquidos (água, formamida e de etileno-glicol). Os ângulos foram medidos pela abordagem de Van Oss (19). Os resultados são expressos como o valor médio de pelo menos dez gotas (10 mL) a 23 ° C e 55% de umidade relativa.

A energia livre de superfície foi calculada a partir dos componentes de tensão superficial de cada líquido conhecido, obtidos a partir do ângulo de contato utilizando a equação 1 (19):

$$(1 + \cos\theta)\gamma_i^{TOT} = 2 \left[\left(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_i^{LW}} \right) + \left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_i^-} \right) + \left(\sqrt{\gamma_s^- \gamma_i^+} \right) \right]$$

eq (1)

onde: θ é o ângulo de contato entre o líquido e a superfície; γ^{TOT} é a energia livre de superfície total; γ^{LW} é o componente Lifshitz-van der Waals; γ^{AB} é propriedade ácido-base de Lewis; γ^+ e γ^- são os componentes aceptores e doadores de elétrons, respectivamente; $\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB}$ e $\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-}$

A hidrofobicidade da superfície foi determinada através de medições de ângulo de contato e pela abordagem de Van Oss et al. (20) e Van Oss (19), que indica que o grau de hidrofobicidade de um material (i) é expresso como a energia livre da interação entre duas entidades deste material, quando imerso em água (w), ΔG_{iwi} . Se a interação entre as duas entidades é mais forte do que a interação de cada entidade com água, o material é considerado hidrofóbico ($\Delta G_{iwi} < 0$). Materiais hidrofílicos têm um $\Delta G_{iwi} > 0$. Os resultados foram calculados de acordo com a equação 2:

$$\Delta G_{iwi} = -2 \left(\sqrt{\gamma_i^{LW} - \gamma_w^{LW}} \right) - 4 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} + \sqrt{\gamma_i^- \gamma_w^+} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} \right)$$

eq 2

As propriedades físico-químicas das células microbianas foram obtidas de acordo com a mesma metodologia descrita para superfícies sólidas, após a deposição de uma camada de Biofilme em membranas de acetato de celulose.

Inóculo para os Biofilmes e Condições de Cultivo

Os microrganismos formadores de biofilmes escolhidos foram: *L. monocytogenes*, ATCC 7644 e ATCC 19112 (INCQS, Brasil) e *P. fluorescens* ATCC 13525 (INCQS, Brasil). As culturas mantidas em estoque foram inoculadas em tubos inclinados de ágar TSYEA, durante 24 h a 35 ° C e 30 ° C, com *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* respectivamente. Após o crescimento, adicionou-se água destilada estéril à superfície e uma suspensão foi preparada. Sua densidade óptica foi padronizada em 10^9 UFC mL⁻¹ (6) (610 nm - ANALYTIK JENA SPECORD 210).

Suspensões padronizadas de cada uma das estirpes foram inoculadas em poços de placas de microtitulação contendo caldo para monitorizar a cinética da adesão e formação de biofilmes na superfície. No final de cada período de tempo, as superfícies foram preparadas de acordo com Stepanovic et al. (21). Células fixadas foram coradas com violeta de cristal e este foi solubilizado com ácido acético glacial possibilitando a leitura de comprimento de onda a 570 nm, utilizando um leitor de microplacas (Biotech - Power Wave XS) de acordo com Stepanovic et al. (22).

Composição do Biofilme

A massa seca do Biofilme foi calculada utilizando suspensões preparadas de acordo com Cerca et al. (23). O peso seco (g_{Biofilme}) foi convertido em $g_{\text{Biofilme}} \text{ cm}^{-2}$ sabendo-se a área total utilizada na formação de biofilmes. A matriz do Biofilme foi extraída de acordo com Azeredo et al. (24) e o seu conteúdo foi determinado subtraindo o peso seco de células removidas a partir do peso seco total do Biofilme ($\text{mg}_{\text{matriz}} g_{\text{Biofilme}}^{-1}$). Exopolissacarídeos da matriz foram quantificados de acordo com a metodologia de fenol-ácido sulfúrico (25), utilizando a curva padrão para a glicose. A quantidade de polissacarídeos pode então ser normalizada por massa de biofilme ($\text{mg}_{\text{matriz}} g_{\text{biofilme}}^{-1}$). As proteínas da matriz do biofilme foram quantificadas de acordo com a metodologia de Bradford (26), utilizando BSA (albumina de soro bovino) como curva padrão. Da mesma forma que para os exopolissacarídeos, a quantidade de proteínas pode ser normalizada por massa de Biofilme ($\text{mg}_{\text{proteína}} g_{\text{Biofilme}}^{-1}$).

Atividade Antimicrobiana dos Biosurfactantes

A atividade antimicrobiana foi quantificada de acordo com Wiegand et al. (27) através da leitura da absorbância (590 nm) após 24 h de crescimento dos microrganismos testados com um inóculo inicial de 10^6 UFC mL⁻¹ na presença ou ausência de diferentes concentrações de biosurfactantes. Este teste também foi utilizado para avaliar o potencial para a formação de biofilmes quando o biosurfactante foi adicionado ao meio de cultivo. Após a determinação do crescimento pela leitura da absorbância, os biofilmes foram quantificados segundo o procedimento descrito anteriormente.

Estatística

Os resultados foram expressos como a média de pelo menos 4 réplicas independentes. Os dados foram analisados por ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade), utilizando o programa Statistica 7 (STATSOFT Inc.).

Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 1, os biossurfactantes foram tão efetivos quanto o surfactant comercial no abaixamento da tensão superficial e interfacial e suas concentrações micelares críticas foram baixas. O ramnolípídeo purificado apresentou o maior índice de emulsificação ($70.5\% \pm 0.6$), seguido pelo surfactante comercial ($66.4\% \pm 0.5$), surfactina ($34.5\% \pm 5.1$) e ramnolípídeo bruto ($27.1\% \pm 3.2$). A estabilidade da emulsão foi monitorada por um mês. Após este período as emulsões reduziram apenas 4.8% e 10.9% com o tensoativo comercial e ramnolípídeo purificado, respectivamente.

Tabela 1. Tensão superficial (TS), tensão interfacial* (TI) e concentração micelar crítica (CMC) dos tensoativos testados.

Tensoativos	TS (mN/m)	TI (mN/m)	CMC (mg/L)
Ramnolípídeo Bruto (RB)	28.5 ± 0.3	18.5 ± 0.3	59.0 ± 2.6
Ramnolípídeo Purificado (RP)	25.7 ± 0.3	<1.0	110.0 ± 3.0
Surfactina (SU)	26.8 ± 0.1	21.8 ± 2.8	83.7 ± 0.8
Surfactante Comercial (SC)	27.5 ± 0.4	11.4 ± 1.6	56.0 ± 6.7

*contra o *n*-hexadecano

As diferenças entre os índices de emulsificação, para um mesmo agente tensoativo purificado em relação ao não purificado, podem resultar de componentes interferentes presentes no meio de cultura que não foram removidos pelo procedimento de purificação. Tais interferências podem diminuir a taxa de emulsificação e estabilidade da emulsão ao longo do tempo.

O conhecimento sobre as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes produzidos é de grande importância. Condições de cultura e estirpes utilizadas para produzir biossurfactantes podem influenciar a mistura da composição de homólogos nos meios finais e, portanto, pode afetar as características físico-químicas, tais como concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial (ST), tensão interfacial (TI), índice de emulsificação (E_{24}), estabilidade da emulsão e, conseqüentemente, suas propriedades antimicrobianas, anti-adesivas, anti-biofilme e anti-corrosivas. Ramnolípídeos produzidos por estirpes de *P. aeruginosa* são geralmente uma mistura de homólogos contendo os dois principais tipos RL1 (Rha-C₁₀-C₁₀) e RL2 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (28), que também foram encontrados neste estudo (Tabela 2).

Os ramnolípídeos purificados apresentaram 72% de pureza. A tabela 2 enumera a composição química das misturas de homólogos de ramnolípídeos produzidos por *P. aeruginosa* PA1. Os resultados indicam que os principais componentes desta mistura são RhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C₁₀, representando aproximadamente 34% e 31%, respectivamente. Houve uma distribuição quase equivalente entre mono- e di-ramnolípídeos, correspondente a 51,5% de mono-ramnolípídeos e 48,5% de di-ramnolípídeos.

Tabela 2. Composição química dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* PA1.

Composição	Percentual (%)
Rha-C ₁₀ -C ₈	7.98
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	33.91
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	3.67
Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	0.81
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	4.88
Rha-C ₁₂ -C _{12:1}	0.22
Rha-Rha-C ₈ -C ₈	0.02
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	4.69
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	30.76
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	6.82
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	0.38
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₄	0.01
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	0.53
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	4.55
Rha-Rha-C ₁₂ -C _{12:1}	0.64
Rha-Rha-C ₁₂ -C _{14:1}	0.05

A atividade antimicrobiana de biossurfactantes foi determinada com o objetivo de compreender se as alterações físico-químicas das superfícies condicionadas em inibir / reduzir a adesão e formação de biofilme, e se a atividade antimicrobiana interfere nestes processos. Também foi avaliada a indução ou inibição de biofilme com o bio-tensoativo adicionado ao meio de cultura.

Todos os tensoativos foram capazes de inibir o crescimento planctônico dos microrganismos testados, com a exceção de surfactina contra *P. fluorescens* (Tabela 3). As células aderidas foram reduzidas até 100% para a maioria das concentrações de ramnolipídeo após 24h.

Abalos et al. (28) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma mistura de ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* AT10 contra uma vasta gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos, e concluiu que, devido às propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana elevada, de uma mistura de sete homólogos de ramnolipídeos, estes poderiam ser uma ferramenta útil em processos de biorremediação, cosméticos e indústrias de alimentos.

A inibição de biofilmes de *P. fluorescens* ATCC 13525 por ramnolipídeo bruto foi maior do que com ramnolipídeos purificados. Estas diferenças no crescimento e formação de biofilme (Tabela 3) podem ser devido à presença de outros componentes no bruto que foram parcialmente ou totalmente eliminados na forma purificada. Esses componentes podem ser fatores de virulência de natureza proteica e também moléculas de *quorum sensing*: elastase,

protease LasA, protease alcalina, fosfolipase C, lipase, exotoxina A, cianeto, piocianina, lecitina e superóxido dismutase. A produção destas moléculas é coordenada por *quorum sensing* e ocorre concomitantemente com a produção ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (29; 30). Moléculas produzidas por *P. aeruginosa* que possuem atividade *quorum sensing* podem também interferir com o comportamento de outros microrganismos que não produzem os mesmos sinais, por exemplo o sistema de 3-oxo-C12-HSL (LasI / R) e PQS que apresentam propriedades anti-bacterianas excelentes (31).

Tabela 3 - Inibição do crescimento planctônico e biofilme (%) quando o tensoativo é adicionado ao meio de cultivo.

Microrganismo	Tipo de Inibição	Tipo de Produto	Concentração de Tensoativo ($\mu\text{g/mL}$)				
			2500 ($\mu\text{g/mL}$)	1250 ($\mu\text{g/mL}$)	600 ($\mu\text{g/mL}$)	40 ($\mu\text{g/mL}$)	20 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	Inibição do crescimento plantônico (%)	RB	99.6 \pm 1.1	99.0 \pm 0.8	98.9 \pm 2.8	37.1 \pm 5.0	33.5 \pm 3.9
		RP	98.0 \pm 0.9	94.1 \pm 5.4	92.4 \pm 7.6	89.5 \pm 11.1	8.5* \pm 8.4
		SU	63.7 \pm 4.9	54.3 \pm 3.4	50.0 \pm 3.2	-0.9* \pm 3.3	1.3* \pm 2.7
		SC	69.8 \pm 1.7	61.0 \pm 2.4	48.0 \pm 2.8	16.6 \pm 2.6	25.3 \pm 1.9
	Inibição do Biofilme (%)	RB	106.4 \pm 4.1	91.4 \pm 6.5	107.0 \pm 5.7	88.4 \pm 8.2	77.6 \pm 7.2
		RP	93.1 \pm 2.5	95.3 \pm 2.2	94.4 \pm 2.4	90.9 \pm 2.3	84.3 \pm 9.5
		SU	78.3 \pm 12.9	62.0 \pm 10.4	67.7 \pm 18.5	47.9 \pm 15.4	9.4* \pm 15.9
		SC	103.7 \pm 2.1	109.8 \pm 0.9	108.6 \pm 0.7	88.4 \pm 12.4	70.0 \pm 16.7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Inibição do crescimento plantônico (%)	RB	99.4 \pm 5.8	99.3 \pm 7.9	66.0 \pm 5.1	22.9 \pm 4.5	17.8 \pm 3.2
		RP	98.8 \pm 0.4	98.1 \pm 1.1	98.7 \pm 0.3	99.4 \pm 0.3	11.7 \pm 8.9
		SU	93.3 \pm 1.8	77.9 \pm 1.9	65.3 \pm 2.6	10.6 \pm 3.5	10.5 \pm 4.0
		SC	47.1 \pm 2.4	32.5 \pm 6.2	19.5 \pm 5.8	-6.5* \pm 2.9	-3.1* \pm 4.0
	Inibição do Biofilme (%)	RB	103.2 \pm 9.8	104.4 \pm 7.1	103.7 \pm 4.2	94.8 \pm 3.9	84.9 \pm 10.2
		RP	96.2 \pm 2.4	98.4 \pm 0.8	95.8 \pm 1.8	96.7 \pm 2.5	73.1 \pm 6.5
		SU	99.5 \pm 1.6	92.4 \pm 7.7	94.0 \pm 3.0	67.1 \pm 6.5	67.0 \pm 12.9
		SC	105.4 \pm 3.3	105.0 \pm 1.4	105.0 \pm 1.5	70.0 \pm 12.8	58.5 \pm 10.3
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	Inibição do crescimento plantônico (%)	RB	48.3 \pm 1.8	33.4 \pm 1.2	33.4 \pm 2.1	16.4 \pm 0.9	10.3 \pm 0.8
		RP	32.5 \pm 5.0	31.8 \pm 3.4	32.6 \pm 3.9	33.0 \pm 6.1	32.5 \pm 2.8
		SU	-9.4* \pm 7.2	-9.5* \pm 5.8	-0.2* \pm 5.8	0.3* \pm 0.9	-1.1* \pm 2.0
		CS	70.6 \pm 1.7	68.6 \pm 2.7	71.1 \pm 3.1	15.0 \pm 1.4	15.9 \pm 0.9
	Inibição do Biofilme (%)	RB	94.5 \pm 2.3	97.2 \pm 3.3	95.2 \pm 4.9	47.2 \pm 6.3	36.9 \pm 6.4
		RP	14.1 \pm 3.0	14.1 \pm 1.0	15.0 \pm 0.8	11.8 \pm 5.1	10.1 \pm 4.3
		SU	91.7 \pm 4.1	97.2 \pm 2.0	83.6 \pm 5.9	13.4 \pm 3.4	14.8 \pm 2.5
		SC	64.8 \pm 5.4	59.2 \pm 8.4	-41.0 \pm 5.6	-176.8 \pm 6.3	-169.6 \pm 6.3

*não difere do controle, $p=0,05$.

Biossurfactantes lipopeptídicos têm uma ampla gama de propriedades, tais como agentes antimicrobianos, como no lipopeptídeo produzido por *Bacillus circulans* (32). Fernandes et al. (33) também estudaram dois lipopeptídeos de *B. subtilis*, confirmando atividade antimicrobiana contra 29 bactérias.

A inibição do crescimento planctônico por surfactina (Tabela 5) foi eficaz contra microrganismos Gram-positivos, com 64% de inibição de *L. monocytogenes* ATCC 19112 e 93% para *L. monocytogenes* ATCC 7644. Este produto inibe a formação de biofilme de todos os microrganismos testados: 48-78 % (*L. monocytogenes* ATCC 19112), 15-92% (*L. monocytogenes* ATCC 7644) e 67-100% (*P. fluorescens*). Estes resultados corroboram os achados de Rivardo et al. (34), que verificaram que o produto de *B. subtilis* foi eficaz contra microrganismos Gram-positivos e não contra microrganismos Gram-negativos.

De acordo com Ahima et al. (35), os lipopeptídeos podem modificar a hidrofobicidade da superfície bacteriana e, conseqüentemente, alterar a adesão destes microrganismos em superfícies abióticas. Os efeitos dependem da hidrofobicidade bacteriana inicial, bem como do tipo e da concentração do lipopeptídeo.

Araujo et al. (6) mostraram inibição do crescimento planctônico das mesmas estirpes de *L. monocytogenes*, utilizando $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de surfactina de *B. subtilis* LB5a produzido na manipuleira como substrato (6,2 e 9,3% por ATCC 7644 e ATCC 19112, respectivamente). Neste estudo, utilizando uma concentração de apenas $600 \mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se uma inibição muito mais eficaz (65 e 50%, respectivamente) para as mesmas estirpes. A diferença entre os resultados podem estar relacionados com uma composição diferente de meios de cultura e também de uma estirpe diferente de *B. subtilis* utilizados para a produção de biotensoativo. Todos estes fatores podem causar variações e conseqüentemente influenciar o efeito desejado do produto. O mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana observada para biossurfactantes permanece pouco claro, no entanto, entre os pesquisadores é conhecido que a maioria das ações dos biossurfactantes reside na perturbação da membrana citoplasmática, pois por possuir um caráter anfipático, este permite a interação com fosfolipídios, alterando a permeabilidade com o dano celular conseqüente (36; 37).

Embora o agente tensoativo comercial apresente excelentes propriedades antimicrobianas contra todos os microrganismos testados e propriedades anti-adesivas contra as duas estirpes de *L. monocytogenes*, o mesmo induziu a adesão celular de *P. fluorescens*, quando adicionado ao meio de cultura. Assim, este produto não é desejável para este tipo de aplicação. O estresse causado pelo contato com este surfactante, pode ter induzido a produção e liberação de auto-indutores (*quorum sensing*) nas células intactas deste microrganismo, induzindo a formação de biofilme como proteção. Uma das propriedades dos biofilmes é a de proteger os microrganismos contra ambientes hostis (38), tornando-os mais resistentes do que as células de vida livre para a ação de agentes químicos e físicos (39).

A cinética de formação de biofilme revelou que todas as cepas testadas foram fortes formadores de biofilme em ambas superfícies (Poliestireno e 304 Aço inox) de acordo com a classificação de Stepanovic et al. (22). Ambos adesão e formação de biofilme de *P. fluorescens* em comparação com *L. monocytogenes* foram até 4 ou 5 vezes maior em superfícies de poliestireno e aço inox AISI 304. Cada microrganismo apresentou perfil cinético diferente nas distintas superfícies. Estas diferenças são devido às características

físico-químicas da superfície e características de adesão de cada estirpe de microrganismo estudado. Além disso, a hidrofobicidade da superfície bacteriana varia dentro das espécies, sorotipos ou estirpes (40).

A composição da matriz do biofilme é um parâmetro importante para a compreensão dos fenômenos de adesão e formação de biofilme. A linhagem de *P. fluorescens* tinha uma maior capacidade para formar biofilmes do que a de *Listeria monocytogenes* em poliestireno e aço inox 304. A hidrofília mais elevada, possivelmente associada a um aumento da produção de exopolissacarídeos de *P. fluorescens*, pode estar relacionada com a facilidade desta linhagem de formar biofilmes.

De acordo com Ly et al. (41), o caráter hidrófilo é predominantemente correlacionado com uma maior concentração de polissacarídeo e uma menor concentração de compostos hidrocarbonados. Muitos fatores podem interferir no processo de adesão microbiana na superfície, tais como apêndices celulares (40; 42), hidrofobicidade e carga superfície dos microorganismos (42), hidrofobicidade e carga da superfície à qual eles irão aderir (43) e a capacidade de produzir exopolissacarídeos (42). Chae et al. (40) descobriram que quanto maiores os níveis de carboidratos extracelulares produzidos por diferentes estirpes de *L. monocytogenes*, maior será a sua capacidade para formar biofilmes.

Borucki et al. (44) descobriram que um teor mais elevado em exopolissacarídeos produzidos por *L. monocytogenes* foi correlacionado com a sua maior aderência à superfícies.

A quantificação e caracterização de material polimérico extracelular (MPE), produzido por cada bactéria são mostradas na Tabela 4. Considerando-se os percentuais para cada bactéria pode-se inferir que a composição do biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 7644 tem cerca de 83,3% de células e 16,7% de matriz. A matriz polimérica apresentou uma média de 39,4% de proteínas, 35,0% de carboidratos e os 25,7% restantes da matriz são formados por outros componentes, como ácidos nucleicos, lipídeos, peptídeos de baixo peso molecular, fosfolipídios e sais minerais (45). A composição do biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 19112 tem cerca de 85,4% de células e 14,6% matriz. A matriz polimérica mostrou uma média de 23,3% de proteínas, 29,4% de carboidratos e 47,3% de outros componentes, como descrito acima. Os biofilmes de *P. fluorescens* tem 71,6% de células e 28,4% de matriz. A matriz polimérica mostrou uma média de 39,8% de proteínas, 32,4% de carboidratos e 27,8% de outros componentes.

Tabela 4. Conteúdo de açúcar e proteínas da matriz do biofilme, massa celular e massa de biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19112 e *P. fluorescens* ATCC 13525, após o crescimento de 24 h.

Microrganismo	Açúcares ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biof}}$)	Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biof}}$)	Células (mg/cm^2)	Biofilme (mg/cm^2)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	58.3 \pm 0.4	65.6 \pm 3.5	4.0* \pm 1.9	4.8* \pm 1.2
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	43.0 \pm 4.0	34.1 \pm 4.8	3.5* \pm 1.7	4.1* \pm 0.9
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	92.0 \pm 0.5	113.0 \pm 9.5	5.3 \pm 1.8	7.4 \pm 0.7

* Não diferem entre si a mesma coluna, p=0,05.

O biofilme de *P. fluorescens* tem a maior concentração de carboidratos, consistente com a ideia de que as cepas com maior capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS) são provavelmente menos hidrofóbicas e têm uma maior capacidade de formar biofilmes.

Os diferentes perfis observados para cada estirpe bacteriana podem ser correlacionados com propriedades físico-químicas de células e superfícies envolvidas, assim, nós avaliamos estes parâmetros e os resultados estão apresentados na Tabela 5 e 6.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos microrganismos (*L. monocytogenes* ATCC 19112, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *P. fluorescens* ATCC 13525).

Microrganismo/Superfície	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^{TOT} (mJ/m ²)	ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	37.6 ^{ab} ±1.4	1.1 ^c ±0.9	17.9 ±2.7	9.0 ±3.6	46.6 ^e ±8.0	-30.9 ±6.1
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	50.0 ±1.3	0.2 ^c ±0.1	12.4 ±2.5	3.1 ±1.3	53.1 ±2.6	-49.3 ±1.9
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	24.1 ±2.2	0.0 ^c ±0.1	28.4 ±5.3	-1.6 ^d ±4.3	22.5 ±6.5	-21.6 ±1.6

a, b, c, d, e - diferentes letras indicam que valores diferem estatisticamente entre si, p=0.05.

Energia livre de superfície total - γ^{TOT} ; componente Lifshitz-van der Waals - γ^{LW} ; Propriedades ácido-básicas de Lewis - γ^{AB} ; componente doador de elétron - γ^- ; componente aceptor de elétron - γ^+ e hidrofobicidade de superfície - ΔG_{iwi} .

A força de Lifshitz-van der Waals, responsável por interações não polares, é a soma das forças de atração ou de repulsão entre as moléculas. De acordo com Hood e Zottola (46) essas forças são relativamente fracas, na primeira fase de adesão microbiana (reversível). Durante esta fase, apenas a força Lifshitz-van der Waals está a funcionar, com uma distância > 50 nm entre microrganismos e superfície. Além disso, a aproximação de células para a superfície é mediada por propriedades não específicas da superfície celular.

O componente Lifshitz-van der Waals está relacionado com interações não polares que têm lugar nos primeiros estágios de adesão microbiana, os valores mais baixos foram encontrados entre *P. fluorescens* e aço inox, indicando uma aproximação mais elevada de células de *P. fluorescens* ATCC 13525 à superfície de aço inox (Tabela 5 e 6). Os maiores valores foram encontrados para *L. monocytogenes* ATCC 7644 e Poliestireno indicando uma aproximação menor de *L. monocytogenes* ATCC 7644 à superfície de poliestireno.

De acordo com os resultados na Tabela 5, todos os microrganismos testados exibiram características hidrófobas (hidrófobo quando ΔG_{iwi} é negativo, e hidrófilo quando ΔG_{iwi} for positivo), com *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *P. fluorescens* ATCC 13525 mostrando valores superiores e inferiores de hidrofobicidade, respectivamente. As características de hidrofobicidade podem variar consideravelmente entre diferentes estirpes de bactérias da mesma espécie microbiana (35; 6). Da mesma forma, a energia livre de superfície (γ^{TOT}) também foi maior para *L. monocytogenes* ATCC 7644 do que para *P. fluorescens*; a superfície de aço inox apresentou energia livre de superfície elevada comparativamente ao poliestireno.

As interações ácido-base de Lewis (γ^{AB}) são responsáveis por interações polares (interações específicas de doador / aceptor de hidrogênio). Eles estão envolvidos na terceira fase de adesão microbiana (irreversível) e ocorrem a distâncias menores do que 1,5 nm por forças polares de curta distância (46).

Os componentes doadores e aceptores de elétrons estão relacionados com o componente de ácido-base de Lewis. As bactérias estudadas neste trabalho são hidrófobas e apresentaram valores quase negligenciáveis como doadores de elétrons (Tabela 5).

O parâmetro de hidrofobicidade de superfície (ΔG_{iwi}) é considerado por muitos autores como o fator mais influente para a formação de biofilme. Este parâmetro começa a operar na segunda fase (reversível / irreversível) de adesão microbiana (46). Nesta fase, devido à repulsão eletrostática (10-20 nm a partir da superfície), interações secundárias estão a ocorrer. Isto é devido a uma aproximação mais fácil para a superfície por remoção de água, o que inicia o rearranjo das células sobre a superfície. Os resultados (Tabela 5 e 6) sugerem que o aço inox tende a apoiar uma formação maior de biofilme e que *P. fluorescens* ATCC 13525 tem o maior potencial para formar biofilmes.

De acordo com Hammadi & Latrache (47), as bactérias com altos valores de hidrofobicidade de superfície são fortes doadores de elétrons e bactérias com valores baixos são fracos doadores de elétrons. Chavant et al. (48) relataram que a estirpe de *L. monocytogenes* LO28, é um fraco acceptor de elétrons e um alto doador de elétrons. Os resultados estão em contraste com o nosso estudo, em que as estirpes de *L. monocytogenes* eram fracos doadores de elétrons. No entanto, eles usaram um método diferente (adesão-microbiana-a-solventes), que não prevê uma quantidade numérica para permitir a discussão em termos de afinidade de células microbianas a solventes com diferentes características físico-químicas conhecidas. De acordo com estes autores, a fase de crescimento e a temperatura pode influenciar a composição da parede celular, das suas propriedades de hidrofobicidade e de doadores de elétrons, o que explica as diferenças entre os dois estudos.

Valores semelhantes foram obtidos para energia livre de superfície total (γ^{TOT}), sendo maiores para *L. monocytogenes* ATCC 7644 em comparação com *P. fluorescens*. De acordo com Busscher et al. (49), a adesão bacteriana é termodinamicamente favorecida em superfícies com valores elevados de energia livre: quanto menor for a energia livre da superfície, menor a adesão. Assim, a adesão bacteriana ao aço inox 304 é maior em comparação ao poliestireno (Tabela 5 e 6). Isto também foi confirmado pelas cinéticas de formação de biofilme em ambas as superfícies.

A Tabela 6 apresenta as propriedades físico-químicas de diferentes materiais quando condicionados com os tensoativos.

De acordo com Machado (50), o grupo hidrófobo está geralmente orientado para a superfície e o grupo polar é exposto à água quando um agente tensoativo é adsorvido sobre superfícies hidrófobas. A superfície torna-se assim hidrófila (valor positivo no parâmetro de hidrofobia ΔG_{iwi}), e, como resultado, a tensão interfacial entre a superfície e a água é reduzida. Este fenômeno de hidrofobia (ΔG_{iwi}) foi confirmado na maioria dos tratamentos (Tabela 6).

O efeito do biossurfactante variou de acordo com o tipo e superfície envolvidos. Após o condicionamento com surfactina, o poliestireno não mostrou alteração significativa nas propriedades de superfície, e um ligeiro aumento no parâmetro ácido/base de Lewis (γ^{AB}) foi observado. A superfície de aço inox, no entanto, mostrou um grande aumento no componente acceptor de elétrons (γ^+) e uma diminuição significativa na hidrofobicidade de superfície (ΔG),

a energia livre de superfície total (γ^{TOT}) também foi maior. O surfactante ramnolipídeo (bruto e purificado) promoveu um grande aumento no componente acceptor de elétron (γ^+) e reduziu a hidrofobicidade de superfície do poliestireno. Para a superfície de aço inox, a única mudança significativa foi observada na hidrofobicidade de superfície, que tornou-se mais hidrófoba com ramnolipídeo bruto (RB), no entanto, o ramnolipídeo purificado (RP) promoveu uma ligeira redução neste parâmetro. Tendo em conta estes resultados, pode-se afirmar que a surfactina modifica a superfície de aço inox gerando um (acceptor de elétrons) caráter mais hidrofílico e ácido, enquanto que os ramnolipídeos promovem a mesma modificação, mas em superfícies de poliestireno.

O aço inox 430, o aço galvanizado e o aço carbono não foram utilizados em estudos de formação de biofilme, no entanto, o efeito de condicionamento por biossurfactantes em tais superfícies foi determinado para avaliar se o tratamento pode influenciar o processo de corrosão.

Em geral, as superfícies tratadas com surfactina tornaram-se hidrófilas, enquanto que com os ramnolipídeos e com o surfactante comercial a hidrofobicidade superfície, embora reduzida, foi mantida. O aço carbono é hidrófilo e ramnolipídeos tornaram a superfície hidrofóbica (Tabela 6).

Tabela 6 – Propriedades físico-químicas de superfícies tratadas com surfactantes.

Superfície	Tratamento	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^{TOT} (mJ/m ²)	ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
Poliestireno	Controle	43.9* ±0.1	1.5* ±0.1	9.8* ±0.1	-7.5* ±0.1	36.3* ±0.2	-69.3* ±0.9
	RB	49.0 ±0.1	0.7* ±0.1	56.8 ±0.2	-12.8 ±0.2	36.2* ±0.3	39.0 ±1.6
	RP	50.9 ±0.1	0.5* ±0.1	26.4 ±0.3	-7.3* ±0.1	43.7 ±0.2	-15.8 ±2.5
	SU	48.0* ±0.3	0.4* ±0.1	9.0* ±0.4	-3.6 ±0.1	44.4* ±0.5	-70.5* ±6.1
	SC	48.9 ±0.1	3.2 ±0.1	27.9 ±1.5	-19.0 ±0.1	29.9* ±0.1	-22.2 ±3.9
Aço inox 304 AISI	Controle	42.0* ±0.2	2.7* ±2.2	0.9* ±1.5	-3.0* ±1.5	41.0* ±1.7	-98.7* ±2.3
	RB	42.7* ±0.4	0.3* ±0.0	0.3* ±0.3	0.6* ±0.3	43.2* ±0.7	-126.6 ±2.9
	RP	38.8* ±0.1	0.0* ±0.0	5.9* ±2.0	-0.5* ±0.4	38.3* ±0.5	-80.7 ±3.5
	SU	68.6 ±1.6	0.5* ±1.9	42.2 ±1.5	-9.2 ±0.1	59.4 ±5.3	23.7 ±3.3
	SC	40.1* ±1.4	2.9* ±1.2	0.5* ±0.6	2.3 ±2.0	42.5* ±2.1	-79.8 ±2.0
Aço inox 430 AISI	Controle	29.0* ±0.2	2.6* ±2.2	1.6* ±1.3	-4.1* ±1.5	25.0* ±0.8	-119.1 ±4.7
	RB	33.2* ±0.4	0.2* ±0.0	9.4 ±2.2	2.7* ±0.3	35.9 ±2.3	-70.7 ±3.8
	RP	40.2 ±0.1	0.2* ±0.0	10.1 ±2.0	-2.6* ±0.4	37.7 ±1.0	-58.4 ±3.1
	SU	62.7 ±1.6	0.6* ±1.9	54.1 ±5.6	-11.6 ±3.7	51.1 ±6.4	39.3 ±3.8
	SC	23.2* ±0.1	0.0* ±1.2	1.3* ±0.9	0.4* ±2.0	23.6* ±1.3	-134.9 ±4.9
Aço Galvanizado	Controle	35.1 ±0.2	0.7 ±0.5	4.9 ±1.6	-3.6 ±0.9	31.5 ±1.0	-97.9 ±4.5
	RB	28.1 ±0.3	0.0* ±0.1	5.4* ±2.9	0.7* ±1.7	28.7* ±2.0	-98.4* ±3.9
	RP	34.8* ±0.3	0.5* ±0.6	12.0 ±9.2	-5.0* ±0.6	29.8* ±0.8	-62.8 ±2.8
	SU	49.7 ±0.3	1.7* ±1.1	64.9 ±9.6	-21.1 ±6.8	28.6* ±7.1	42.7 ±4.4
	SC	34.8* ±0.1	0.7* ±1.0	2.3* ±3.9	2.5 ±3.9	37.4* ±4.0	-97.9* ±8.6
Aço Carbono	Controle	75.6 ±0	2.8 ±2.5	40.7 ±14.5	-21.4 ±5.5	54.2 ±5.5	17.7 ±2.3
	RB	45.3 ±0.4	0.3 ±0.2	3.6 ±1.4	2.2 ±1.1	47.5 ±1.5	-91.5 ±4.6
	RP	41.7 ±0.2	0.2 ±0.1	0.4 ±0.2	-0.5 ±0.1	41.2 ±0.2	-124.9 ±7.9
	SU	71.7* ±0.4	1.5 ±0.1	49.8* ±1.6	-17.3* ±0.4	54.4* ±0.8	30.2 ±4.5
	SC	81.2 ±0.3	2.5* ±0.1	58.4 ±1.0	-24.3* ±0.3	56.9* ±0.6	30.6 ±4.3

*não difere do seu respectivo controle, p=0,05.

Energia livre de superfície total - γ^{TOT} ; componente Lifshitz-van der Waals - γ^{LW} ; Propriedades ácido-básicas de Lewis - γ^{AB} ; componente doador de elétron - γ^- ; componente aceptor de elétron - γ^+ e hidrofobicidade de superfície - ΔG_1^{LW} .

A hidrofiliçidade não aumentou com o tratamento pela surfactina em poliestireno. O caráter aniônico da surfactina é atribuído aos resíduos dos aminoácidos glutâmico e aspártico carregados negativamente (51). Estas moléculas podem ter sido distribuídas aleatoriamente sobre a superfície, ou seu grupo hidrófilo pode ter virado para a superfície devido ao caráter ácido ($\gamma+$) do poliestireno, ou foram incapazes de adsorver (a última opção é improvável, como sugerido pelos demais resultados). É possível, também, que a formação de micela na superfície tenha resultado em um filme com diferentes estruturas. Além disso, a concentração utilizada foi maior do que o valor de CMC, o que permite a formação de micelas orientando a cabeça hidrófoba à superfície. No caso da formação de micelas, posição da cabeça seria mantida virada para o meio hidrófobo. Em Aço inox, os grupos carregados e o padrão de organização de micelas promoveu aumento no caráter hidrófilo e, provavelmente, os grupos carregados são confrontados com a fase de água, resultando em aumento de $\gamma+$ e diminuição de $\Delta G_{i/wi}$.

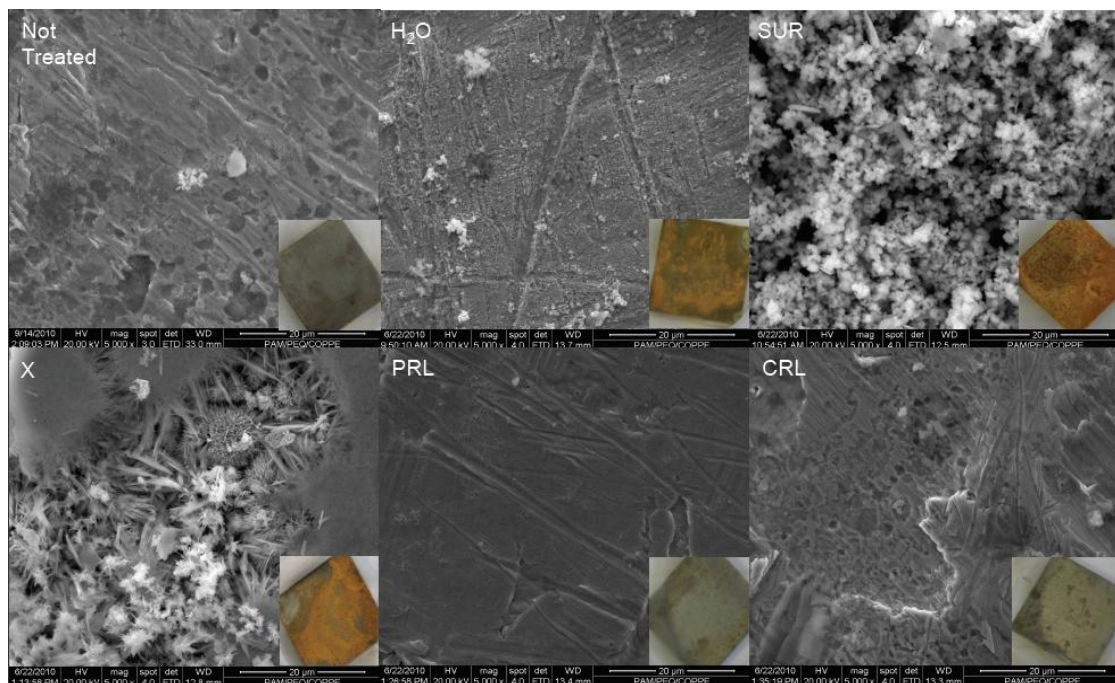


Figura 1 – Imagens fotográficas por MEV (5000x) de aço carbono (da esquerda para a direita, de cima para baixo): não tratado, controle (tratado com H₂O) e condicionado com surfactina (SUR), surfactante comercial (X), ramnolípídeo purificado (PRL) e ramnolípídeo bruto (CRL).

Os resultados para a hidrofobicidade sugerem que a formação de biofilme foi inibida pelo condicionamento de poliestireno, aço inox AISI 304, aço inox AISI 430 e superfícies de aço galvanizado com biosurfactantes que se tornou hidrófila ou menos hidrófoba em comparação com o controle (Tabela 6). A diminuição na hidrofobicidade de superfície como um resultado do condicionamento por biosurfactantes provoca uma diminuição nas interações hidrófobas com a parede celular de microrganismos hidrófobo. Como resultado, a adesão / formação de biofilme é reduzida.

Geralmente, superfícies hidrófobas têm valores baixos para ambos componentes aceptores / doadores de elétrons (19). A Tabela 6 mostra que isso também é verdade neste estudo.

Ramnolipídeos são também agentes tensoativos aniônicos devido a grupos ramnosil e carboxila. Quando em solução, os ramnolipídeos podem agregar-se em micelas, vesículas ou lamelas, dependendo do pH e a presença de íons em solução (52). Superfícies de poliestireno condicionadas com ramnolipídeos apresentaram diminuição da hidrofobia e aumento do caráter ácido sugerindo que os grupos carregados estavam voltados para a fase aquosa. Em aço inox nenhuma mudança significativa foi observada no caráter ácido e a superfície manteve a sua natureza hidrófoba, provavelmente, neste caso, as caudas hidrófobas predominam em contato com a água. Novos estudos devem ser realizados para elucidar o estado de agregação das moléculas e sua relação com a atividade antibiofilme.

O revestimento de superfícies com agentes tensoativos pode inibir a corrosão como uma barreira física para outros componentes que poderiam potencialmente reagir com a superfície ou, dependendo da natureza do tensoativo ou dos seus constituintes, pode potencializar este processo.

Superfícies de aço que passam por processos tais como a corrosão, têm como consequência alteração de suas propriedades físico-químicas. Estas alterações podem resultar não só a partir da distribuição de partículas tensoativas na superfície, mas também a partir de reações químicas que causam / adiam a corrosão.

O condicionamento de superfície pode ser aplicado para aumentar a resistência a corrosão, reduzindo a formação de óxido de Ferro e aumentando a formação de óxido e hidróxido de Cromo (53), sugerindo propriedades protetoras dos biosurfactantes contra a corrosão.

Meylheuc et al. (43) verificaram um aumento na razão Cr / Fe de 0,9 sobre uma superfície limpa (não condicionada) a 1,4 sobre a superfície condicionada, sugerindo propriedades anticorrosivas do surfactante. O mesmo tratamento tornou a superfície mais hidrófila.

A corrosão de metais resulta na formação de produtos de corrosão e liberação de energia. A maioria dos tratamentos deste estudo não diferiu estatisticamente do controle. Embora, em alguns tratamentos, a energia livre de superfície tenha aumentado em relação ao controle, não se sabe se o aumento deveu-se a reações na superfície que geraram produtos de corrosão ou às características físico-químicas do filme formado por cada surfactante.

Superfícies de diferentes ligas metálicas tornaram-se hidrófilas após o tratamento pela surfactina, indicando que, neste tipo de superfície a parte hidrófoba das moléculas tensoativas são susceptíveis de terem sido direcionadas para a superfície.

Quando superfícies interagem com íons H^+ tendem a se tornar mais hidrófilas, facilitando processos de corrosão. Quando condicionadas por surfactantes, a corrosão pode ser evitada por aumento da hidrofilia associado ao filme do produto sobre a superfície que a protege contra a interação com O_2 e íons H^+ .

A superfície controle de aço carbono foi classificada como hidrófila, provavelmente devido ao processo corrosivo que se seguiu ao condicionamento pela água (Figura 1). Alguns tratamentos protegeram a superfície contra a corrosão, enquanto outros tratamentos induziram a corrosão. A superfície tornou-se mais hidrófoba, quando condicionada com ramnolipídeo bruto e ramnolipídeo purificado. O filme formado nestes tratamentos hidrofobizou a

superfície e serviu como uma camada protetora, inibindo visualmente a corrosão. Os condicionamentos realizados com surfactina e o surfactante comercial foram mais hidrófilos do que o controle e também apresentaram um processo de corrosão mais extensa, indicando que o filme formado reage diretamente com a superfície gerando produtos da corrosão.

Todas as características físico-químicas mencionadas estão relacionadas com a adesão microbiana e formação de biofilme, e a alteração de cada parâmetro pode influenciar positiva ou negativamente a adesão microbiana (37). A presença de um biotensoativo de *P. fluorescens* pode adiar a corrosão em aço inox 304 (53), confirmando que o ramnolipídeo pode ser utilizado como agente de proteção contra a corrosão de superfícies metálicas.

Os ramnolipídeos testados (bruto e purificado) reduzem significativamente a formação de biofilme em poliestireno (Tabela 7). Os melhores resultados contra *P. fluorescens* ATCC 13525 (79%) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (74%) foram obtidos com 0,05% (p / v) e 0,50% (p / v) de ramnolipídeo purificado, respectivamente. A surfactina 0,50% foi mais eficaz contra *L. monocytogenes* (ATCC 19112) (54% de inibição). O tensoativo comercial induziu a adesão da mesma estirpe deste microrganismo na maior concentração testada.

Tabela7 - Efeito de agentes tensoativos na inibição da adesão e formação de Biofilmes (percentagem de inibição) de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19112 e *P. fluorescens* ATCC 13525 em superfícies de poliestireno.

Superfície	Tratamento	Concentração (%)	Inibição <i>L. monocytogenes</i> (%)		Inibição <i>P. fluorescens</i> (%)		
			ATCC 7644	ATCC 19112	ATCC 13525		
Poliestireno	RB	0.05	24.9 ±14.1	19.6 ±9.9	9.6 ±4.7		
		0.50	27.1 ±25.5	33.5 ±12.9	35.7 ±4.8		
	RP	0.05	1.4* ±20.5	10.6 ±6.4	79.2 ±4.3		
		0.50	3.8* ±21.7	36.1 ±8.5	65.6 ±5.1		
	Adesão	SU	0.05	14.7* ±13.7	17.4* ±16.3	-1.0* ±7.7	
			0.50	37.3 ±13.2	54.1 ±16.4	17.1 ±6.9	
		SC	0.05	23.1* ±18.5	10.9* ±10.3	59.4 ±4.4	
			0.50	2.9* ±24.2	-39.0 ±19.4	52.0 ±7.1	
		Biofilme	RB	0.05	47.3 ±12.4	37.9 ±9.8	50.3 ±4.0
				0.50	66.5 ±8.0	47.8 ±12.4	72.4 ±6.2
	RP		0.05	35.7 ±8.3	33.7 ±8.3	55.7 ±5.2	
			0.50	74.1 ±6.4	21.8 ±6.7	61.9 ±8.1	
SU	0.05		5.3* ±8.5	0.8* ±10.8	-2.3* ±9.7		
	0.50		1.5* ±8.9	8.3* ±16.4	31.7 ±11.4		
SC	0.05		30.4 ±8.1	2.3* ±14.1	48.4 ±8.4		
	0.50		66.6 ±6.9	-5.8* ±11.6	68.5 ±5.8		

*não difere estatisticamente do controle (p=0.05)

O crescimento de células planctônicas praticamente não diferiu do controle na maioria dos

produtos e concentrações durante o período de adesão, sugerindo que os surfactantes não interferem no crescimento planctônico quando estão adsorvidos a superfícies de poliestireno. Caso tivesse ocorrido dessorção de moléculas de surfactante, este tipo de crescimento, provavelmente, seria afetado devido à sua atividade antimicrobiana. Por exemplo, o ramnolípídeo purificado ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) inibe o crescimento planctônico 99%, 90% e 33% de *L. monocytogenes* ATCC 7644, ATCC 19112 e *P. fluorescens* ATCC 13525, respectivamente.

A inibição da adesão de *L. monocytogenes* foi previamente testada com um biotensoativo produzido por *P. fluorescens* (não caracterizado) em superfícies de politetrafluoroetileno (PTFE), mas a redução não foi significativa em PTFE (54). Das et al. (55) relataram a inibição da adesão microbiana de vários microrganismos patogênicos após o pré-condicionamento do poliestireno com um lipopeptídeo produzido por *B. circulans*. As concentrações variaram de 0,1 a 10 mg mL^{-1} com a inibição variando de 15 a 89%. Os dados correspondem àqueles para os surfactina neste estudo. Da mesma forma, Gomes e Nitschke (56) descobriu que uma concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ reduziu a aderência de *L. monocytogenes* ATCC 19112 ao poliestireno em cerca de 42%, equivalente aos resultados do presente estudo (44%) para a mesma concentração.

O condicionamento pela surfactina reduziu significativamente a adesão em poliestireno quando usada em maiores concentrações (até 54% de inibição). Em biofilmes maduros este efeito não foi tão evidente, uma vez que apenas *P. fluorescens* ATCC 13525 foi inibido (32%) na mais alta concentração (0,50%) (Tabela 7).

A formação de biofilme foi significativamente inibida em todos os tratamentos que envolveram o condicionamento das superfícies de aço inox (Tabela 8). O ramnolípídeo bruto inibiu a formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19112 em até 75%, enquanto o produto purificado diminuiu *L. monocytogenes* ATCC 7644 em até 83%. A surfactina foi mais eficaz contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 (73%), assim como o surfactante comercial (60%). O ramnolípídeo bruto foi mais eficaz contra a adesão microbiana, inibindo *L. monocytogenes* ATCC 19112 (34%) e *P. fluorescens* ATCC 13525 (30%). A maior taxa de inibição da adesão foi conseguida com surfactina contra *P. fluorescens* ATCC 13525 (73%).

O crescimento planctônico foi inibido em até 62%, o que sugere que apesar de os surfactantes provavelmente ainda estarem adsorvidos às superfícies de aço inox, algumas das suas moléculas podem ter sido dessorvidas para o meio.

Ao contrário dos biosurfactantes testados neste estudo, o surfactante comercial induziu ou inibiu a formação de biofilmes, bem como o crescimento planctônico, dependendo das condições. O tensoativo comercial não alterou a adesão das duas estirpes de *L. monocytogenes* nas menores concentrações, mas inibiu *P. fluorescens* ATCC 13525 (59%). Os biofilmes maduros de *L. monocytogenes* ATCC 19112 não foram afetados, ao passo que as outras estirpes foram inibidas em até 67 e 69% (*L. monocytogenes* ATCC 7644 e *P. fluorescens* ATCC 13525, respectivamente - Tabela 7).

De acordo com os resultados, a aplicabilidade do surfactante comercial como um agente de condicionamento superfície para inibir a formação de biofilme deve ser vista como limitada e a sua utilização em ambientes industriais desencorajada, pois não pode ser previsto qual microrganismo (Gram-positivo ou Gram-negativo) vai passar através o sistema e aderir à

superfície.

A formação de biofilme foi inibida pelo condicionamento de poliestireno e aço inox 304 com os biossurfactantes que tornaram a superfície hidrófila ou menos hidrófoba em comparação com o controle (Tabela 7 e 8). A diminuição na hidrofobicidade como um resultado do condicionamento pelo surfactante provoca uma diminuição nas interações hidrófobas com a parede celular de microrganismos e, como resultado, a adesão / formação de biofilme é reduzida.

Nitschke et al. (5) descobriram que o condicionamento de aço inox 304 com uma solução de surfactina de 0,1% (p / v) é capaz de reduzir significativamente a adesão de *L. monocytogenes* ATCC 19112. Neste estudo, a aderência de *L. monocytogenes* ATCC 7644 não foi alterada na maioria dos tratamentos, no entanto, o crescimento planctônico desta estirpe foi inibido em 84%. Isto foi provavelmente devido a possível presença de moléculas de sinalização *quorum sensing* dentro da película formada pelo biotensoativo, ou pelo estresse causado pelas moléculas dos biossurfactantes conduzindo a uma diminuição da proliferação celular e da mobilização de células planctônicas para formar biofilmes.

Tabela 8 - Efeito de agentes tensoativos na inibição da adesão e formação de biofilmes (percentagem de inibição) de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19112 e *P. fluorescens* ATCC 13525 em superfícies de aço inoxidável.

Superfície	Tratamento	Concentração (%)	Inibição <i>L. monocytogenes</i> (%)		Inibição <i>P. fluorescens</i> (%)	
			ATCC 7644	ATCC 19112	ATCC 13525	
Adesão Aço Inox 304 AISI	RB	0.05	-4.6* ±34.3	54.1 ±13.3	10.6 ±4.9	
		0.50	-14.3* ±32.5	33.9 ±16.9	29.7 ±4.6	
	RP	0.05	-6.7* ±26.1	-2.0* ±13.9	47.5 ±4.1	
		0.50	4.4* ±32.3	-8.7* ±10.0	41.7 ±3.2	
	SU	0.05	0.05	-4.9* ±16.5	-5.4* ±7.1	68.1 ±3.7
			0.50	-6.5* ±14.5	17.1 ±7.0	73.2 ±4.3
		SC	0.05	8.3* ±37.3	22.5* ±12.9	1.8* ±4.4
			0.50	0.3* ±53.9	-4.7* ±6.8	18.3 ±5.2
	Biofilme Aço Inox 304 AISI	RB	0.05	42.9 ±10.2	57.8 ±11.2	2.6* ±5.3
			0.50	12.1 ±6.3	75.1 ±6.1	74.2 ±5.2
		RP	0.05	41.7 ±6.5	18.5 ±11.9	41.3 ±3.3
			0.50	83.4 ±6.7	66.7 ±3.4	44.7 ±6.0
SU		0.05	0.05	64.8 ±10.3	22.6 ±10.6	29.3 ±6.7
			0.50	72.8 ±5.0	36.0 ±15.6	49.0 ±6.0
		SC	0.05	59.3 ±11.1	-8.3* ±11.9	21.6 ±6.8
			0.50	59.8 ±6.3	39.7 ±11.9	23.2 ±6.8

O tensoativo comercial não interferiu significativamente na adesão de ambas as estirpes de *L. monocytogenes* e inibiu pouco a formação de biofilme por *P. fluorescens* ATCC 13525 (18%). Este produto é útil como inibidor de biofilme, uma vez que inibiu o crescimento dos microrganismos testados por um intervalo de 21% a 60% (Tabela 8). Tal como aconteceu com o poliestireno, este produto é eficaz contra bactérias Gram-negativas, mas não contra microrganismos Gram-positivos, quando usado como condicionador de superfície. No entanto, quando adicionados ao meio, este produto é eficaz contra a formação de biofilme e apresenta atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados.

Conclusão

Foram correlacionadas a características físico-químicas de microrganismos e superfícies abióticas à adesão, formação de biofilme e propriedade anti-corrosiva. Os biossurfactantes foram eficazes como agentes antimicrobianos que inibem o crescimento das formas planctônicas e também a formação de biofilme. Quando os biossurfactantes foram adsorvidos a superfícies, a adesão e a formação de biofilme foram inibidas, bem como a formação de uma película formada por ramnolipídeos retardou a corrosão de ligas metálicas.

Os biossurfactantes produzidos e testados neste estudo têm grande potencial como agentes de condicionamento de superfícies de poliestireno e de aço inoxidável AISI 304. Eles reduziram significativamente a formação de biofilme de ambos os agentes patogênicos Gram-positivos (*Listeria monocytogenes* ATCC 19112 e *L. monocytogenes* ATCC 7644) e do microrganismo Gram-negativo (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 135252) em diferentes fases de formação do biofilme usando diferentes concentrações de biossurfactantes. Eles também demonstraram uma eficiência mais elevada do que o produto comercial, que não atingem um grau satisfatório de inibição uma vez que a formação de biofilme foi induzida em determinadas condições.

Este estudo também indica que há um grande potencial para a utilização de biossurfactantes como agentes anticorrosivos para diferentes superfícies de ligas metálicas e também como agentes antimicrobianos e antibiofilme, quando adicionados ao meio de cultura. Estes resultados podem incentivar a aplicação destes produtos em diferentes sistemas industriais.

Referências

- (1) BANAT IM, MAKKAR RS, CAMEOTRA SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.53, p.495-508, 2000.
- (2) DESAI JD, BANAT IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.47-64, 1997.
- (3) KUMAR CG, ANAND SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p. 9-27, 1998.
- (4) MEYLHEUC T, RENAULT M, BELLON-FONTAINE MN. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with

- Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**. v.109, p.71-78, 2006a.
- (5) NITSCHKE M, ARAUJO LV, COSTA SGVAO, PIRES RC, ZERAIK AE, FERNANDES ACLB, FREIRE DMG, CONTIERO J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. **Letters in Applied Microbiology**. 49:241-247, 2009.
 - (6) ARAUJO LV, ABREU F, LINS U, SANTA ANNA LMM, NITSCHKE M, FREIRE DMG. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**. v. 44, p.481-488, 2011.
 - (7) DAGBERT C, MEYLHEUC T, BELLON-FONTAINE MN. Corrosion behavior of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Electrochimica Acta**, v.51, p.5221-5227, 2006.
 - (8) SANTA ANNA LM, SEBASTIAN GV, SANTOS AS, ALVES TM, MENEZES EP, PERREIRA JR N, FREIRE DMG. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environment. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 19, p.159-166, 2002.
 - (9) SANTA ANNA LM, FREIRE DMG, BORGES CP, KRONEMBERGER FA, PEREIRA JR N, inventor; Petróleo Brasileiro S.A., assignee. **Biosurfactant and its uses in bioremediation of oil contaminated sandy soils**. Patent PI0405952-2, 2004.
 - (10) SANTOS AS, SAMPAIO APW, VASQUEZ PS, SANTA ANNA LM, PEREIRA JR N, FREIRE DMG. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.98-100, p.1025-1035, 2002.
 - (11) COSTA SGVAO, NITSCHKE M, HADDAD R, EBERLIN MN, CONTIERO J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.
 - (12) PHAM TH, WEBB JS, REHM BH. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**. v.150, p.3405-3413, 2004.
 - (13) SANTA ANNA LM. **Produção e utilização de biossurfactantes na biorremediação de solos impactados com petróleo**. Tese. Rio de Janeiro (BR), 2005. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
 - (14) DÉZIEL E, LÉPINE F, DENNIE D, BOISMENU D, MAMER OA, VILLEMUR R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochimica and Biophysica Acta**. v.1440, p.244-252, 1999.
 - (15) NITSCHKE M, PASTORE GM. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresearch Technology**. v.97, p. 336-341, 2006.
 - (16) SONG B, SPRINGER J. Determination of interfacial tension from the profile of a pendant drop using computer-aided image processing: 2 Experimental. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.184, p.77-91, 1996.

-
- (17) SHEPPARD JD, MULLIGAN CN. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.27, p.11-116, 1987.
- (18) COOPER DG. Biosurfactants. **Microbiology Science**. v.3, p.145-149, 1986.
- (19) VAN OSS CJ. Hydrophobicity of biosurfaces – Origin, quantitative determination and interaction energies. **Colloids and Superficies B**. v.5, p.91-110, 1995.
- (20) VAN OSS CJ, CHAUDHURY MK, GOOD RJ. Interfacial Lifshitz-van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. **Chemistry Reviews**. v.88, p.927-941, 1988.
- (21) STEPANOVIC S, CIRKOVIC I, RANIN L, SVABIC-VLAHOVIC M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. **Letters in Applied Microbiology**. 38:428-432, 2004.
- (22) STEPANOVIC S, VUKOVIC D, DAKIC I, SAVIC B, SVABIC-VLAHOVIC M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiology methods**. v.40, p. 175-179, 2000.
- (23) CERCA N, MARTINS S, CERCA F, JEFFERSON KK, PIE, GB, OLIVEIRA R, AZEREDO J. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.56, p.331-336, 2005.
- (24) AZEREDO JA, LAZAROVA V, OLIVEIRA R. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. **Water Science & Technology**. v. 39, p.243-250, 1999.
- (25) DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS A, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v.28, p.350-356, 1956.
- (26) BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- (27) WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK EW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**. v. 3, p.163-175, 2008.
- (28) ABALOS A, PINAZO A, INFANTE MR, CASALS M, GARCIA F, MANRESA A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**. v. 17, p.1367-1371, 2001.
- (29) DONG YH, ZHANG XF, XU JL, TAN AT, ZHANG LH. VqsM, a novel AraC-type global regulator of *quorum sensing* signaling and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**. v.58, p.552-564, 2005.
- (30) GONZÁLEZ, J. E. & KESHAVAN, N. D. Messing with Bacterial *Quorum Sensing*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, n.4, p.859-875, 2006.

-
- (31) WILLIAMS P, CÁMARA M. *Quorum sensing* and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**. v.12, p.1-10, 2009.
- (32) DAS P, MUKHERJEE S, SEN R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**. v.104, p.1675-1684, 2008.
- (33) FERNANDES PAV, ARRUDA IR, SANTOS AFAB, ARAÚJO AA, MAIOR ANS, XIMENES EA. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.704-709, 2007.
- (34) RIVARDO F, TURNER RJ, ALLEGRONE G, CERI H, MARTINOTTI MG. Anti-Adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.83, p.541-553, 2009.
- (35) AHIMOU F, JACQUES P, DELEU M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**. v.27, p.749-754, 2000.
- (36) ORTIZ A, TERUEL JA, ESPUNY MJ, MARQUÉS A, MANRESA Á, ARANDA FJ. Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. **International Journal of Pharmacy**, v.325, p.99-107, 2006.
- (37) SOTIROVA AV, SPASOVA DI, GALABOVA DN, KARPENKO E, SHULGA, A. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. **Current Microbiol**. v.56, p.639-644, 2008.
- (38) MAUKONEN J, MÄTTÖ J, WIRTANEN G, RAASKA T, MATTILA-SANDHOLM T, SAARELA M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.30, p.327-356, 2003.
- (39) DJORDJEVIC D, WIEDMANN M, MCLANDSBOROUGH LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p. 2950-2958, 2002.
- (40) CHAE MS, SCHAFT H, HANSEN LT, MACKERETH R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**. v.23, p.250-259, 2006.
- (41) LY MH, VO NH, LE TM, BELIN JM, WACHÉ Y. Diversity of the surface properties of Lactococci and consequences on adhesion to food components. **Colloids and Superficies B**. v. 52, p.149-153, 2006.
- (42) PARIZZI SQF, ANDRADE NJ, SILVA CAS, SOARES NFF, SILVA EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and technology**. v.47, p.77-83, 2004.
- (43) MEYLHEUC T, METHIVIER C, RENAULT M, HERRY JM, PRADIER CM, BELLON-FONTAINE MN. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Superficies B**. v.52, p.128-137, 2006b.

-
- (44) BORUCKI MK, PEPPIN JD, WHITE D, LOGE F, CALL DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**. v.69, p.7336-7342, 2003.
- (45) MACEDO, J. A. B. de. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. Disponível em: <<http://www.aguaseguas.ufjf.br/ARTIGOBiofilmebacterianosWeb.PDF>>. Acesso em: 09 nov. 2006.
- (46) HOOD SK, ZOTTOLA EA. Biofilms in food processing. **Food control**. v.6, p.9-18, 1995.
- (47) HAMADI F, LATRACHE H. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. **Colloids and Superfícies B**. v.65, p.134-139, 2008.
- (48) CHAVANT P, MARTINIE B, MEYLHEUC T, BELLON-FONTAINE MN, HEBRAUD M. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied Environmental Microbiology**. v.68, p.728-737, 2002.
- (49) BUSSCHER HJ, WEEERKAMP AH, VAN DER MEI HC, VAN PELT AWJ, DE JONG HP, ARENDS J. Measurements of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied Environmental Microbiology**. v.48, p.980-983, 1984.
- (50) MACHADO SMO. 2005. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfatante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis**. Tese. Minho (PT): Universidade do Minho.
- (51) KELL H, HOLZWARATH J F, BOETTCHER C, HEENAN R K, VATER J. Physicochemical studies of the interaction of the lipoheptapeptide surfactin with lipid bilayers of 1- α -dimyristoyl phosphatidylcholine. **Biophysical Chemistry**, v,128, p.114-124, 2007.
- (52) DAHRAZMA B, MULLIGAN C N, NIEH M P. Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): A small-angle neutron scattering (SANS) study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, p.590-593, 2008.
- (53) DAGBERT, C.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M.-N. Corrosion behavior of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 5221-5227, 2006.
- (54) MEYLHEUC T, VAN OSS CJ, BELLON-FONTAINE MN. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, p.822-832, 2001.
- (55) DAS P, MUKHERJEE S, SEN R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. **Colloids and Superfícies B**. v.71, p.183-186, 2009.
- (56) GOMES MZV, NITSCHKE M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**. v.25, p. 441-447, 2012.